

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Neurosciences Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Chloé PICQ**

Thèse dirigée par **Bruno BONAZ**  
codirigée par **Didier CLARENÇON**

préparée au sein du **Laboratoire Stress et interactions  
Neurodigestives à l'Institut de Recherche Biomédicale des  
Armées et au Grenoble Institut des Neurosciences**  
dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

# **Relations neurodigestives et stimulation vagale basse fréquence chez le rat anesthésié : implications du système nerveux central et du système immunitaire**

Thèse soutenue publiquement le **29 juin 2012**,  
devant le jury composé de :

**Pr. Vassilia THÉODOROU**

PhD, INRA, Toulouse (Présidente)

**Pr. Yvette TACHÉ**

PhD, UCLA, Los-Angeles, États-Unis (Rapporteur)

**Pr. Catherine THIOLET**

Médecin en chef, HIA Bégin, Saint-Mande (Rapporteur)

**Dr. Jean-François MAYOL**

PhD, IRBA, Grenoble (Membre)

**Dr. Didier, CLARENÇON**

Médecin en chef, IRBA, Grenoble (Co-directeur de thèse)

**Pr. Bruno BONAZ**

PU-PH, CHU Hépatogastroentérologie et GIN équipe 8, Grenoble (Directeur de thèse)

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /  
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*



« La science moderne est un admirable monument qui fait honneur à l'espèce humaine et  
qui compense (un peu) l'immensité de sa bêtise guerrière»  
Hubert Reeves

# Remerciements

Je souhaite remercier tout particulièrement,

Le **Professeur Bruno Bonaz**, Directeur de Recherche de l'équipe 8 du Grenoble Institut des Neurosciences et Gastroentérologue au CHU de Grenoble, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe Stress et Interactions Neurodigestives, avoir dirigé cette thèse et pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Le **Médecin en chef Didier Clarençon**, responsable de l'unité de «Neurophysiologie Expérimentale» du département de radiobiologie et radiopathologie de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA-CRSSA), pour avoir co-dirigé cette thèse, de m'avoir donné les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail, pour son implication, son encadrement et ses conseils dans ce travail de recherche.

Le **Docteur Jean-François Mayol**, pour son implication dans ce projet, son enthousiasme, sa disponibilité, ses nombreux conseils et ses encouragements.

Le **Docteur Valérie Sinniger**, pour son aide et sa participation à des nombreuses expériences, son suivi et sa sympathie.

Le **Médecin en chef Frédéric Canini**, responsable de l'unité «Neurophysiologie du Stress» pour le partage de ses connaissances et le soutien qu'il m'a accordé.

Le **Docteur Sonia Pellissier**, pour son soutien et ses conseils.

Le **Docteur Julien Meregnani** pour avoir initié le projet de stimulation vagale et m'avoir transmis ses connaissances et pour sa sympathie.

Tous les membres de l'équipe 8 du Grenoble Institut des Neurosciences.

Le **Docteur Olivier David**, responsable de l'équipe 11 «Fonctions cérébrales et neuromodulation» du Grenoble Institut des Neurosciences ainsi que le doctorant **Sébastien Reyt** pour leurs implication, leurs savoir-faire et leurs aide pour l'étude réalisée par IRMF.

Le **Médecin en chef André Peinnequin** responsable du «pôle de génomique» (IRBA-CRSSA) et ainsi que les membres de son équipe, **Catherine Mouret, Thomas Poyot** et **Pascal Pugnière** pour la formation, leur savoir-faire et leur aide concernant les expériences de biologie moléculaire.

Le **Pharmacien en chef Antonia Alonso** responsable du «Laboratoire d'analyses biologiques» et **Josiane Denis** pour leur aide et leur savoir-faire concernant les expériences de dosage des protéines.

Le **Médecin en chef Jacques Mathieu** pour ses discussions scientifiques et ses conseils.

**Javier Flores** pour son implication, lors de son stage, dans mes expériences d'extraction de protéines et d'ARN et sa bonne humeur.

**Céline Crétallaz** pour notre soutien mutuel entre thésardes.

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

J'adresse un grand merci également à Florent, Fabien, Mylène, Stéphane, Nancy, Aurore, Philippe, Charlotte, Loubna, Bruno, Patrick et tous mes collègues du CRSSA pour leurs conseils, leurs encouragements et pour tous les moments passés ensemble.

Toutes les personnes du GIN et de l'IRBA-CRSSA qui ont participé à ce travail ou pour leur bonne humeur.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury,

Au **Médecin en chef et Professeur agrégé du Val-de-Grâce Catherine Thiolet**, et au **Docteur Yvette Taché** qui me font l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteur. Veuillez trouver dans ce travail mes sincères remerciements.

Au **Docteur Vassilia Théodorou**, qui me fait l'honneur d'examiner ce travail. Veuillez trouver dans ce travail mes sincères remerciements.



# Résumé

## Introduction

La neurostimulation vagale (NSV) à haute fréquence (20-30 Hz) a déjà été approuvée comme thérapeutique de certaines formes d'épilepsie et de dépression réfractaires aux traitements chez l'Homme. De plus, la NSV à basse fréquence (5 Hz) a été expérimentée avec succès chez l'animal pour traiter différentes inflammations périphériques, notamment digestives. Des travaux récents ont mis en évidence que cet effet anti-inflammatoire est induit par l'activation des fibres efférentes vagales, libérant en périphérie de l'acétylcholine qui, en se fixant aux récepteurs  $\alpha$ -7- nicotiques exprimés à la surface des macrophages, inhibe la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Cette voie est connue sous le nom de voie anti-inflammatoire cholinergique. Toutefois, le mécanisme d'action de la NSV basse fréquence reste mal connu et d'autres voies pourraient être mises en jeu impliquant le système nerveux central (SNC) et le système immunitaire périphérique.

## But

Les travaux réalisés ont eu pour objectif d'étudier l'implication du SNC et du système immunitaire dans la modulation de l'inflammation induite par la NSV basse fréquence chez un modèle de rat anesthésié. Dans un premier temps, afin d'étudier l'implication du SNC et la participation des fibres afférentes vagales lors de la NSV 5 Hz, une étude par technique d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) a été réalisée sur le rat «sain» anesthésié. Ensuite, une étude a été effectuée sur l'effet de la NSV sur les cellules immunitaires spléniques ainsi que sur le tube digestif chez un modèle de rat «sain» puis chez un modèle de rat atteint d'une colite expérimentale induite par une injection intra-colique d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS).

## Résultats

Les données obtenues lors de l'étude d'IRMf ont permis de mettre en évidence un rôle important des fibres afférentes vagales; elles modulent certaines structures du SNC qui pourraient indirectement participer à la régulation de l'inflammation digestive induite par la NSV 5 Hz. Ensuite, les études réalisées sur les sous-populations lymphocytaires spléniques ont révélé que d'autres cellules immunitaires que les macrophages étaient impliquées lors de la NSV. Chez le modèle de rat «sain», ne présentant pas d'inflammation digestive, les résultats de cytométrie en flux ont montré que la NSV 3h basse fréquence induisait une diminution de l'activation des lymphocytes T CD4 ainsi que du pourcentage de NKT par rapport aux lymphocytes T. Ces résultats sont en faveur d'un rôle de la NSV 3h permettant d'inhiber l'activation lymphocytaire et de jouer un rôle sur les NKT possédant des propriétés immunorégulatrices. Chez le modèle de rat présentant une colite, la NSV 3h n'a pas le même effet que chez le modèle de rat «sain». En effet, le dosage de cytokines sécrétées par les splénocytes en culture a mis en évidence que la NSV augmente le potentiel de sécrétion d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) des splénocytes et plus particulièrement des lymphocytes T CD4 spléniques. Parallèlement, l'effet anti-inflammatoire de la NSV a été mis en évidence au niveau du côlon transverse (au-dessus de la zone lésée) par une diminution des ARNm de SOCS3 et du TNF- $\alpha$  ainsi qu'une légère diminution de la myéloperoxydase. Ces données ont démontré un rôle de la NSV sur la fonctionnalité des lymphocytes T CD4 spléniques provoquant une sécrétion plus importante d'IL-10. La NSV basse fréquence pendant 3h permettrait d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse anti-inflammatoire en phase d'initiation d'inflammation digestive. De plus, l'effet anti-inflammatoire de la NSV est retrouvé au niveau du tube digestif au-dessus de la zone lésée (côlon transverse).

## **Conclusion**

Ces données expérimentales montrent que d'autres voies impliquant différents types cellulaires sont susceptibles d'être mises en œuvre en plus de la voie classique anti-inflammatoire cholinergique par la NSV basse fréquence. Elle induit l'implication du SNC par l'activation des afférences vagales et des cellules immunitaires spléniques telles que les lymphocytes T CD4 et les NKT. Un effet anti-inflammatoire de la NSV est retrouvé au niveau du côlon transverse même en phase d'initiation de l'inflammation digestive, mais pas au niveau des lésions dans le côlon distal. Ces résultats présentent des implications thérapeutiques : la NSV basse fréquence est actuellement en essai clinique pour être utilisée comme traitement dans la maladie de Crohn.

# Abstract

## Introduction

High frequency (30 Hz) vagus nerve stimulation (VNS) has been approved as a treatment for some types of epilepsy and depression in humans. Low-frequency (5 Hz) VNS has also been successful for the treatment of different animal inflammation models, notably digestive inflammation. Recent studies have shown that the anti-inflammatory effect is induced by the activation of the efferent vagal fibers, which secrete acetylcholine in periphery. It links itself to  $\alpha$ -7-nicotinic receptors on the macrophages surface, inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines. This pathway is known by the name of the cholinergic anti-inflammatory pathway. However, the mechanism of action of low-frequency VNS remains unclear and other pathways could be involved implicating the central nervous system (CNS) and the immune system.

## Aim

The aim of this study was to evaluate the implication of the CNS and the immune system in the modulation of inflammation induced by low-frequency VNS in an anaesthetized rat model. Firstly, to study the implication of the CNS and the contribution of the afferent vagal fibers during 5Hz VNS, a study using functional magnetic resonance imaging (fMRI) on a «healthy» anaesthetized rat model was carried out. Secondly, an experiment on the effect of VNS on splenic immune cells as well as on the digestive tract was fulfilled on a «healthy» rat model followed by a study on a rat model of colitis induced by intracolonic injection of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS).

## Results

fMRI data brought to light an important role of the afferent vagal fibers. They modulate some structures of the CNS which could contribute to the modulation of digestive inflammation by 5Hz VNS. The studies carried out by FACS on the sub-populations of splenic lymphocytes revealed that other immune cells than macrophages could be implicated by VNS. In the «healthy» rat model, with no digestive inflammation, FACS data show that 3h VNS decreases T CD4 lymphocytes activation and the percentage of NKT in relation to T lymphocytes. These data are in favor of an inhibiting role of VNS on lymphocytes activation and also has an impact on NKT cells which have immunoregulatory properties. 3h VNS does not have the same effect on the rat model of colitis. In fact, the quantification of secreted cytokines by cultured splenocytes show that VNS increases the potential of IL-10 (anti-inflammatory) cytokine by splenocytes and particularly splenic T CD4 lymphocytes. In the same way, the anti-inflammatory effect of VNS is seen in the transverse colon (above the lesions): decrease of TNF- $\alpha$  and SOCS3 mRNA and of myeloperoxidase. These results show a role of VNS on the functionality of splenic T CD4 lymphocytes inducing an important secretion of IL-10. 3h low-frequency VNS turns the immune response towards an anti-inflammatory response during the early phase of digestive inflammation. Moreover, VNS anti-inflammatory effect is seen in the transverse colon, above the lesions.

## Conclusion

These results reveal that other pathways implicating different cell types are potentially involved besides the classic cholinergic anti-inflammatory pathway by low-frequency VNS. It implicates CNS by the activation of vagal afferents and splenic immune cells such as T CD4 lymphocytes and NKT cells. An anti-inflammatory effect of VNS is found in the transverse colon (above the lesions) even during the initiation phase of digestive inflammation, but not in the distal colon (in the lesions). These data have therapeutic implications: low-frequency VNS is being clinically tested at the moment as a treatment for Crohn's disease.

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. *Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease*. Auton Neurosci. 2011 Feb 24;160(1-2):82-9.

C. Picq, S. Reyt, V. Sinniger, D. Clarençon, B. Bonaz, O. David. *Dynamic Causal Modelling and physiological confounds: a functional MRI study of vagus nerve stimulation*. Neuroimage. 2010 Oct 1;52(4):1456-64.

En préparation :

-Revue : The anti-inflammatory effects of vagus nerve stimulation, and its mechanism of action. Neurogastroenterology and Motility.

- C. Picq, J.F. Mayol, V. Sinniger, D. Clarençon, B. Bonaz. Effect of the volatile anaesthetic isoflurane on inflammation markers in a rat model.

### **Communications orales**

C. Picq, V. Sinniger, J.F. Mayol, D. Clarençon, B. Bonaz. *Effet anti-inflammatoire de la neurostimulation vagale chez le rat anesthésié présentant une colite : étude mécanistique*. XXXème congrès du Club d'Études des Cellules Épithéliales Digestives (CECED) 2012, Grenoble, le 29 et 30 mars 2012.

C. Picq, S. Reyt, V. Sinniger, J.F. Mayol, D. Clarençon, O. David, B. Bonaz. *Effet anti-inflammatoire de la neurostimulation vagale chez le rat : étude mécanistique*. Journée des thésards de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Grenoble, le 28 juin 2011.

C. Picq, V. Sinniger, J.F. Mayol, D. Clarençon, B. Bonaz. *Effet anti-inflammatoire de la neurostimulation vagale chez le rat : étude mécanistique*. 12<sup>ème</sup> Colloque Rhône-Alpes de quantimétrie cellulaire (CRAQ), Saint Étienne, le 6 et 7 avril 2011.

### **Communications affichées**

C. Picq, V. Sinniger, J.F. Mayol, D. Clarençon, B. Bonaz. *Effet anti-inflammatoire de la neurostimulation vagale chez le rat anesthésié présentant une colite : étude mécanistique*. Les Journées de la Recherche Médicale de Grenoble (JRM) 2012, le 4 mai 2012.

C. Picq, V. Sinniger, J.F. Mayol, D. Clarençon, B. Bonaz. *Effet anti-inflammatoire de la neurostimulation vagale chez le rat anesthésié présentant une colite : étude mécanistique*. Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie (JFHOD), Paris, du 15 – 18 mars 2012.

C. Picq, V. Sinniger, J.F. Mayol, D. Clarençon, B. Bonaz. *Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model: a mechanistic study*. 8<sup>th</sup> World Congress of International Brain Research Organization (IBRO), Florence, Italie, du 14 – 18 juillet 2011.

C. Picq, V. Sinniger, J.F. Mayol, D. Clarençon, B. Bonaz. Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model: mechanistic study.

10ème Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, du 24 – 27 mai 2011.

C. Picq, V. Sinniger, J.F. Mayol, D. Clarençon, B. Bonaz. *Effet anti-inflammatoire de la neurostimulation vagale chez le rat : étude mécanistique.*

Les Journées de la Recherche Médicale de Grenoble (JRM), le 15 et 16 avril 2011.

C. Picq, S. Reyt, V. Sinniger, D. Clarençon, B. Bonaz, O. David. *Effet anti-inflammatoire de la neurostimulation vagale chez le rat : étude mécanistique.*

Journée des thésards de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Grenoble, 22 juin 2010.

C. Picq, S. Reyt, V. Sinniger, D. Clarençon, B. Bonaz, O. David. *Effet anti-inflammatoire de la neurostimulation vagale chez le rat : étude mécanistique.*

Journée du doctorant et journée de l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant, Grenoble, juin 2010.

C. Picq, S. Reyt, V. Sinniger, D. Clarençon, B. Bonaz, O. David. Etude par IRMf des effets centraux de la stimulation vagale basse fréquence a visée anti-inflammatoire digestive.

Les Journées de la recherche médicale de Grenoble (JRM), le 28 et 29 mai 2010.

C. Picq, S. Reyt, V. Sinniger, D. Clarençon, O. David, B. Bonaz. A functional MRI study of vagus nerve stimulation.

Digestive Disease Week (DDW), Nouvelle-Orléans, USA, du 1 au 6 mai 2010.

C. Picq, S. Reyt, V. Sinniger, D. Clarençon, B. Bonaz, O. David. *Etude par IRMf des effets centraux de la stimulation vagale basse fréquence a visée anti-inflammatoire digestive.*

Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie (JFHOD) 2010, Paris, du 25 – 28 mars 2010.

#### **Financement :**

L'ensemble des études a été financé par la Direction Générale de l'Armement (DGA) et l'INSERM.

# TABLE DES MATIERES

# Table des matières

<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>16</b>
<b>I. CONTEXTE.....</b>	<b>18</b>
<b>II. INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>21</b>
<b>1. La communication entre le système nerveux central et la périphérie.....</b>	<b>22</b>
1.1 L'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien.....	22
1.2 Le système nerveux autonome .....	24
1.2.1 Le système nerveux sympathique (SNS).....	25
1.2.2 Le système nerveux parasympathique (SNAp).....	26
1.3 Le système nerveux intrinsèque (SNI).....	28
1.3.1 Anatomie du tube digestif (TD) .....	28
1.3.2 Immunité intestinale .....	30
<b>2. Le nerf vague.....</b>	<b>32</b>
2.1 Anatomie du nerf vague.....	32
2.1.1 Origine du nerf vague .....	32
2.1.2 Projections des noyaux du nerf vague.....	34
2.1.3 Trajet du nerf vague .....	35
2.2 Les fonctions physiologiques du nerf vague.....	39
2.3 Le nerf vague et l'inflammation .....	40
2.3.1 La fonction des afférences vagales.....	40
2.3.2 La voie anti-inflammatoire cholinergique et les efférences vagales .....	42
2.3.2.1 La voie de signalisation de NF-κB.....	43
2.3.3 Le fonctionnement de l'acétylcholine dans l'effet anti-inflammatoire .....	44
2.3.3.1 Structure et métabolisme de l'acétylcholine.....	44
2.3.3.2 Les récepteurs à l'acétylcholine.....	45
2.3.3.3 La localisation des récepteurs.....	46
2.4 La neurostimulation vagale .....	47
<b>3. Le système immunitaire .....</b>	<b>50</b>
3.1 Les cellules du système immunitaire.....	50
3.1.1 Les cellules lymphoïdes .....	51
3.1.2 Les cellules myéloïdes.....	53
3.1.3 La réaction inflammatoire .....	56
3.2 Régulation du système immunitaire par le SNC.....	59
3.2.1 Récepteurs de neuromédiateurs sur les cellules immunitaires .....	59
3.2.2 Anatomie de la rate .....	60
3.2.3 Rôle de la rate dans l'inflammation.....	62
<b>4. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).....</b>	<b>65</b>
4.1 Atteintes digestives .....	65
4.2 Symptômes.....	66
4.3 Traitements .....	66
4.4 Modèles expérimentaux d'inflammation colique .....	67
<b>III. PARTIE 1 : ETUDE DES EFFETS CENTRAUX DE LA NEUROSTIMULATION VAGALE SUR UN MODELE DE RAT SAIN ANESTHESIE .....</b>	<b>68</b>
<b>1. Résumé de l'étude 1 : étude des effets centraux de la NSV sur un modèle de rat sain anesthésié.....</b>	<b>69</b>

1.1	Objectif de l'étude .....	69
1.2	Matériels et méthodes .....	69
1.3	Résultats .....	69
1.4	Conclusion.....	70
<b>2.</b>	<b>Objectif de l'étude.....</b>	<b>71</b>
<b>3.</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>71</b>
3.1	Animaux.....	71
3.2	Anesthésie .....	72
3.3	Chirurgie .....	72
3.4	Contrôles réalisés pour cette expérimentation.....	73
3.4.1	Effets de la NSV sur la fréquence cardiaque.....	73
3.4.2	Vagotomie .....	74
3.4.3	Activation pharmacologique du système cardiovasculaire .....	74
3.5	Stimulation vagale .....	75
3.6	Préparation de l'animal pour l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) .....	76
3.7	Paramètres de l'imagerie par résonance magnétique .....	76
3.8	Analyse des données d'IRMf .....	78
3.9	Analyses statistiques des signaux BOLD .....	78
3.10	La Dynamic Causal Modelling (DCM).....	78
<b>4.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>80</b>
4.1	Modulation de la fréquence cardiaque par la NSV .....	80
4.1.1	Stimulation discontinue (3 minutes ON, 10 minutes OFF) à fréquences croissantes.....	80
4.1.2	Stimulation continue pendant 3 heures du nerf vague gauche .....	81
4.2	Signaux BOLD lors de la NSV 5Hz.....	82
4.2.1	Vagotomies.....	83
4.2.2	Activation pharmacologique du système cardiovasculaire .....	84
4.2.3	Superposition des cartes d'activations d'IRMf .....	85
4.3	Analyse par la Dynamic Causal Modelling (DCM).....	87
<b>5.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>90</b>
<b>IV. PARTIE 2 : ETUDE DES EFFETS PERIPHERIQUES DE LA NSV COUPLEE A DIFFERENTS ANESTHESIQUES SUR UN MODELE DE RAT SAIN.....</b>		<b>95</b>
<b>1.</b>	<b>Résumé de l'étude 2 : étude des effets périphériques de la NSV couplée à différents anesthésiques sur un modèle de rat sain .....</b>	<b>96</b>
1.1	Objectif de l'étude.....	96
1.2	Matériel et méthodes.....	96
1.3	Résultats .....	96
1.4	Conclusion .....	97
<b>2.</b>	<b>Objectif de l'étude.....</b>	<b>98</b>
<b>3.</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>99</b>
3.1	Animaux.....	99
3.2	Anesthésie .....	100
3.3	Chirurgie .....	100
3.4	Stimulation vagale .....	101
3.5	Groupes d'animaux .....	102
3.6	Euthanasie et prélèvements.....	102
3.7	Analyse par cytométrie en flux.....	103
3.7.1	Préparation des cellules .....	103
3.7.2	Immunomarquage des cellules.....	103



3.7.3 Analyse des cellules .....	104
3.7.4 Culture cellulaire.....	106
3.7.5 Dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture .....	106
3.8 Quantification des ARNm par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) .....	107
3.8.1 Extraction des ARN .....	108
3.8.2 Vérification de la qualité et de la concentration des éluats .....	108
3.8.3 Transcription inverse .....	108
3.8.4 PCR quantitative en temps réel sur LightCycler .....	108
3.8.5 Gènes cibles étudiés .....	109
3.8.6 Traitement et normalisation des données .....	110
3.9 Analyses statistiques .....	111
<b>4. Résultats .....</b>	<b>112</b>
4.1 Etude des effets de la NSV chez le rat anesthésié à l'isoflurane .....	112
4.1.1 Analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques par cytométrie en flux .....	112
4.1.2 Dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture .....	115
4.2 Etude des effets de la NSV chez le rat anesthésié au pentobarbital.....	116
4.2.1 Analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques par cytométrie en flux .....	116
4.2.1.1 Effet de la NSV sur les sous-populations lymphocytaires spléniques.....	117
4.2.1.2 Effet de l'anesthésie et/ou de la chirurgie sur les sous-populations lymphocytaires spléniques .....	118
4.2.2 Dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture issus des rats anesthésiés au pentobarbital.....	119
4.3 Dosage des ARNm par q RT-PCR.....	122
<b>5. Discussion .....</b>	<b>126</b>
<b>V. PARTIE 3: ETUDE DES EFFETS PERIPHERIQUES DE LA NSV SUR UN MODELE DE RAT ANESTHESIE PRESENTANT UNE COLITE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>131</b>
<b>1. Résumé de l'étude 3 : étude des effets périphériques de la NSV sur un modèle de rat anesthésié atteint d'une colite expérimentale au TNBS .....</b>	<b>132</b>
1.1 Objectif de l'étude.....	132
1.2 Matériels et méthodes .....	132
1.3 Résultats .....	132
1.4 Conclusion .....	133
<b>2. Objectif de l'étude.....</b>	<b>134</b>
<b>3. Matériels et méthodes .....</b>	<b>134</b>
3.1 Animaux.....	134
3.2 Colite au TNBS .....	134
3.3 Etude cinétique de la réponse cytokinique de la colite au TNBS .....	135
3.3.1 Groupes d'animaux.....	135
3.3.2 Anesthésie .....	135
3.3.3 Euthanasie et prélèvements.....	136
3.3.4 Quantification par technique ELISA de l'expression de cytokines.....	136
3.4 Anesthésie des animaux pour l'étude des effets périphériques de la NSV sur un modèle de rat présentant une colite.....	137
3.5 Chirurgie .....	137
3.6 Stimulation vagale .....	137
3.7 Groupes d'animaux .....	137
3.8 Euthanasie et prélèvements.....	138
Figure 52 : photographies de prélèvements de côlons distaux. A : côlon distal prélevé sur un rat contrôle, B : côlon distal prélevé 3 h après l'injection de TNBS. ....	138
3.9 Analyse par cytométrie en flux.....	139

3.9.1 Préparation des cellules .....	139
3.9.2 Immunomarquage des cellules.....	139
3.9.3 Analyse des cellules .....	139
3.9.4 Culture cellulaire.....	139
3.9.5 Tri magnétique des lymphocytes T CD4 .....	139
3.9.6 Dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture .....	140
3.10 Quantification de l'expression de la myéloperoxidase .....	140
3.11 Quantification de l'expression de cytokines dans le tube digestif .....	140
3.12 Dosage des ARNm par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) .....	140
3.12.1 Pré-broyage des échantillons .....	141
3.12.2 Broyage des échantillons.....	141
3.12.3 Extraction des ARN totaux.....	141
3.12.4 Vérification de la qualité et de la concentration des éluats .....	141
3.12.5 Transcription inverse .....	142
3.12.6 PCR quantitative en temps réel sur LightCycler .....	142
3.12.7 Gènes cibles étudiés .....	142
3.13 Analyses statistiques .....	144
<b>4. Résultats .....</b>	<b>145</b>
4.1 Etude cinétique des effets du TNBS sur la sécrétion de cytokines au niveau du côlon distal .....	145
4.1.2 Variation pondérale des animaux.....	145
4.1.3 Quantification de l'expression de cytokines tissulaires dans le côlon distal .....	145
4.2 Analyse des effets de la NSV chez le rat atteint de colite expérimentale et anesthésié au pentobarbital .....	147
4.2.1 Analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques par cytométrie en flux .....	147
4.2.1.1 Effet de la NSV sur les sous-populations lymphocytaires spléniques.....	148
4.2.1.2 Effet de l'anesthésie et/ou de la chirurgie sur les sous-populations lymphocytaires spléniques .....	149
4.2.1.3 Effets de la colite sur les sous-populations lymphocytaires spléniques .....	149
4.2.2 Dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture prélevés sur des rats inflammés ou non et anesthésiés au pentobarbital.....	150
4.3 Quantification de l'expression de la myéloperoxidase (MPO) .....	155
4.4 Quantification de l'expression de cytokines tissulaires dans le tube digestif .....	159
4.4.1 Dosage du TNF- $\alpha$ .....	160
4.4.1.1 Effet de la NSV .....	160
4.4.1.2 Effet de la manipulation .....	160
4.4.1.3 Effet de la colite .....	160
4.4.2 Dosage de l'IL-1 $\beta$ .....	161
4.4.2.1 Effet de la NSV .....	161
4.4.2.2 Effet de la colite .....	161
4.4.3 Dosage de l'IL-10 .....	162
4.4.3.1 Effet de la NSV .....	162
4.4.3.2 Effet de la colite .....	162
4.5 Quantification des ARNm par qRT-PCR .....	163
4.5.1 Quantification des ARNm dans le côlon transverse .....	163
4.5.2 Quantification des ARNm dans les splénocytes .....	165
4.5.3 Corrélations .....	167
<b>5. Discussion .....</b>	<b>170</b>
<b>VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>175</b>
<b>VII. ANNEXE (ARTICLES PUBLIES) .....</b>	<b>180</b>
<b>VIII. REFERENCES.....</b>	<b>206</b>

# Abréviations

A5	Groupe cellulaire noradrénergique
Ach	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ACTH	Hormone adrenocorticotrophique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ag	Antigène
AMB	Noyau ambigu
ARBP	Acidic ribosomal phosphoprotein
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AP	Area postrema
AV3V	Aire antéroventrale du troisième ventricule
BST	Noyau du stria terminalis
CEA	Noyau central de l'amygdale
ChAT	Choline acétyltransférase
ChE	Cholinestérase
Cp	Crossing point
CRH	Corticotropin releasing hormone
CVD	Complexe vagal dorsal
CyCA	Cyclophyline A
DAMPs	Disease associated molecular patterns
DCM	Dynamic Causal Modelling
DMX	Noyau moteur dorsal du nerf vague
DSS	Dextran sulfate sodium
EEG	Electroencéphalogramme
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
HMGB1	High mobility group box 1
HPA	Hypothalamo-hypophysio-surrénalien
HPRT	Hypoxantine guanine phosphotransferase
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
ICAM1	Intracellular adhesion molecule 1
IL	Interleukine
ILS	Cortex infralimbique
IML	Colonne intermédiolatérale de cellules
INS	Cortex insulaire
IP	Intra-péritonéale
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
IV	Intraveineuse
Jak 2	Janus kinase 2
LC	Locus coeruleus
LHAp	Aire latérale postérieure hypothalamique
LPS	Lipopolysaccharide
LTh	Lymphocyte T helper
mAChR	Muscarinic acetylcholine receptor
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MPO	Myéloperoxydase
nAChR	Nicotinic acetylcholine receptor
NFκB	Nuclear factor κ B
NFκBiA	Nuclear factor of κ-light chain gene enhancer in B-cells inhibitor α
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T
NMDV	Noyau moteur dorsal du nerf vague
NPB	Noyau parabrachial
NPV	Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
NTS	Noyau du tractus solitaire
NSV	Neurostimulation du nerf vague
NV ou X	Nerf vague
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBS	Tampon phosphate salin
PNS	Système nerveux périphérique
PV-LF	Groupes cellulaires tubérales hypothalamiques
q RT-PCR	PCR quantitative en temps réel
RCH	Rectocolite hémorragique
RPMI	Roswell park memorial institute medium
SI	Système immunitaire
SNA	Système nerveux autonome
SNAP	Système nerveux parasymphatique
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
SNI	Système nerveux intrinsèque
SNS	Système nerveux sympathique
SOCS	Suppressor of Cytokine Signalling
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SVF	Sérum de veau foetal
TD	Tube digestif
TLR	Toll like receptor
TGF	Transforming growth factor
TNBS	Acide trinitrobenzène sulfonique
TNF	Tumor necrosis factor
VLM	Bulbe ventrolatéral
VPpc	Noyau ventropostérieur parvocellulaire de l'hypothalamus
X	Nerf vague

# Liste des figures et tableaux

Figure 1 : l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien et les autres interactions neuro-immunitaires.....	24
Figure 2 : l'organisation de l'innervation du système nerveux sympathique et parasympathique.....	27
Figure 3 : schéma du tube digestif.....	29
Figure 4 : le système nerveux intrinsèque.....	31
Tableau 1 : caractéristiques de fibres myélinisées du NV.....	32
Figure 5 : le tronc cérébral.....	34
Figure 6 : représentation schématique des projections centrales des afférences vagales chez le rat.....	35
Figure 7 : parcours du nerf vague.....	37
Figure 8 : représentation schématique du territoire d'innervation du nerf vague en périphérie.....	38
Figure 9 : innervation parasympathique du cœur.....	39
Figure 10 : les différentes connexions et systèmes de régulation entre le SNC et le système immunitaire.....	41
Figure 11 : la voie anti-inflammatoire cholinergique.....	42
Figure 12 : voie de signalisation de NF- $\kappa$ B.....	44
Figure 13 : métabolisme et libération de l'acétylcholine.....	45
Figure 14 : structure des récepteurs à l'acétylcholine.....	46
Figure 15 : schéma d'implantation de l'électrode de stimulation et du stimulateur.....	48
Tableau 2 : effets secondaires associés à la NSV de 0-3 mois et de 9-12 mois après implantation.....	49
Figure 16 : les étapes de l'hématopoïèse.....	51
Tableau 3 : clusters de différenciation chez le rat et l'Homme des populations lymphocytaires.....	55
Figure 17 : La synapse immunologique.....	56
Tableau 4 : récapitulatif des cytokines principales jouant un rôle dans la réaction inflammatoire.....	58
Figure 18 : la surface viscérale de la rate.....	60
Figure 19 : Coupe transversale de la rate.....	61
Figure 20 : relations entre la rate et le SNC dans la régulation de l'inflammation.....	64
Figure 21 : les interactions du NV avec le TD.....	64
Figure 22 : schéma d'implantation de l'électrode de stimulation.....	73
Figure 23 : les différentes phases chirurgicales de la mise en place de l'électrode de stimulation.....	73
Figure 24 : vagotomies sélectives.....	74
Figure 25 : schéma de la chaîne de stimulation.....	75
Figure 26 : visualisation à l'oscilloscope du signal de stimulation biphasique.....	75
Figure 27 : images anatomiques.....	77
Figure 28 : effet de différentes fréquences de stimulation (5, 10 et 20 Hz) du NV droit (X) sur la fréquence cardiaque moyenne.....	81
Figure 29 : effet de différentes fréquences de stimulation (5, 10 et 20 Hz) du NV gauche (X) sur la fréquence cardiaque moyenne.....	81
Figure 30 : variation de la moyenne de la fréquence cardiaque en fonction du temps.....	82
Figure 31 : déactivations induites par NSV 5Hz.....	83
Figure 32 : déactivations induites par la stimulation des afférences vagales du NV gauche.....	84
Figure 33 : activations induites par injection en i.v. d'éphédrine.....	85
Figure 34 : superposition des différentes cartes d'activations neuronales.....	86
Figure 35 : schéma des aires déactivées par la NSV.....	87
Figure 36 : analyse de groupe.....	89
Figure 37 : chronogramme de l'expérimentation animale.....	99
Figure 38 : schéma de l'électrode de stimulation Harvard.....	101
Figure 39 : dissociation du nerf vague gauche et mise en place de l'électrode de stimulation Harvard.....	101
Figure 40 : paramètres de la stimulation électrique.....	102
Tableau 5 : liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages.....	103
Figure 41 : histogrammes biparamétriques représentant les stratégies de fenêtrage pour les différentes sous-populations lymphocytaires spléniques.....	105
Tableau 6 : amorces et conditions de PCR.....	110
Tableau 7 : valeurs moyennes des différentes sous-populations lymphocytaires obtenues par cytométrie en flux pour les rats anesthésiés à l'isoflurane.....	112
Figure 42 : nombre de cellules des différentes sous-populations lymphocytaires spléniques par rate.....	114

Tableau 8 : valeurs moyennes des concentrations en pg/ml des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture de splénocytes préalablement activés ou non activés (NA).....	115
Tableau 9 : valeurs moyennes des différentes sous-populations lymphocytaires obtenues par cytométrie en flux pour les rats anesthésiés au pentobarbital. ....	116
Figure 43 : cellularité totale splénique pour les différentes conditions .....	117
Figure 44 : effets de la NSV sur les lymphocytes T et les NKT spléniques.....	118
Figure 45 : effet de l’anesthésie et/ou de la chirurgie sur les lymphocytes T spléniques.....	119
Tableau 10 : valeurs moyennes des concentrations en pg/ml des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture de splénocytes préalablement activés ou non activés (NA).....	119
Figure 46 : concentrations de TNF- $\alpha$ sécrété par les splénocytes en culture .....	121
Tableau 11 : résumé des effets obtenus lors de l’analyse par cytométrie en flux selon l’anesthésique utilisé. ....	121
Figure 47 : dosage des ARNm dans les splénocytes des rats anesthésiés à l’isoflurane.....	123
Figure 48 : dosage des ARNm dans les splénocytes des rats anesthésiés au pentobarbital.....	124
Figure 49 : comparaison des ARNm dosés dans les splénocytes des rats anesthésiés à l’isoflurane et au pentobarbital.....	125
Figure 50 : chronogramme de l’étude cinétique de la colite au TNBS. ....	136
Figure 51 : chronogramme de l’expérimentation animale. ....	137
Figure 52 : photographies de prélèvements de côlons distaux. ....	138
Tableau 12 : amorces et conditions de PCR utilisées dans les prélèvements de côlons transverses. ....	143
Tableau 13 : amorces et conditions de PCR utilisées dans les splénocytes. ....	144
Figure 53 : courbe de la variation relative du poids moyen des rats atteints de colite entre J0 et J4. ....	145
Figure 54 : étude cinétique des niveaux moyens de sécrétion des cytokines tissulaires .....	146
Tableau 14 : valeurs moyennes des différentes sous-populations lymphocytaires obtenues par cytométrie en flux pour les rats présentant ou non une colite et anesthésiés au pentobarbital. ....	148
Figure 55 : effet de l’anesthésie et/ou de la chirurgie sur les lymphocytes T spléniques.....	149
Figure 56 : effet de la colite sur les lymphocytes et les NKT spléniques.....	150
Tableau 15 : valeurs moyennes des concentrations en pg/ml des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture de splénocytes préalablement activés ou non activés (NA).....	151
Figure 57 : concentration en IL-10 dosée dans le surnageant de culture de splénocytes .....	152
Tableau 16 : valeurs moyennes des concentrations en pg/ml des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture de splénocytes préalablement activés ou non activés (NA).....	153
Figure 58 : concentration en IL-10 dosée dans le surnageant de culture de lymphocytes T CD4 spléniques ....	154
Figure 59 : concentration en MPO des côlons transverses pour les groupes expérimentaux non-colites .....	156
Figure 60 : concentration en MPO des côlons distaux pour les groupes expérimentaux non colites .....	157
Figure 61 : concentration en MPO des côlons transverses de tous les groupes expérimentaux. ....	158
Figure 62 : concentration en MPO des côlons distaux de tous les groupes expérimentaux. ....	159
Figure 63 : moyennes de l’expression TNF- $\alpha$ dans le tube digestif.....	161
Figure 64 : moyennes de l’expression de l’IL-1 $\beta$ dans le tube digestif.....	162
Figure 65 : moyennes de l’expression de l’IL-10 dans le tube digestif.....	163
Figure 66 : dosage des ARNm dans les prélèvements des côlons transverses. ....	164
Figure 67 : dosage des ARNm dans les splénocytes.....	166
Figure 68 : corrélation entre l’expression des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$ et des ARNm codant pour NF $\kappa$ Bia dans les splénocytes. ....	167
Figure 69 : corrélation entre l’expression des ARNm codant pour le CD11b et des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$ dans les splénocytes. ....	168
Figure 70 : corrélation entre l’expression des ARNm codant pour le CD3 et des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$ dans les splénocytes. ....	169
Figure 71 : corrélation entre l’expression des ARNm codant pour Klr1A et des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$ dans les splénocytes. ....	169

# I. CONTEXTE

La neurostimulation vagale (NSV) est une technique employée en clinique pour le traitement de certaines formes d'épilepsie (depuis 1997) ou de dépression (depuis 2001) réfractaires aux traitements (Groves and Brown 2005; Mauguier 1996). Plus de 60000 patients ont été traités à ce jour. Pour ces objectifs thérapeutiques, la NSV est réalisée à haute fréquence (entre 20 et 30Hz) afin d'obtenir un effet au niveau du système nerveux central (SNC). Toutefois, dès le début des années 2000, l'équipe de Tracey a mis en évidence chez l'animal que la NSV pouvait également provoquer un effet anti-inflammatoire en périphérie (Borovikova et al. 2000b), notamment au niveau de l'appareil digestif. De plus, notre équipe a récemment démontré que la NSV basse fréquence (5Hz) effectuée de manière chronique pendant cinq jours sur un modèle de rat vigile atteint d'une colite expérimentale au TNBS permet une amélioration clinique significative (Meregnani et al. 2011). Dans ce modèle, les rats stimulés présentent une perte pondérale réduite, une tendance à la réduction des lésions intestinales et de l'expression de la myéloperoxydase au-dessus de la zone lésionnelle ainsi qu'une diminution significative de l'index global d'inflammation. Ces données expérimentales montrent l'intérêt d'activer la voie anti-inflammatoire cholinergique par NSV pour obtenir un effet anti-inflammatoire au niveau du tube digestif. Toutefois, le mécanisme d'action de la NSV basse fréquence n'est pas encore complètement élucidé. Il est reconnu que la NSV active la voie anti-inflammatoire cholinergique permettant alors la sécrétion d'acétylcholine aux terminaisons des efférences vagues (Blalock 2002 ; Tracey 2002 ; Wang et al. 2003). L'acétylcholine se fixe ensuite aux récepteurs  $\alpha 7$  nicotiques exprimés à la surface des macrophages et induit alors la diminution de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (telles que le TNF- $\alpha$ ) en inhibant la translocation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. La sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- $\beta$ ) n'est cependant pas inhibée (Parrish et al. 2008; Pavlov et al. 2007). Il a également été discuté que la NSV basse fréquence activerait principalement les efférences vagues pour provoquer l'effet anti-inflammatoire périphérique contrairement à la NSV haute fréquence qui activerait préférentiellement les afférences vagues (Pavlov et al. 2003). Toutefois, les effets anti-inflammatoires observés après NSV ne peuvent pas être expliqués uniquement par la voie d'action classique sur les macrophages. D'autres voies impliquant différents types cellulaires sont susceptibles d'être mises en œuvre. Récemment, il a été démontré que la rate joue un rôle primordial dans l'effet anti-inflammatoire cholinergique : la splénectomie inhibe la modulation de l'inflammation par la voie anti-inflammatoire cholinergique dans un modèle d'inflammation systémique (Huston et al. 2006).

L'objectif du travail présenté ici était de rechercher les mécanismes d'action centraux et périphériques de la NSV basse fréquence (5Hz). Cette étude a été réalisée, dans un premier temps, au niveau du système nerveux central par une étude d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle sur un modèle de rat ne présentant pas d'inflammation périphérique. Dans un



deuxième temps, l'étude a été menée au niveau immunologique et plus particulièrement sur les cellules immunitaires spléniques ainsi que sur des prélèvements de tissus coliques chez le rat sain puis chez un modèle de rat atteint d'une colite expérimentale (TNBS).

## II. INTRODUCTION GENERALE

## **1. La communication entre le système nerveux central et la périphérie**

Les neurosciences et l'immunologie se sont développées de manière indépendante pendant plusieurs années. Néanmoins, depuis environ trois décennies, de nombreuses études ont montré que des communications bidirectionnelles existent entre le système nerveux central (SNC) et le système immunitaire et qu'une modulation de la fonction immune est possible par le biais du SNC (Blalock 2002 ; Dantzer and Wollman 2003; Reichlin 1993). Dans les années 1970 - 1980`, le travail innovateur de Hugo Besedovsky et ses collègues a mis en évidence que les cytokines ainsi que les hormones étaient impliquées dans la communication entre le SNC et le système immunitaire. Lors de la réponse immunitaire`, ils ont démontré que celle-ci induisait une augmentation de la concentration en corticostéroïdes dans le plasma et exerçait une action inhibitrice sur les neurones noradrénergiques hypothalamiques (Besedovsky et al. 1983; Besedovsky et al. 1981). Les recherches ont par la suite continué sur des sujets interdisciplinaires concernant la communication neuro-immunitaire.

Cette « discussion » entre le SNC et le système immunitaire (Dantzer 1994) a pour fonction principale de maintenir un état d'homéostasie dans l'organisme. Deux voies relient le SNC au système immunitaire : le système humoral neuroendocrinien via l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et le système nerveux autonome (SNA).

### **1.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien**

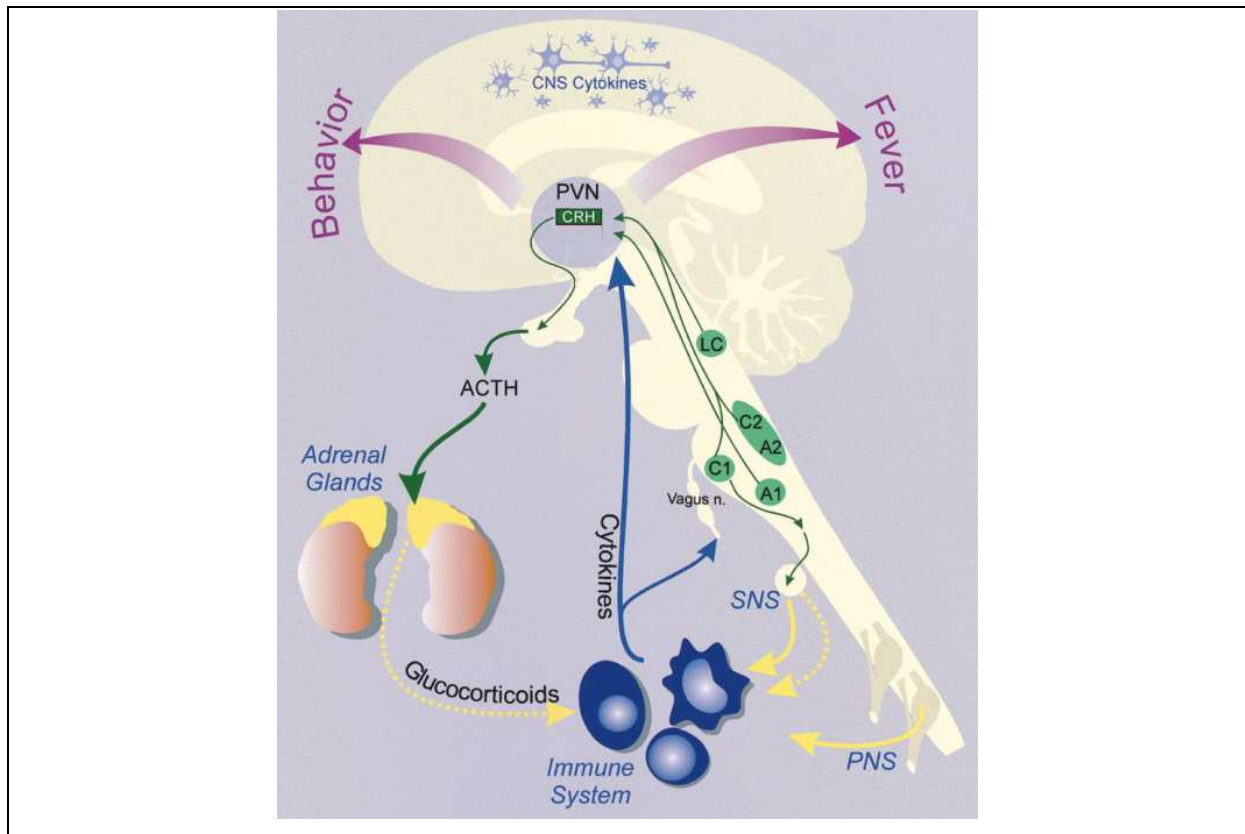
La boucle de régulation par laquelle la libération de glucocorticoïdes est réalisée se nomme l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Cet axe met en jeu différentes régions cérébrales telles que l'hypothalamus et des organes endocriniens tels que l'hypophyse et les glandes surrénales. Lorsqu'une réponse inflammatoire est déclenchée chez l'hôte, causée par exemple par le lipopolysaccharide (LPS : composé de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif), des cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées (TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et HMGB1 : high mobility group box 1) et vont avoir une action sur le SNC (Dantzer and Wollman 2003). En effet, les cytokines peuvent interagir avec celui-ci par diverses voies : en traversant directement la barrière hémato-encéphalique (Banks and Kastin 1997), via les afférences du nerf vague (Dantzer and Kelley 2007; Watkins et al. 1995b) ou par les organes circumventriculaires (Buller 2001). Il a été démontré que les neurones du SNC expriment des récepteurs spécifiques de cytokines qui sont impliqués dans l'induction de changements physiologiques et comportementaux (Blalock and Smith 2007; Tracey et al. 1990). Les cytokines peuvent également se lier à leurs récepteurs exprimés par les cellules endothéliales cérébrovasculaires et vont alors provoquer la libération d'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandines pour signaler la présence d'une inflammation en périphérie (Wong et al. 1996). En

réponse à la sécrétion de ces cytokines, certaines structures cérébrales comme l'hypothalamus modifient leur activité permettant d'activer la voie de réponse humorale anti-inflammatoire (Tracey 2002).

Les cellules du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (NPV) sécrètent une hormone, la corticotropin releasing hormone (CRH) également appelée corticolibérine, qui est ensuite véhiculée par le système porte jusqu'à l'hypophyse. A ce niveau, la CRH induit la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrophique (ACTH) dans la circulation sanguine qui va à son tour stimuler la synthèse et la sécrétion de glucocorticoïdes comme le cortisol par le cortex des glandes surrénales (figure 1).

La sécrétion de glucocorticoïdes va entraîner une réponse anti-inflammatoire en régulant l'expression de gènes impliqués dans la réponse pro-inflammatoire comme le facteur de transcription NF- $\kappa$ B responsable de la transcription de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6. De plus, grâce à l'inhibition de la phospholipase A2, les glucocorticoïdes diminuent également la production de facteurs chimiques de l'inflammation : prostaglandines, leucotriènes, sérotonine, histamine et enzymes lysosomiales.

Cette communication bidirectionnelle, dans laquelle les cytokines pro-inflammatoires signalent au SNC la présence d'une inflammation et déclenchent en réponse l'activation de l'axe HPA pour réguler le système immunitaire, forme la principale voie humorale de régulation de l'immunité (Irwin and Cole 2011; Sternberg 2006).



**Figure 1 : l'axe hypothalamo-hypophyséo-surrénalien et les autres interactions neuro-immunitaires** (d'après Sternberg 1997)). PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; CRH : corticolibérine ; ACTH : hormone adrénocorticotrophique ; SNS : système nerveux sympathique ; PNS : système nerveux périphérique ; LC : locus coeruleus (noyau noradrénergique ou A6) ; A1, A2 : noyaux noradrénergiques du tronc cérébral ; C1 et C2 : neurones adrénérgiques. Les flèches en pointillés indiquent un effet inhibiteur.

## 1.2 Le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome (SNA) aussi appelé système neuro-végétatif, régule les fonctions de tous les tissus et organes par l'intermédiaire de neurones moteurs innervant les viscères, les glandes exocrines et endocrines, ainsi que toutes les fibres musculaires lisses et le muscle cardiaque. De plus, il joue un rôle dans la transmission d'informations sur la sensibilité viscérale. Le SNA permet de faire le lien entre le SNC et le système nerveux entérique ou intrinsèque (SNI). Il existe également une innervation du SNA au niveau des organes lymphoïdes primaires (thymus et moelle osseuse) et secondaires (rate, ganglions lymphatiques, plaques de Peyer) du système immunitaire (SI), ce qui constitue un lien entre le SI et le SNC (Bellinger et al. 2006). Cette voie nerveuse complète la voie humorale relativement lente décrite précédemment.

Les centres qui contrôlent le SNA (ou le « central autonomic network » (Saper 2002)) se trouvent au niveau de l'hypothalamus et dans le tronc cérébral. Ces centres envoient des fibres autonomiques descendantes se terminant sur les neurones préganglionnaires du tronc cérébral et de la moelle. A leur tour, les fibres préganglionnaires se projettent hors du SNC pour former des

synapses avec des neurones postganglionnaires au niveau des ganglions autonomiques. Ces fibres postganglionnaires forment alors des réseaux terminaux dans les tissus cibles. Les ganglions correspondent à l'articulation synaptique des neurones connecteurs et effecteurs (Bonaz 2010; Elenkov et al. 2000).

Les nerfs des voies motrices du SNA transmettent les commandes motrices nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme ; les viscères acheminent des signaux au SNC par des voies sensibles. Le SNA est indépendant, c'est-à-dire que ses activités ne sont pas sous un contrôle conscient direct. Il est constitué de deux composants :

- le système nerveux sympathique (noradrénergique),
- le système nerveux parasympathique (cholinergique).

### **1.2.1 Le système nerveux sympathique (SNS)**

Le SNS est le composant du SNA le plus étendu et le plus diversifié physiologiquement, il possède des axones dans tout le corps. Il mobilise l'organisme dans les situations extrêmes (fuite, peur, exercice).

Le SNS comprend des neurones préganglionnaires, leurs corps cellulaires se trouvent au niveau de la moelle épinière dans la zone thoraco-lombaire (T5-L2) qui donnent naissance aux fibres efférentes préganglionnaires émergeant à travers les nerfs spinaux thoraco-lombaires (figure 2). Ces fibres préganglionnaires se terminent dans des ganglions végétatifs. Il existe deux chaînes ganglionnaires sympathiques : 1) le tronc sympathique vertébral : les ganglions sont placés de part et d'autre de la colonne vertébrale et répartis en une série de ganglions étagés (sympathique cervical, thoracique, lombaire et sacré) reliés par des rameaux interganglionnaires ; 2) la chaîne préviscérale : installée de part et d'autre de l'aorte abdominale à l'intérieur d'un plexus nerveux dense et reliée au tronc sympathique paravertébral par les nerfs splanchniques. Plusieurs groupes de ganglions peuvent être distingués : le groupe ganglionnaire supérieur (ganglions coeliaques), les ganglions mésentériques et les plexus hypogastriques.

Le neurotransmetteur des fibres préganglionnaires est l'acétylcholine. A partir de ces ganglions, les fibres postganglionnaires innervent les tissus cibles. Ces fibres sont noradrénergiques, elles sécrètent des catécholamines comme la noradrénaline (norépinéphrine) et l'adrénaline (épinéphrine). Ces neuromédiateurs se lient aux récepteurs adrénergiques ( $\alpha$ 1-2,  $\beta$ 1-3).

Le SNS a pour fonction principale le maintien de l'homéostasie de base et d'assumer la dépense en énergie de l'organisme (Elenkov et al. 2000). En effet, au repos, les catécholamines régulent la fréquence cardiaque, le tonus des vaisseaux sanguins et la thermogénèse. Lorsqu'un

stress vient perturber l'homéostasie de base, le SNS est activé résultant en l'augmentation de la sécrétion de catécholamines et permettant alors à l'organisme d'induire la réponse «de fuite ou de lutte». En effet, cette augmentation en catécholamines va dilater les pupilles, augmenter la transpiration, accélérer les activités cardiaque et respiratoire, augmenter la tension artérielle et au contraire inhiber l'activité du tube digestif par action directe sur le muscle lisse et par inhibition de la voie parasympathique excitatrice.

Les fibres sympathiques innervant le système nerveux intrinsèque (SNI) sont majoritairement issues des nerfs hypogastriques et splanchniques. Ces fibres innervent les ganglions hypogastriques et mésentériques (à distance de la paroi digestive). Les nerfs splanchniques donnent la sensibilité à l'œsophage inférieur, à l'estomac et aux intestins ; le côlon est innervé par les nerfs coliques lombaires et les nerfs hypogastriques.

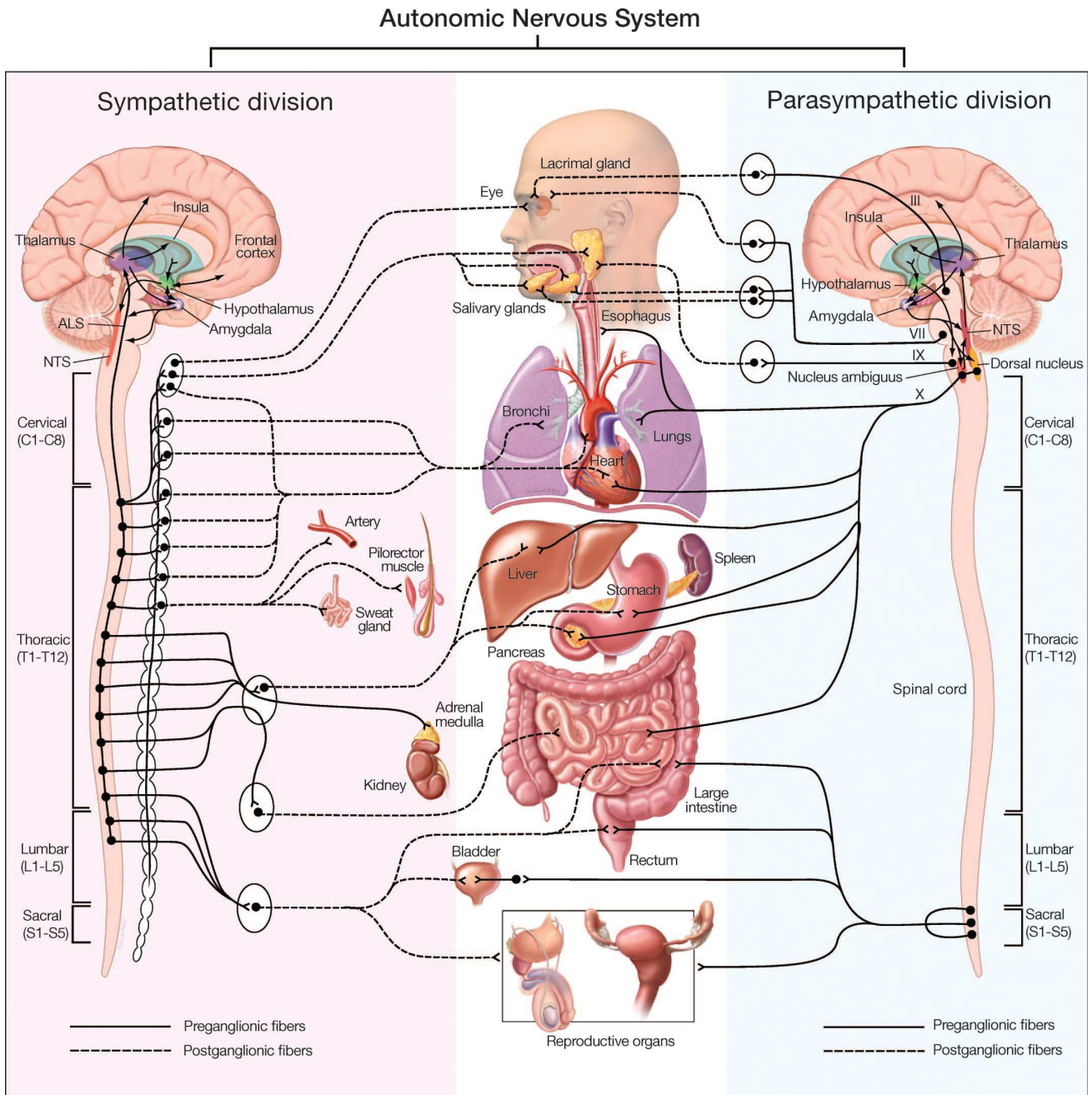
### **1.2.2 Le système nerveux parasympathique (SNAp)**

Le SNAp, deuxième composant du SNA, a des fonctions généralement antagonistes au SNS. En effet, il permet à l'organisme de se détendre et de réduire la consommation d'énergie tout en accomplissant les tâches vitales comme la digestion ; il se manifeste surtout dans les situations neutres.

De nombreux organes comme le cœur ou le tractus digestif sont innervés par le système sympathique et le système parasympathique. En période de repos, le système parasympathique est activé et va avoir une fonction inhibitrice au niveau cardiovasculaire ainsi qu'une fonction excitatrice et motrice au niveau du tube digestif.

Les fibres nerveuses parasympathiques émergent de la région sacrée de la moelle épinière et du tronc cérébral (à partir des noyaux étagés du parasympathique crânien dont fait partie le noyau cardio-pneumo-entérique à l'origine du nerf vague ; ces noyaux sont en relation avec l'hypothalamus) à travers quatre paires de nerfs crâniens : les nerfs faciaux (VII), oculo-moteurs (III), glossopharyngiens (IX) et vagues (X) (figure 2). Les fibres préganglionnaires sont longues, elles s'étendent du SNC aux structures qu'elles innervent où elles font synapses avec des neurones postganglionnaires situés dans les ganglions, pour la majorité, dans les organes viscéraux ou très proches (Lane et al. 2009). Toutes les fibres nerveuses du parasympathique sécrètent de l'acétylcholine (ACh).

Les nerfs vagues innervent la plus grande partie du tube digestif (de l'œsophage supérieur jusqu'à l'angle colique gauche (classiquement décrit), toutefois, pour certains la totalité du tube digestif pourrait être innervé par le NV). D'autre part les nerfs pelviens innervent la partie basse du tube digestif : côlon, rectum et anus (Powley and Phillips 2002 ; Ratcliffe et al. 2011).



**Figure 2 : l'organisation de l'innervation du système nerveux sympathique et parasympathique (d'après (Lane et al. 2009)).** ALS : système antérolatéral ; NTS : noyau du tractus solitaire ; les chiffres romains représentent les nerfs crâniens (III : nerfs oculo-moteurs, VII : nerfs faciaux, IX : nerfs glossopharyngiens, X : nerf vague).

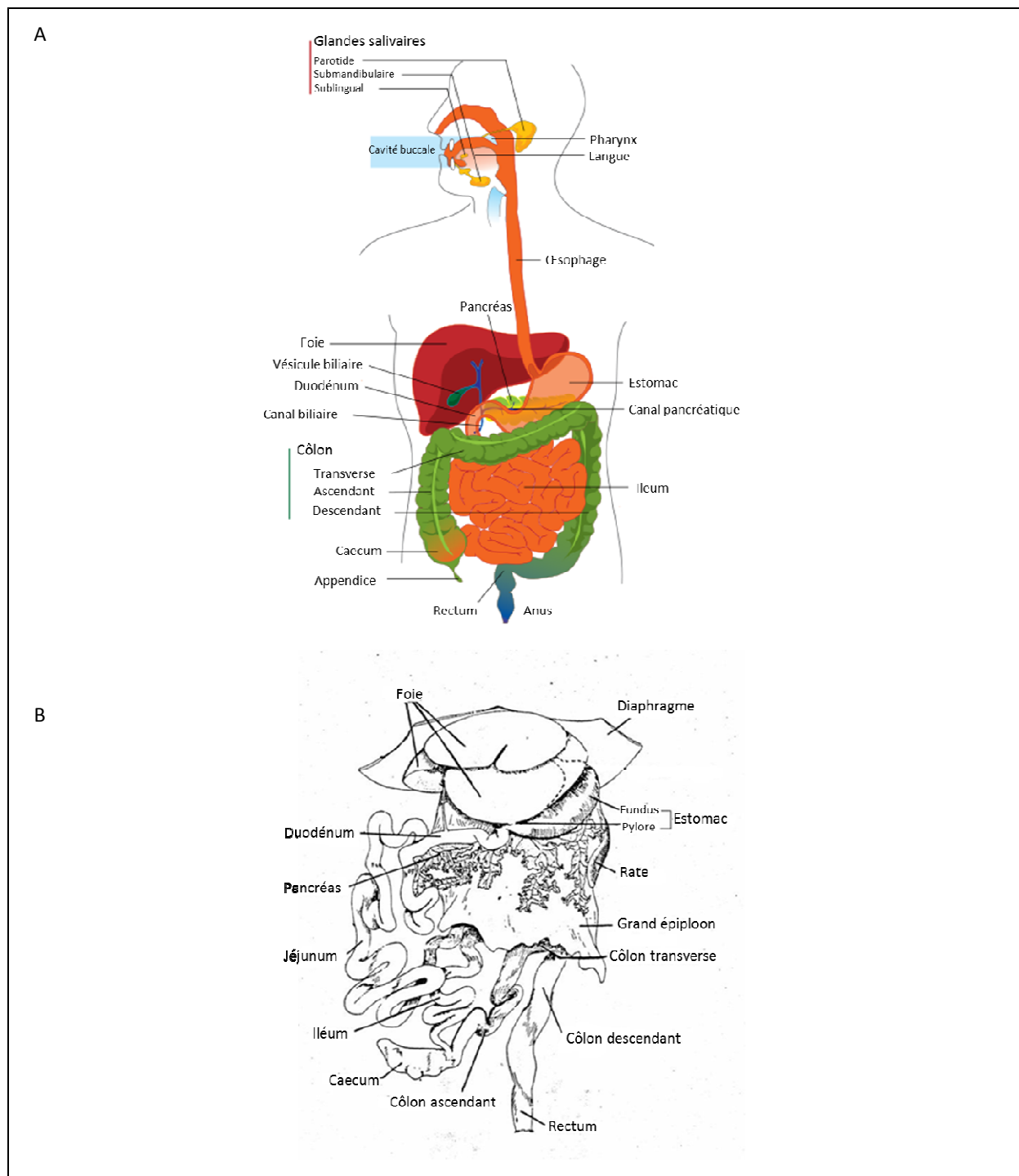


### **1.3 Le système nerveux intrinsèque (SNI)**

Le système nerveux intrinsèque (SNI), également surnommé « le deuxième cerveau », contrôle le système digestif.

#### ***1.3.1 Anatomie du tube digestif (TD)***

Le tube digestif est formé d'un long tube musculéux continu qui s'étend de la cavité orale à l'anus. Les organes du tube digestif comprennent les glandes digestives (les glandes salivaires, le foie, la rate, le pancréas), la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin qui se termine par l'anus. Il mesure environ 9 m de long chez l'Homme et présente de grandes homologues avec le tube digestif du rat (figure 3).



**Figure 3 : schéma du tube digestif. A : tube digestif de l'Homme, B : tube digestif du rat.**

La structure de base de la paroi du tube digestif se compose de quatre couches : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (figure 4).

- La muqueuse est la couche la plus interne, elle est en contact avec les aliments présents dans la lumière intestinale, c'est une zone d'interface entre le milieu intérieur et les agents extérieurs. Elle est constituée de cellules épithéliales, reposant sur du tissu conjonctif, et une couche de cellules musculaires lisses. Ses principales fonctions sont la protection contre les maladies

infectieuses, la sécrétion de mucus, d'hormones et d'enzymes digestives, et l'absorption des produits de la digestion dans le sang.

- La sous-muqueuse, à l'extérieur de la muqueuse, est un tissu conjonctif. Elle renferme des follicules lymphatiques, des vaisseaux sanguins et lymphatiques, et des neurofibres. Ces neurofibres constituent le réseau nerveux du plexus sous-muqueux entérique ou plexus de Meissner.

- La musculuse est composée de fibres musculaires lisses réparties en une couche musculuse circulaire interne et longitudinale externe. Elle est responsable du péristaltisme. Entre les couches de muscle lisse circulaire et longitudinale se trouve le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach.

- La séreuse est la couche la plus externe formant le péritoine viscéral.

### **1.3.2 Immunité intestinale**

La muqueuse du TD est en contact direct avec les agents extérieurs via la lumière intestinale et représente un site d'entrée majeur pour beaucoup de pathogènes. Il est donc important que l'immunité soit régulée de manière à garder un bon équilibre, c'est-à-dire que l'organisme fasse la différence entre les bactéries commensales de la flore intestinale et les bactéries pathogènes. Pour cela, les informations concernant le contenu luminal et l'état de la muqueuse doit être rapporté rapidement au SNC. C'est le SNI qui joue ce rôle par l'intermédiaire des fibres sympathiques et parasympathiques provenant du SNC.

Le SNI est composé de neurones sensoriels, d'interneurones, et de neurones sécréto-moteurs. Il contrôle la sécrétion glandulaire, l'activité péristaltique et le transport d'eau et d'ions. Il comporte autant de neurones que la moelle épinière (Young 2005).

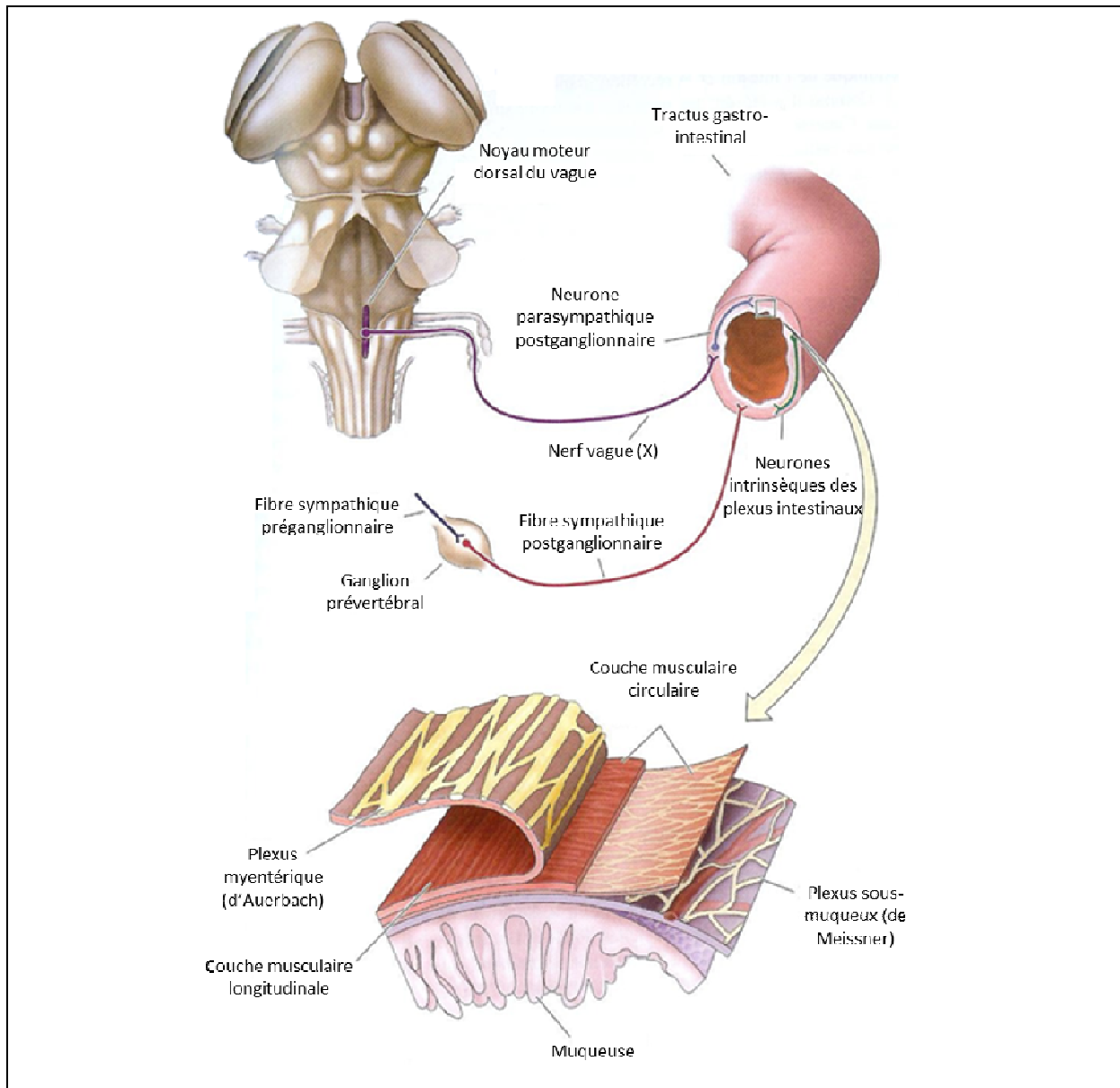
Le SNI est installé dans la paroi du tube digestif et est organisé en deux plexus nerveux qui s'étendent sur toute la longueur du tube digestif :

- le plexus sous-muqueux de Meissner, innervant la muqueuse et les glandes sécrétrices,
- le plexus myentérique d'Auerbach, situé entre les deux couches de la musculuse, innervant les muscles lisses circulaires afin de contrôler la motricité intestinale (figure 4).

Le SNI fonctionne de manière indépendante des autres centres nerveux. Néanmoins, il est relié au SNC par le biais du nerf vague et des fibres sympathiques. Les neuromédiateurs et leurs récepteurs retrouvés au sein du SNI sont nombreux et similaires à ceux retrouvés au niveau du SNC (acétylcholine, sérotonine, GABA, noradrénaline...)

De plus, la muqueuse intestinale possède des groupes de cellules lymphoïdes appelés MALT (tissu lymphoïde associé aux muqueuses) ou plus exactement GALT (tissu lymphoïde associé à l'intestin). Un grand nombre de ces follicules lymphoïdes se trouvent dans la lamina propria

intestinale avec des lymphocytes B, des lymphocytes T helper, des plasmocytes et des macrophages. La couche sous-muqueuse, sous la lamina propria, contient des plaques de Peyer qui sont des nodules constitués de follicules lymphoïdes.



**Figure 4 : le système nerveux intrinsèque** (d'après Neurosciences de Purves, Augustine, Fitzpatrick, Hall, Lamantia, McNamara, Williams, 3<sup>e</sup> édition).

## 2. Le nerf vague

### 2.1 Anatomie du nerf vague

Le nerf vague (NV) ou nerf pneumogastrique est la dixième paire de nerfs crâniens (X). C'est le nerf principal du système nerveux parasympathique et le plus long; il a un rôle moteur (motricité intestinale, activité cardiaque), sensitif et sensoriel. D'un point de vue fonctionnel, c'est un nerf mixte composé de 80% de fibres afférentes et de 20% de fibres efférentes (George et al. 2000 ; Groves and Brown 2005). Il est constitué de fibres non myélinisées (majorité environ 84% des fibres totales) et myélinisées (environ 16% des fibres totales) (Agostoni et al. 1957) réparties à l'intérieur du nerf. Les fibres myélinisées sont réparties en trois types : A, B et C. Elles diffèrent de par leurs diamètres et leurs seuil de recrutement lors de stimulations du NV (intensité de stimulation) (tableau 1) (Agostoni et al. 1957 ; Groves and Brown 2005). La majorité des fibres myélinisées du X sont des fibres de type C.

Le NV assure l'innervation de tous les viscères (Lane et al. 2009), d'une grande partie du TD chez l'Homme et de la totalité du TD chez le rat (Altschuler et al. 1993). L'anatomie du NV chez le rat présente une grande homologie avec celle de l'Homme avec seulement quelques différences au niveau de la position de certains ganglions.

	Fibres A	Fibres B	Fibres C
Diamètre (µm)	5-20	6-12	<3
Myélinisées	Oui	Oui	Oui
Seuil de recrutement (mA)	0,02-0,2	0,04-0,6	2,0 +
Ordre de recrutement	1	2	3
Effet de la NSV sur EEG	Synchronisation	Synchronisation	Désynchronisation

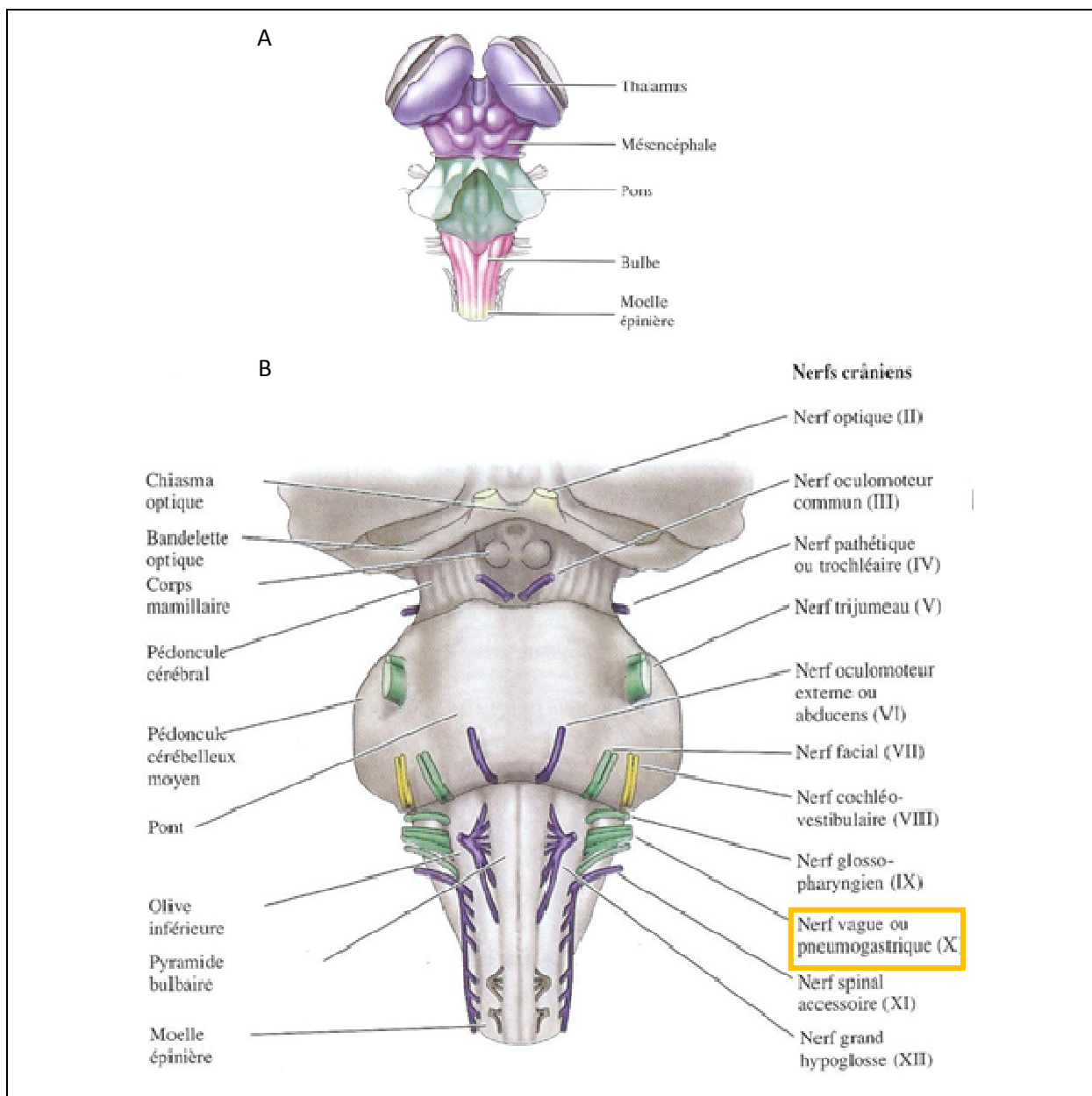
Tableau 1 : caractéristiques de fibres myélinisées du NV (d'après (Groves and Brown 2005)).

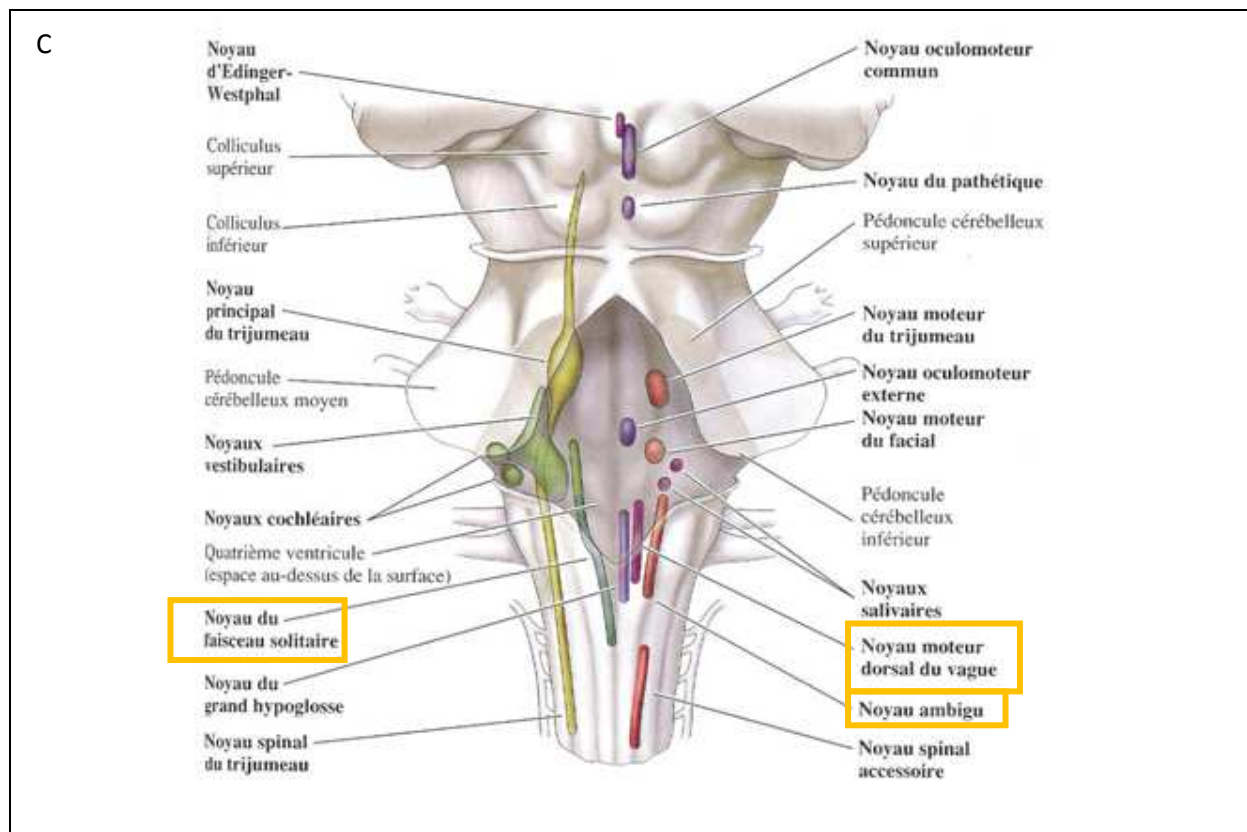
#### 2.1.1 Origine du nerf vague

Son origine est située dans le tronc cérébral (figure 5) au niveau de plusieurs noyaux :

- le noyau du tractus solitaire (NTS), centre sensoriel, contenant les fibres viscéro-afférentes de l'ensemble du territoire parasympathique du NV. Il est le centre de convergence des afférences vagues qui amènent les informations d'origine périphérique,
- le noyau ambigu, centre moteur du NV partagé avec le nerf glossopharyngien (IX), contenant des fibres motrices pour les muscles constricteurs du pharynx, de l'œsophage et du larynx,

- le noyau moteur dorsal du vague (NMDV) (ou cardio-pneumo entérique), principale source de fibres efférentes parasympathiques du tronc cérébral, fournit essentiellement une innervation glandulaire (pharynx, larynx, organes thoraciques et abdominaux). Les neurones parasympathiques innervant les voies respiratoires, le cœur et le TD ont pour origine le NMDV. Avec le NTS et l'area postrema (AP), le NMDV forment le complexe vagal dorsal (CVD),
- les fibres du X émergent au niveau du sillon collatéral postérieur du bulbe, entre le nerf glossopharyngien (IX) au-dessus, et le nerf spinal (XI) au-dessous.

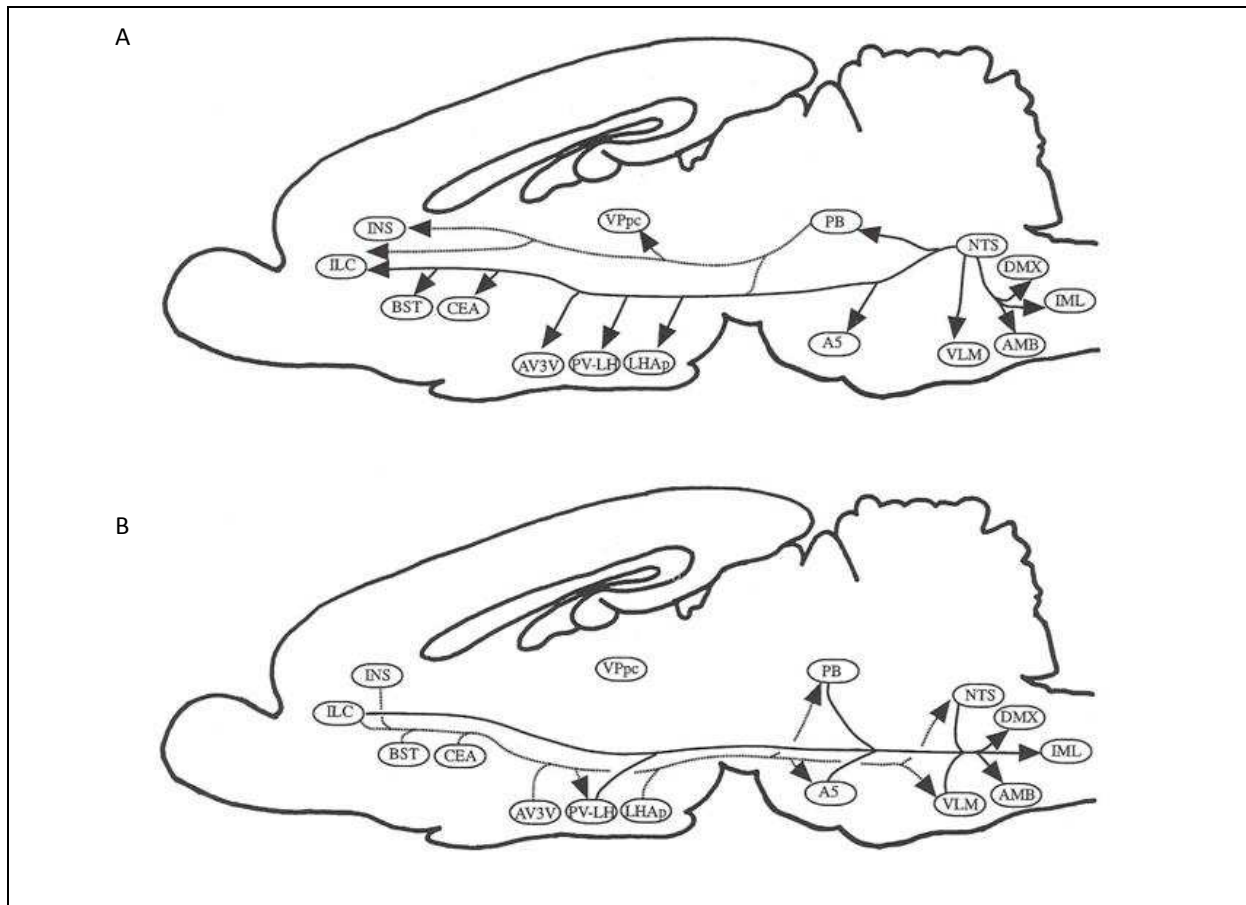




**Figure 5 : le tronc cérébral.** A : vue dorsale des principales subdivisions du tronc cérébral. B : vue ventrale du tronc cérébral montrant l'emplacement des nerfs crâniens. Code couleur : jaune : nerfs crâniens sensitifs ; bleu : nerfs crâniens moteurs ; vert : nerfs crâniens mixtes (sensitifs et moteurs). C : vue dorsale du bulbe par transparence montrant la position des noyaux des nerfs crâniens. Code couleur : jaune : sensibilité générale ; vert clair : sensibilité spéciale ; vert foncé : sensibilité viscérale ; violet : motricité somatique ; rose : motricité viscérale ; orange : motricité branchiale (d'après Neurosciences Purves, Augustine, Fitzpatrick. Hall, Lamantia, McNamara, Williams. 3ème édition. De boeck).

### 2.1.2 Projections des noyaux du nerf vague

Le NTS et l'AP sont les centres majeurs d'entrée des afférences vagales au niveau du SNC. Le NTS envoie des influx nerveux en direction du NMDV qui lui-même en reçoit de régions cérébrales plus éloignées comme le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (NPV) (Groves and Brown 2005). Le NTS a d'autres projections secondaires dirigées sur le NPV, le noyau ambigu, et le noyau parabrachial (NPB) (figure 6). Le nerf vague projette sur le NTS majoritairement et sur le NMDV, le noyau du trigéminal, l'AP et la formation réticulée. Ensuite le NTS projette sur le NPB, la substance grise périaqueducale, le vermis et la partie inférieure du cervelet, le locus coeruleus, le noyau du raphé ainsi que d'autres noyaux du complexe dorsal médullaire. Le NPB, projette alors sur le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe, l'amygdale, l'insula antérieure, et le cortex préfrontal latéral (Beekwilder and Beems 2010).



**Figure 6 : représentation schématique des projections centrales des afférences vagales chez le rat** (d'après *The Rat Nervous System*, second edition, edited by George Paxinos) (A) à partir du NTS chez le rat et des efférences vagales (B). Abréviations : NTS : noyau du tractus solitaire ; PB : noyau parabrachial ; VPpc : noyau ventropostérieur parvocellulaire de l'hypothalamus ; INS : cortex insulaire ; ILC : cortex infra limbique ; PV-LH : groupes cellulaires tubérales hypothalamiques (incluant les noyaux paraventriculaires et dorsomédians) ; A5 : groupes cellulaires noradrénergiques ; AMB : noyau ambigu ; AV3V : aire antéroventrale du troisième ventricule ; BST : noyau des stria terminalis ; CEA : noyau central de l'amygdale ; DMX : noyau dorsal moteur du vague ; IML : colonne intermédiaire latérale de cellules ; LHAp : aire latérale postérieure hypothalamique ; VLM : bulbe ventrolatéral.

### 2.1.3 Trajet du nerf vague

Le NV quitte le crâne par le foramen jugulaire (trou déchiré postérieur) avec le nerf glossopharyngien (IX) et le nerf accessoire (XI) ; il présente 2 renflements :

- le ganglion supérieur (ou ganglion jugulaire) situé au niveau du foramen jugulaire ; il contient les corps cellulaires de la sensibilité générale,
- le ganglion inférieur (ou ganglion plexiforme) : situé en dessous du ganglion supérieur, il est le siège des corps cellulaires des fibres viscérales et gustatives.

Le nerf vague chemine ensuite dans la région du cou, entre l'artère carotide et la veine jugulaire (figure 7). Sa première branche, le nerf laryngé supérieur, prend naissance à ce niveau et va innover le larynx. Le NV continue vers l'ouverture supérieure du thorax, passe dans le médiastin ; le NV



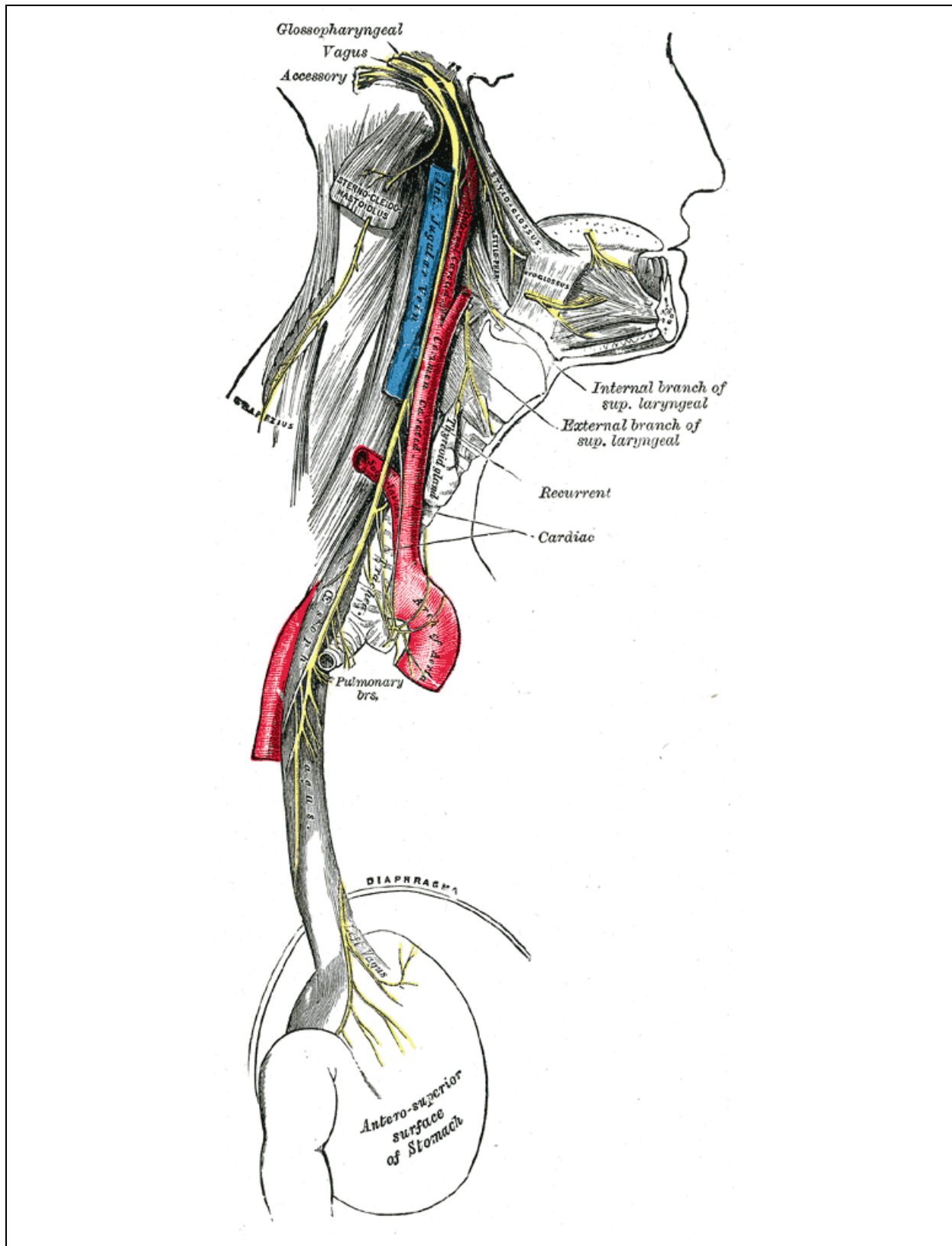
gauche part en direction de la crosse de l'aorte tandis que le NV droit va en direction de la trachée. Les NV gauche et droit émettent au cours de leur trajet thoracique des ramifications vers différents plexus :

- plexus cardiaque pour l'innervation parasympathique du cœur,
- plexus pulmonaires qui desservent poumons et bronches.

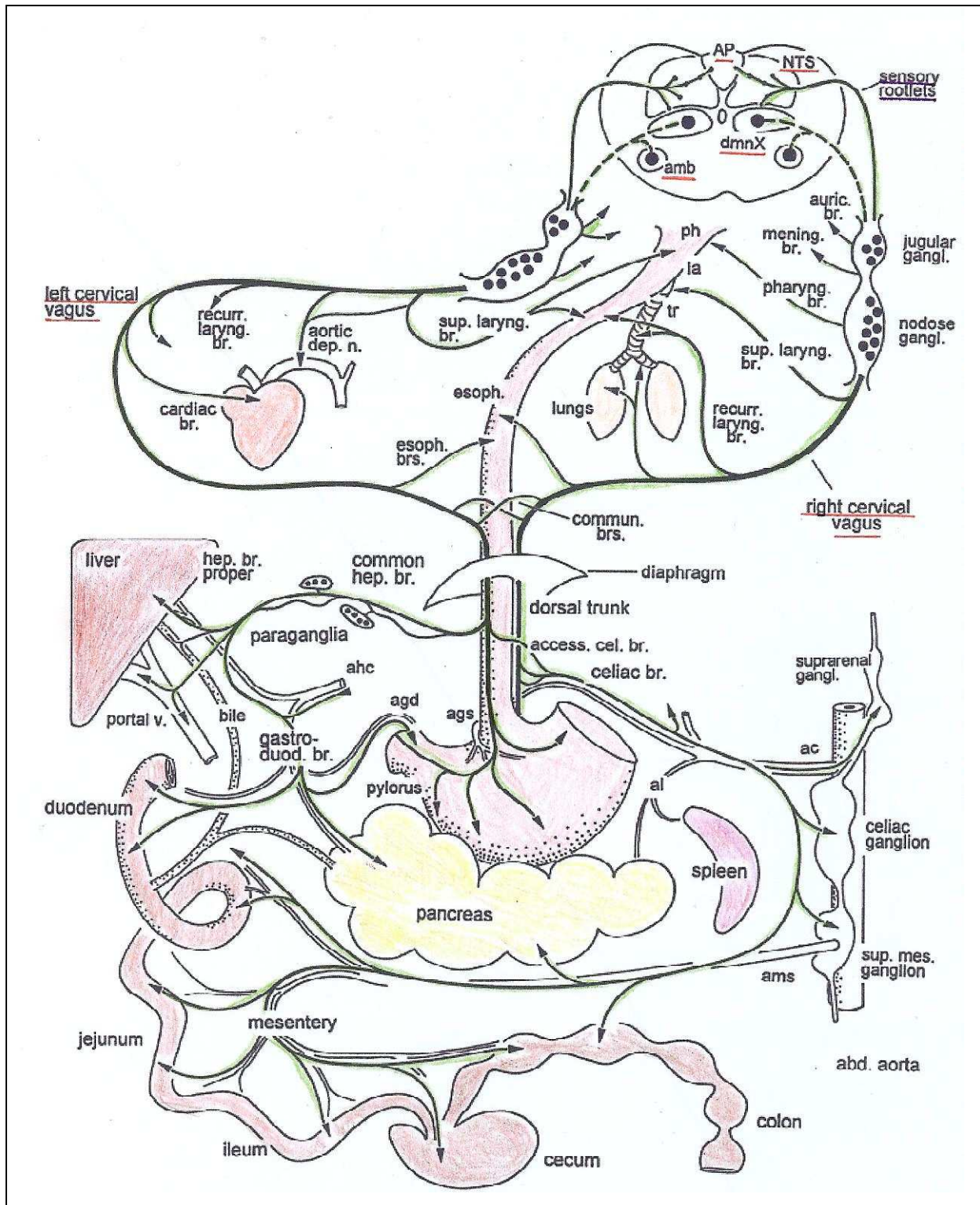
Au niveau de l'œsophage, les fibres se réunissent pour former le plexus œsophagien d'où émerge le tronc vagal antérieur (provenant majoritairement du X gauche), et le tronc vagal postérieur (provenant essentiellement du X droit).

Ces ramifications passent dans le diaphragme pour arriver dans l'abdomen où les neurofibres sont distribuées sous forme de différents plexus afin d'innover le foie, l'estomac et l'ensemble des viscères :

- plexus cœliaque (solaire) : fibres à destination de l'estomac, du foie et de la rate,
- plexus mésentérique supérieur : fibres à destination de l'intestin grêle, du côlon, du caecum et du pancréas,
- plexus hypogastrique : fibres à destination du côlon, de la vessie, des organes génitaux et du rectum (figure 8).



**Figure 7 : parcours du nerf vague** (d'après Gray, Henry. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918).



**Figure 8 : représentation schématique du territoire d'innervation du nerf vague en périphérie** (d'après (Berthoud and Neuhuber 2000)). Abréviations de la périphérie : ac : artère coeliaque ; agd : artère droite gastrique ; ags : artère gauche gastrique ; ahc : artère hépatique commune ; al : artère splénique ; ams : artère mésentérique supérieure ; la : larynx ; ph : pharynx ; tr : trachée.

## 2.2 Les fonctions physiologiques du nerf vague

Le NV possède différentes fonctions : il est sensitif, moteur, végétatif et anti-inflammatoire. Il exerce son rôle moteur sur de nombreux organes grâce à ses efférences : le palais, le pharynx, le larynx, la trachée, les bronches, les poumons, le cœur, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon (Berthoud and Neuhuber 2000).

Le NV innerve le cœur selon deux modalités (Randall and Ardell 1985) : le NV droit innerve le cœur au niveau du nœud sinusal ou nœud de Keith et Flack, centre de l'automatisme cardiaque situé dans l'oreillette droite ; le NV gauche innerve le nœud atrioventriculaire d'Aschoff-Tawara jouant un rôle dans la force de contraction du muscle cardiaque, situé dans le septum (figure 9). Le NV avec le système sympathique permet de réguler la fréquence cardiaque, la force de contractilité et la tension artérielle (Ordelman et al. 2010).

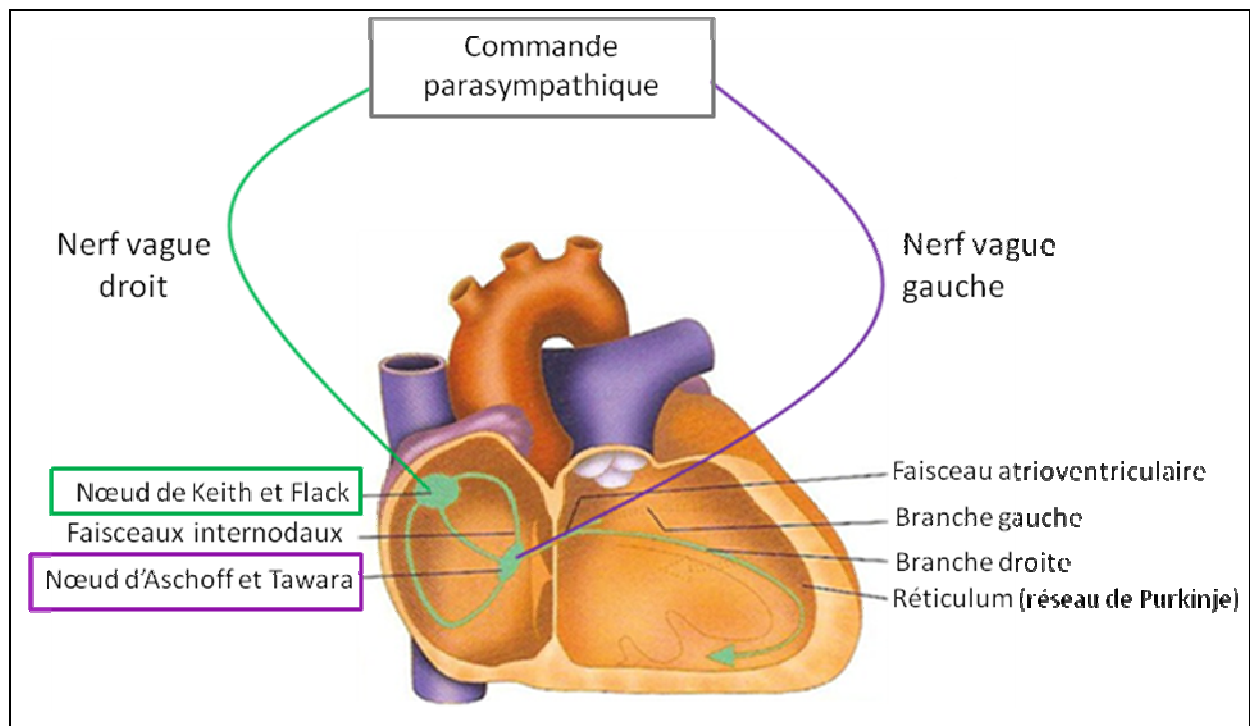


Figure 9 : innervation parasympathique du cœur.

Concernant l'appareil cardio-vasculaire, le nerf vague a une fonction viscéro-sensible, les fibres provenant des parois carotidiennes et aortiques permettent les réflexes végétatifs d'adaptation du rythme cardiaque et de la tension artérielle.

Au niveau du tube digestif, le NV contrôle l'activité sécrétrice gastrique et biliaire. Il a un effet exciteur en provoquant une augmentation de la sécrétion gastrique ainsi que du péristaltisme.

Le NV a également un rôle dans la phonation (par le nerf récurrent), dans la déglutition (par les branches pharyngées) et dans la respiration (fibres broncho-motrices).

Les afférences vagues permettent le transport des informations sensibles, également des impressions gustatives de la base de la langue (Hofer et al. 1996) et de la sensibilité de la peau de la région rétro-auriculaire. Au niveau du tube digestif, les afférences véhiculent l'ensemble des informations concernant le volume du contenu luminal digestif ainsi que la température. Les informations relatives à la douleur ne sont théoriquement pas véhiculées par le NV mais plutôt par le système sympathique.

### **2.3 Le nerf vague et l'inflammation**

Le NV joue un rôle important dans le contrôle de l'inflammation. Il constitue «l'arc de contrôle réflexe de l'immunité» (Tracey 2009). Cet arc réflexe de l'immunité est composé des afférences sensorielles du NV qui détectent la présence de molécules produites pendant une infection ou une inflammation et qui transmettent l'information au SNC. En réponse, les efférences motrices du NV transmettent le signal de modulation de la réponse immunitaire en périphérie. Dans le cadre de l'inflammation, le rôle du NV est double (Bonaz 2007 ; Pavlov and Tracey 2005 ; Tracey 2007 ; Ulloa 2005) :

- informer le système nerveux central d'une inflammation périphérique par ses afférences,
- moduler l'inflammation par ses efférences.

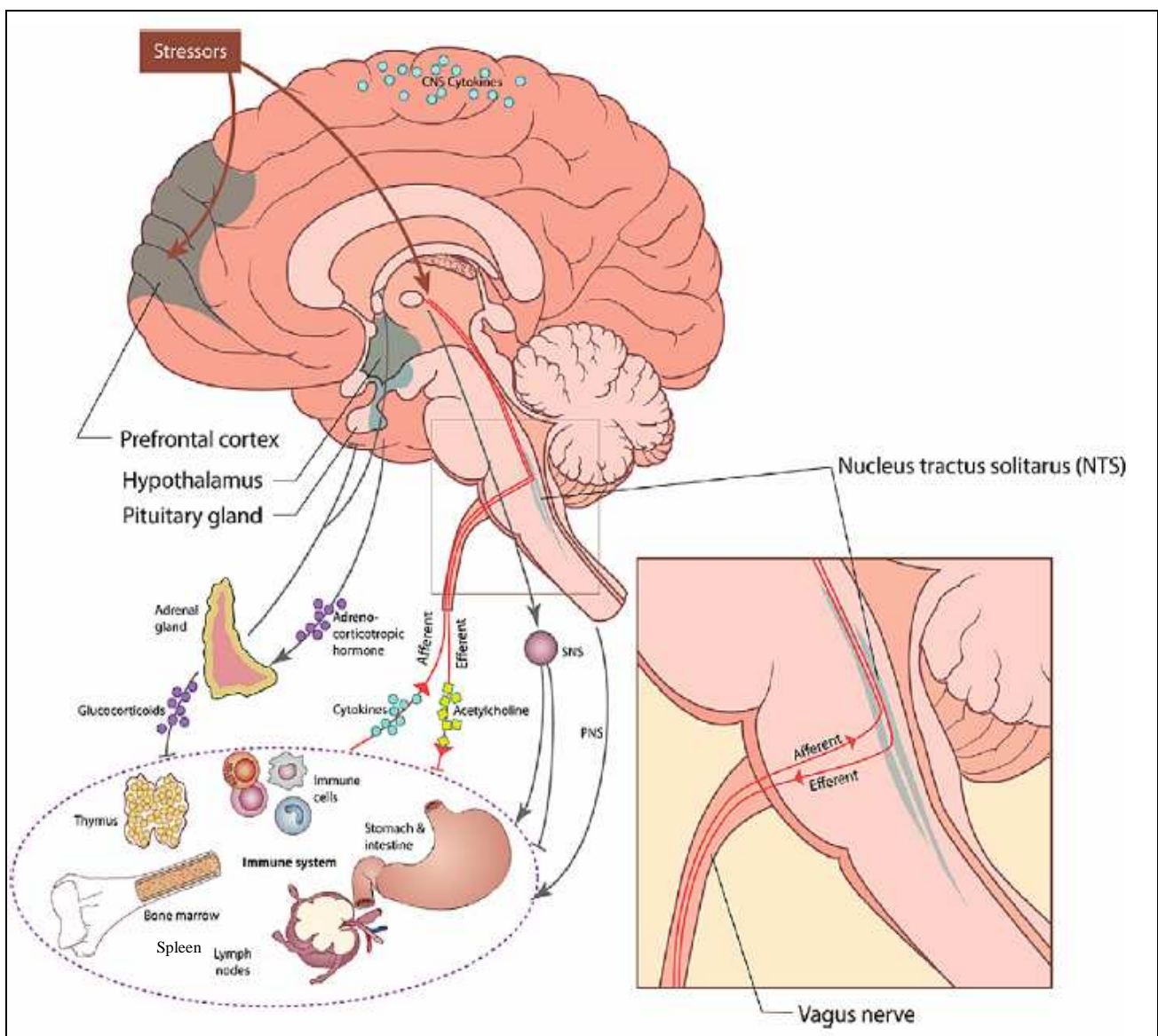
#### **2.3.1 La fonction des afférences vagues**

Les afférences vagues expriment des récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) leur permettant de détecter la présence d'une inflammation et de transmettre l'information provenant de l'abdomen au SNC sous forme de potentiels d'action. L'information est véhiculée à l'hypothalamus qui va alors activer des circuits neuronaux afin de répondre à ce message. Des études de vagotomies ont permis de mettre en évidence le rôle primordial des afférences vagues dans le relais de l'information de la présence d'une inflammation en périphérie au SNC (Hansen et al. 2001; Watkins et al. 1995a).

La stimulation des TLRs (*Toll Like Receptors*) à la surface des cellules immunitaires par des PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou DAMPs (*Disease-Associated Molecular Patterns*) induit l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ceci active les



afférences vagales qui vont à leur tour alerter le SNC de la présence de l'infection ou de l'inflammation. Dès lors, des circuits neuronaux visant à moduler l'inflammation vont être activés. Une première voie anti-inflammatoire peut être activée : l'axe HPA induisant une sécrétion accrue de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. Les afférences vagales projettent l'information d'origine périphérique sur le NTS, puis du NTS sur le NPV de l'hypothalamus permettant la libération de CRF hypothalamique (principal médiateur du stress) et va ainsi favoriser la libération de glucocorticoïdes afin d'atténuer la réponse inflammatoire périphérique. En effet, il a été démontré que la vagotomie sous-diaphragmatique inhibe la stimulation de l'axe HPA (Gaykema et al. 1995). Une deuxième voie peut être activée : la voie anti-inflammatoire cholinergique (figure 10).



**Figure 10 : les différentes connexions et systèmes de régulation entre le SNC et le système immunitaire** (d'après (Thayer and Sternberg 2010) : le nerf vague, l'axe hypothalamo-hypophyséo-surrénalien (HPA), le système nerveux sympathique (SNS) et le système nerveux périphérique (PNS).

### 2.3.2 La voie anti-inflammatoire cholinergique et les efférences vagales

Cette voie, aux propriétés anti-inflammatoires, a été découverte au début des années 2000 par le groupe de Tracey (Borovikova et al. 2000b), repose sur l'activation des efférences vagales (Pavlov et al. 2003) et la sécrétion d'acétylcholine (ACh). Cette voie est complémentaire de l'axe corticotrope qui est la voie classique connue. Elle est activée lorsque l'information de la présence d'une inflammation est transmise par les afférences vagales au NTS dans le SNC. En réponse, des potentiels d'action sont transmis à la périphérie induisant la sécrétion d'ACh par les efférences vagales. Celle-ci va interagir avec les cellules immunitaires, notamment les macrophages, dans les organes lymphoïdes ou directement au niveau du site de l'inflammation. Ces cellules immunitaires sécrétrices de cytokines expriment des récepteurs à l'ACh à leur surface et plus précisément le récepteur  $\alpha 7$  nicotinique. En effet, la liaison de l'ACh sur le récepteur  $\alpha 7$  nicotinique induit l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*) responsable de la transcription de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) (van der Zanden et al. 2009). Un effet anti-inflammatoire périphérique est alors obtenu (figure 11).

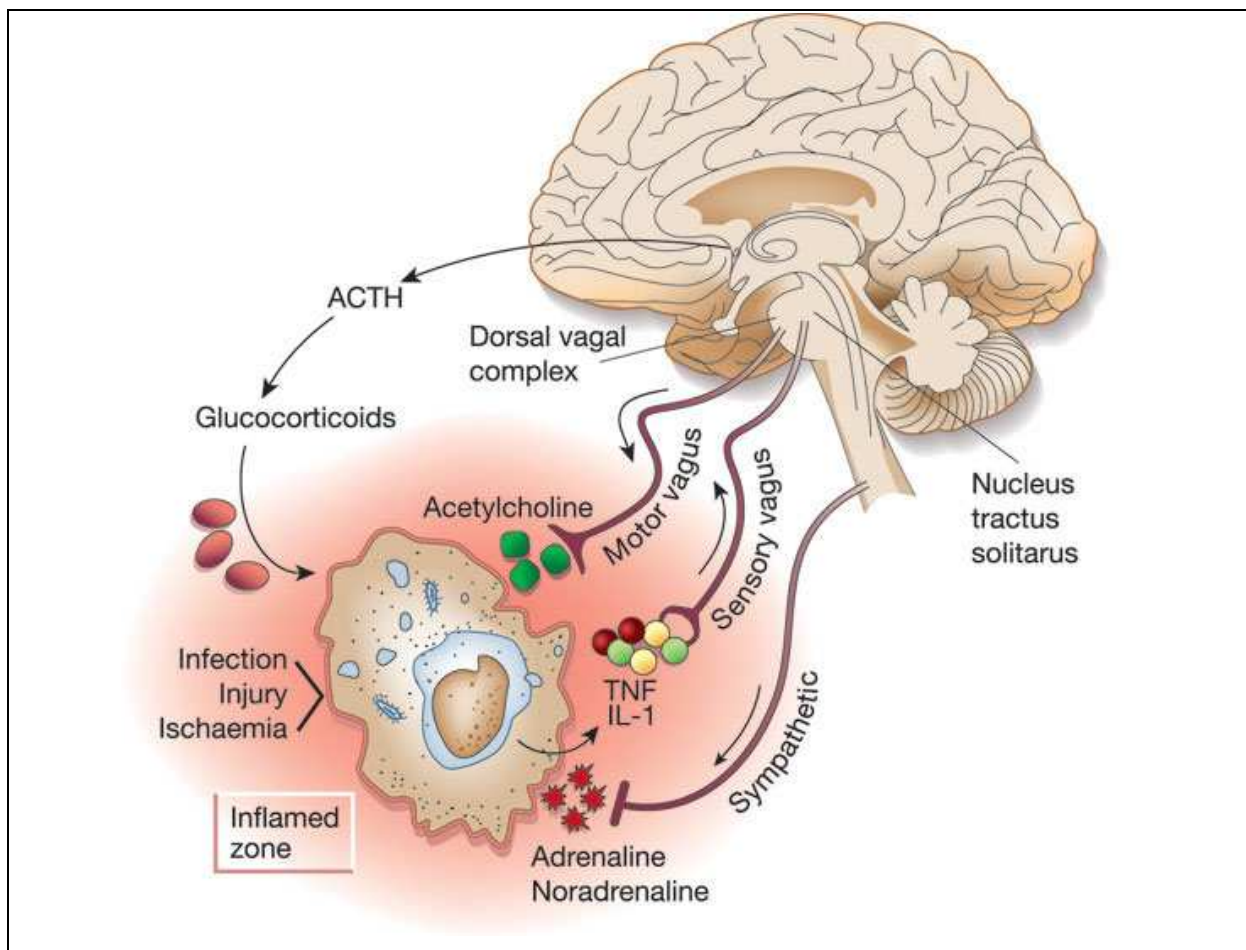
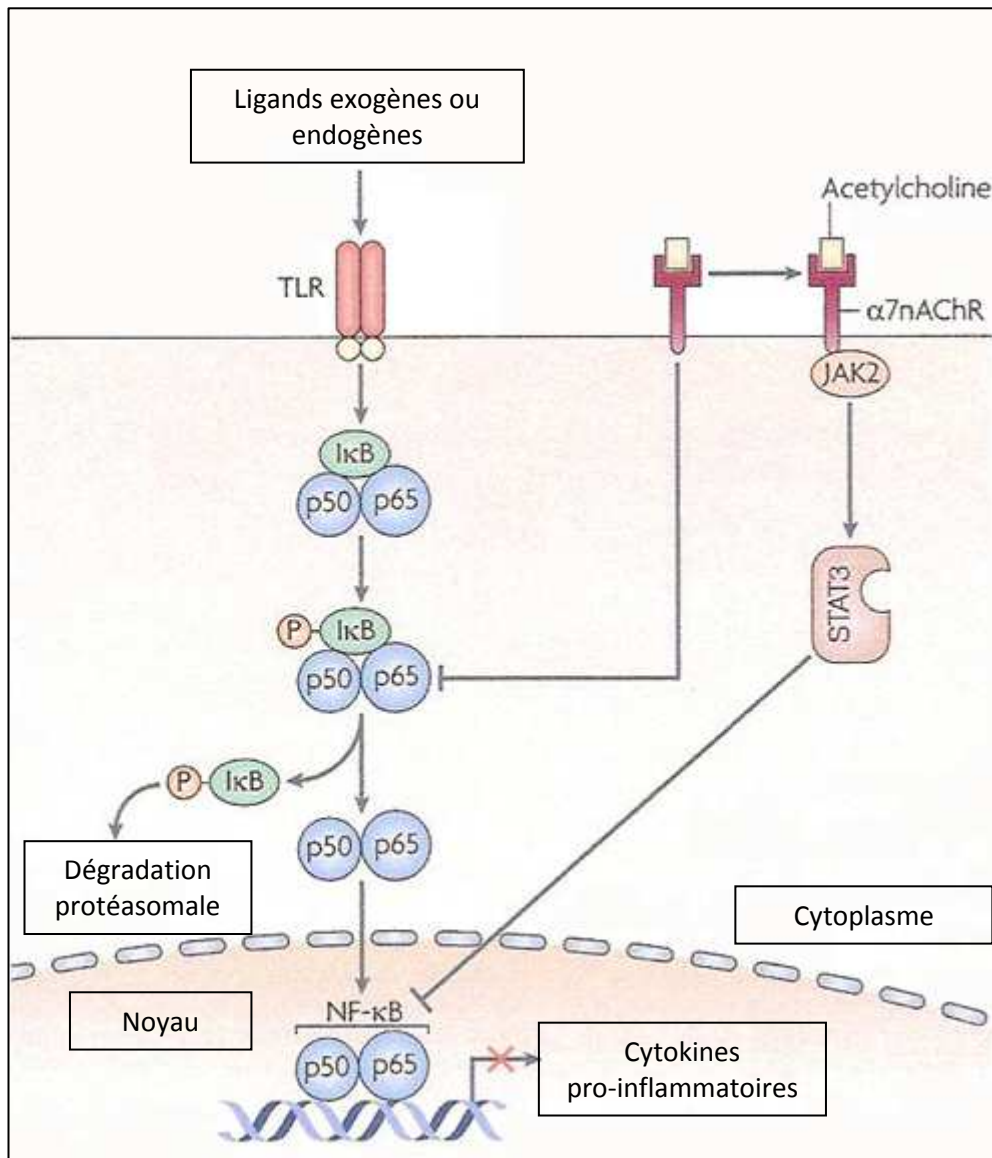


Figure 11 : la voie anti-inflammatoire cholinergique (d'après (Tracey 2002)).

### **2.3.2.1 La voie de signalisation de NF- $\kappa$ B**

La voie anti-inflammatoire cholinergique contrôle la réponse immunitaire par un mécanisme agissant sur le facteur de transcription, le NF- $\kappa$ B, des cellules immunitaires sécrétrices de cytokines réparties dans l'organisme, au niveau des sites d'inflammation, dans les organes lymphoïdes et notamment dans la rate. NF- $\kappa$ B est constitué de deux sous-unités hétérodimériques ou homodimériques : p65 et p60 (Funakoshi et al. 2012). En situation «de repos» le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est associé à son inhibiteur I $\kappa$ B dans le cytoplasme. Lors de l'activation cellulaire, par exemple lors d'une réaction immunitaire, I $\kappa$ B est phosphorylé par une kinase (I $\kappa$ K) provoquant sa dégradation et sa dissociation de NF- $\kappa$ B. Ce dernier peut alors migrer dans le noyau de la cellule et induire la transcription de gènes pro-inflammatoires, résultant en une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, HMGB1). Cette sécrétion en périphérie est détectée par les afférences vagales, signalant la présence d'un site d'inflammation au SNC. En réponse, les afférences vagales sont activées et sécrètent alors de l'ACh au niveau de leurs terminaisons. L'ACh se lie aux récepteurs  $\alpha$ 7 nicotiniques exprimés à la surface des cellules immunitaires sécrétrices de cytokines. La fixation de l'ACh inhibe la phosphorylation d'I $\kappa$ B ainsi que l'activation et la translocation de NF- $\kappa$ B, supprimant la transcription des cytokines pro-inflammatoires (Borovikova et al. 2000b ; Parrish et al. 2008 ; Saeed et al. 2005 ; Wang et al. 2004 ; Wang et al. 2003 ; Yoshikawa et al. 2006). La fixation de l'ACh sur son récepteur induit également un changement de conformation de ce dernier qui peut alors recruter JAK2 (*Janus kinase 2*) afin de former un complexe hétérodimérique. Ceci déclenche la voie de signalisation anti-inflammatoire STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) et SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*) permettant d'inhiber la fixation de NF- $\kappa$ B à l'ADN et donc d'obtenir un effet anti-inflammatoire (figure 12) (de Jonge et al. 2005).





**Figure 12 : voie de signalisation de NF-κB** (d'après (Tracey 2009)). TLR : Toll like récepteur ; JAK2 : Janus kinase 2 ; STAT 3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3 ; NF-κB: Nuclear Factor Kappa B ; p50/p65 : sous-unités de NF-κB ; IκB: Inhibiteur Kappa B ; P : phosphorylé.

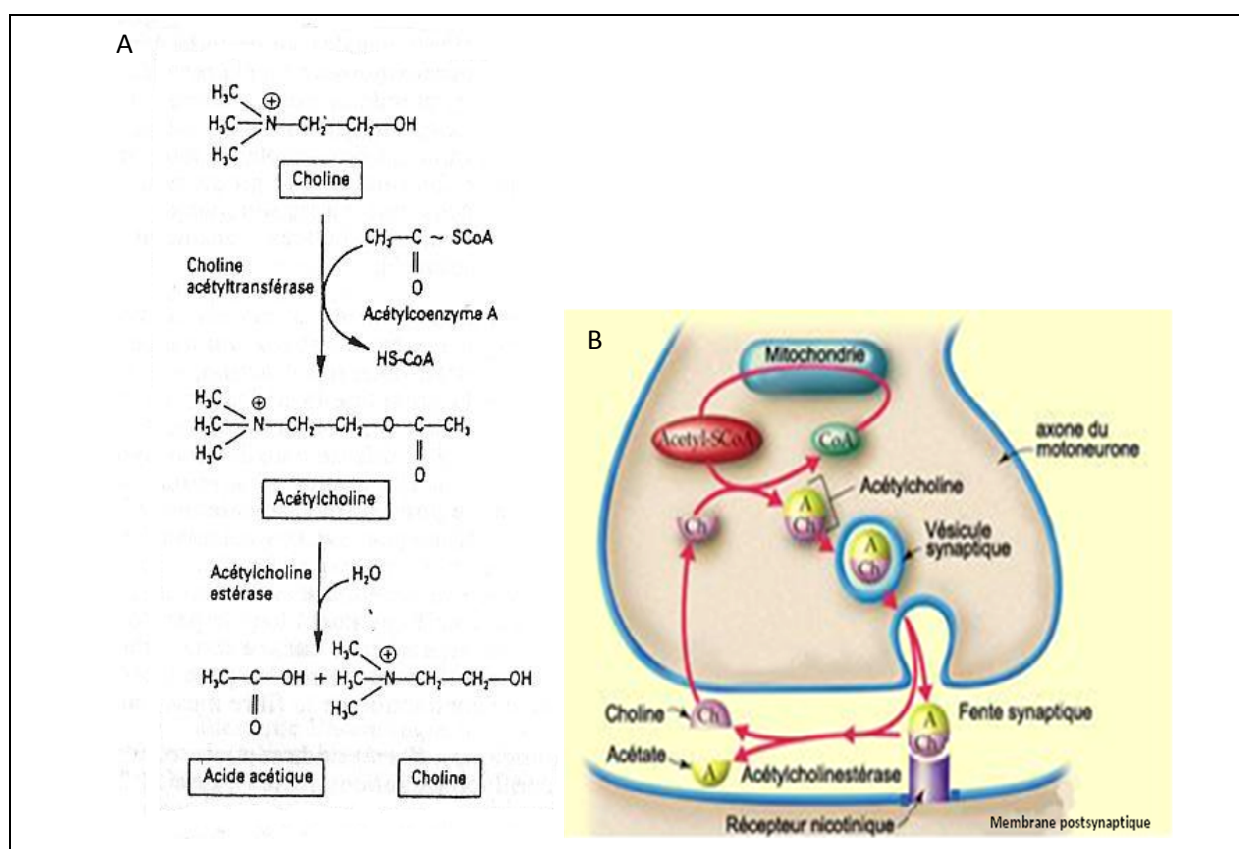
### 2.3.3 Le fonctionnement de l'acétylcholine dans l'effet anti-inflammatoire

#### 2.3.3.1 Structure et métabolisme de l'acétylcholine

L'ACh est libérée par les terminaisons nerveuses du système nerveux somatique et parasymphatique. C'est le neuromédiateur du système cholinergique dont font partie les fibres du NV. Ce neurotransmetteur joue un rôle important au niveau du SNC mais également au niveau du système nerveux périphérique, notamment pour l'activité de fonctions végétatives et musculaires.

Son métabolisme nécessite des enzymes de synthèse et de dégradation : les cholines acétyltransférases (ChAT) et les cholinestérases (ChE) respectivement (figure 13). L'ACh est formée à

partir de la choline et de l'acétyl-coenzyme A. Après sa synthèse, l'ACh est stockée dans les vésicules de la membrane présynaptique. Elle est libérée dans la fente synaptique lorsqu'un potentiel d'action au niveau d'une terminaison axonale permet l'ouverture des canaux calcium dépendants. Une fois dans la fente synaptique, l'ACh se fixe aux récepteurs membranaires exprimés sur la surface de la membrane post-synaptique et induit à son tour une modification de la perméabilité ionique. L'ACh présente dans la fente synaptique est hydrolysée par l'acétylcholinestérase en acétate et en choline cette dernière étant recaptée par le neurone présynaptique.



**Figure 13 : métabolisme et libération de l'acétylcholine** (d'après <http://lecerveau.mcgill.ca/>).

A : métabolisme ; B : libération d'acétylcholine dans une synapse.

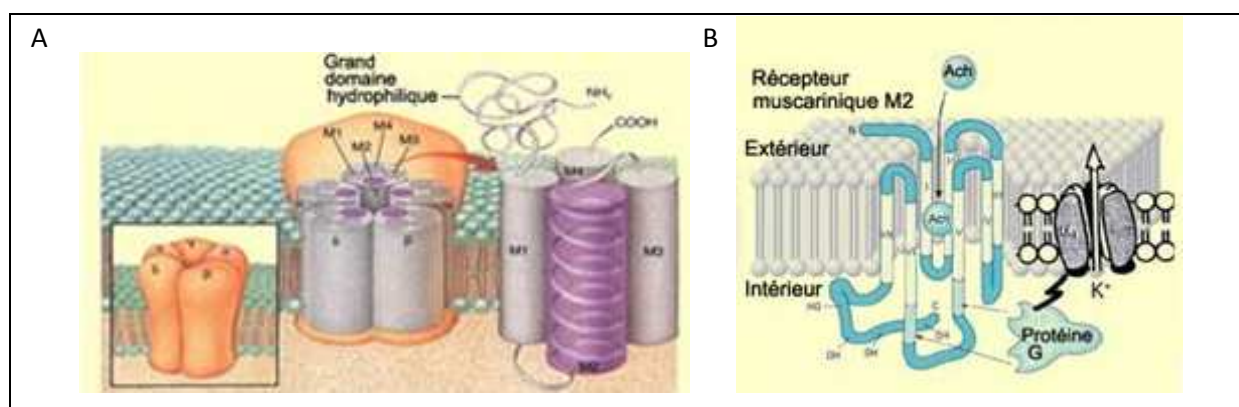
### 2.3.3.2 Les récepteurs à l'acétylcholine

L'action de l'ACh dans la région postsynaptique est réalisée grâce à des récepteurs membranaires. Les récepteurs à l'ACh peuvent être soit muscariniques (mAChR) soit nicotiques (nAChR).

Les mAChR sont des récepteurs métabotropes ou récepteurs à protéines G ; ils comportent sept hélices transmembranaires et sont couplés aux protéines G (Kostenis et al. 1998). Ils sont regroupés en cinq classes : de M1 à M5. Ces récepteurs sont à l'origine d'activations de cascades de signalisation (Jakubik et al. 2011) ; lorsque l'ACh se fixe à ce type de récepteur, la protéine G est

activée et module directement ou indirectement l'ouverture des canaux ioniques indépendants (figure 14).

Contrairement aux récepteurs mAChR, les nAChR sont des récepteurs ionotropes ou récepteurs canaux ; ils sont constitués d'un assemblage de cinq sous-unités (hétéropentamères ou homopentamères) formant une structure pentagonale autour d'un canal central (Miyazawa et al. 2003). Ils sont classés en sous-unités de types  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  ; il existe dix sous-unités  $\alpha$ , quatre sous-unités  $\beta$  ; les sous-unités  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  n'existent que sous une seule forme (Lukas et al. 1999). Chaque sous-unité possède quatre domaines transmembranaires (M1-M4). La fixation de l'ACh aux récepteurs va induire une dépolarisation de la membrane post-synaptique en permettant l'entrée d'un flux d'ions sodium et la sortie de potassium par ces canaux ligands-dépendants (Mamalaki and Tzartos 1994).



**Figure 14 : structure des récepteurs à l'acétylcholine** (d'après <http://lecerveau.mcgill.ca/>) A : structure d'un récepteur nicotinique ; B : structure d'un récepteur muscarinique.

### 2.3.3.3 La localisation des récepteurs

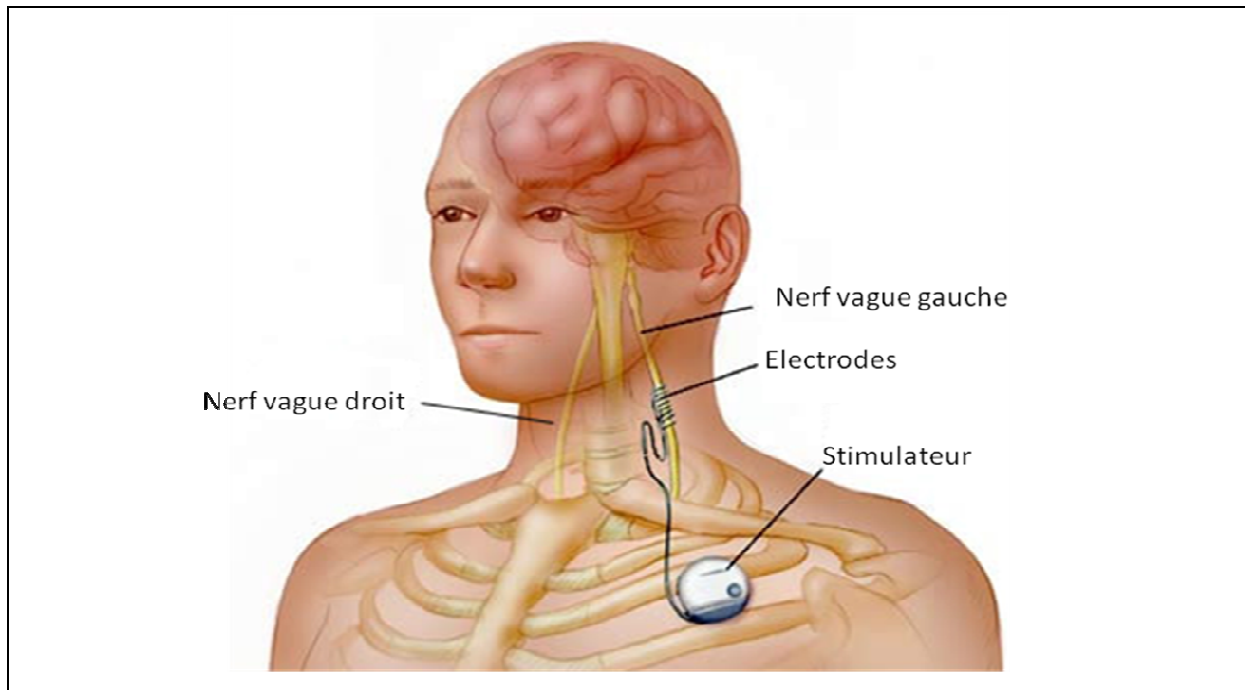
Les récepteurs nicotiniques sont impliqués dans plusieurs fonctions. Ils sont retrouvés au niveau du SNC, des jonctions neuromusculaires ainsi que dans le système nerveux périphérique (Marubio and Changeux 2000). En effet, l'ACh est non seulement sécrétée par les efférences vagales mais également par les cellules immunitaires permettant alors un lien de modulation entre le SNC et le système immunitaire (Kawashima and Fujii 2003 ; Matthay and Ware 2004). Une étude utilisant un antagoniste spécifique aux récepteurs nicotiniques, l' $\alpha$ -bungarotoxine avec un « tag » fluorescent a permis de mettre en évidence que les macrophages expriment à leur surface des récepteurs nAChR (Drisdell and Green 2000 ; Villiger et al. 2002), et notamment le récepteur  $\alpha 7$ nAChR nécessaire pour l'effet anti-inflammatoire induit par la fixation de l'ACh (Snoek et al. 2010; Wang et al. 2003). Cet effet anti-inflammatoire nécessitant la présence du récepteur  $\alpha 7$ nAChR est surprenant car la signalisation du parasympathique est classiquement réalisée sur les récepteurs mAChR des organes cibles (Huston and Tracey 2011). Généralement, les cellules mononucléées expriment les deux types

de récepteurs mAChR et nAChR à leur surface (Filippini et al. 2012; Huston and Tracey 2011 ; Wang et al. 2003). Plusieurs types de cellules immunitaires expriment différents sous-types de nAChR (de Jonge and Ulloa 2007) : les macrophages expriment l' $\alpha 7$ nAChR ainsi que d'autres sous-types de nAChR (Borovikova et al. 2000b ; Galvis et al. 2006), les lymphocytes B expriment l' $\alpha 7$ nAChR et l' $\alpha 4\beta 2$  nAChR (Skok et al. 2006), les lymphocytes T expriment les mAChR et différents sous-types de nAChR (De Rosa et al. 2005 ; Nizri et al. 2006; Sato et al. 1999). Néanmoins, il a été constaté que l' $\alpha 7$  nAChR n'est pas le seul à pouvoir jouer un rôle dans la modulation de l'inflammation induite par la sécrétion d'acétylcholine par le NV. Une étude récente (van der Zanden et al. 2009) a démontré que la stimulation du récepteur  $\alpha 4\beta 2$  nAChR sur des macrophages du péritoine et de la muqueuse induisait une augmentation de l'endocytose et de la phagocytose tout en diminuant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et en n'affectant pas la libération de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) (Borovikova et al. 2000b).

Cette voie anti-inflammatoire cholinergique peut donc être une cible thérapeutique dans le traitement des différentes pathologies inflammatoires notamment les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les colites (Ghia et al. 2006), les affections inflammatoires rhumatismales telles que la polyarthrite rhumatoïde, le choc septique, l'ischémie-reperfusion ou un choc hémorragique (Bernik et al. 2002a ; Bonaz 2007; Borovikova et al. 2000b ; Guarini et al. 2003 ; Wang et al. 2003). L'activation de cette voie peut se faire soit par l'utilisation d'agonistes cholinergiques notamment les agonistes spécifiques du récepteur  $\alpha 7$  nicotinique, soit par une approche anatomiquement plus ciblée : la neurostimulation vagale (NSV). Des agonistes spécifiques du récepteur  $\alpha 7$  tels que le CNI-1493, l'AR-R17779 ou le GTS-21 ont été utilisés avec succès dans différents modèles, notamment dans le cas de l'ileus post-opératoire, de la pancréatite et de la colite (Bernik et al. 2002b ; Borovikova et al. 2000a ; Hommes et al. 2002 ; van Westerloo et al. 2006).

## **2.4 La neurostimulation vagale**

De nos jours, la stimulation électrique des afférences vagales a montré son intérêt pour le traitement de certaines formes d'épilepsie ou de dépression (Ghia et al. 2008; Groves and Brown 2005 ; Mauguier 1996). Le neurostimulateur utilisé chez l'Homme est commercialisé par la société Cyberonics. Le stimulateur est implanté sous la clavicule du patient et l'électrode de stimulation sur la partie cervicale du NV gauche car une stimulation du NV droit induit des troubles de la fréquence cardiaque (le NV droit innerve le cœur au niveau du nœud de Keith et Flack) (figure 15). Le stimulateur est programmable et permet de délivrer une stimulation avec des paramètres précis (intensité, fréquence, et cycle ON/OFF sont programmables).



**Figure 15 : schéma d'implantation de l'électrode de stimulation et du stimulateur** (d'après Mayo Foundation for Medical Education and Research).

La première implantation d'électrodes de stimulation pour la NSV a été réalisée en 1988 aux USA pour le traitement de certaines formes d'épilepsie réfractaires aux traitements. La NSV a ensuite été approuvée en 1994 en Europe et en juillet 1997 par la «Food and Drug Administration» (FDA) aux Etats-Unis pour le traitement des épilepsies réfractaires (Groves and Brown 2005). Ce traitement est réservé aux patients atteints d'épilepsie résistante aux traitements et ne pouvant pas subir de chirurgie (Ben-Menachem 2002 ; Heck et al. 2002). Les résultats des études de suivis des patients recevant la NSV comme traitement montrent une efficacité importante. En effet, environ 20% des patients n'ont plus ou presque plus de crises, et environ 50% des patients ont une amélioration de leur état général avec une baisse de la fréquence des crises (Bao et al. 2011; Wheeler et al. 2011). Le mécanisme d'action de la NSV dans le contrôle des crises d'épilepsie n'est pas encore parfaitement élucidé. Une désynchronisation de l'activité synaptique ainsi qu'une diminution de l'activité des structures limbiques accompagnées d'une sécrétion de norépinephrine pourrait être impliquées dans le mécanisme d'action de la NSV (Casazza et al. 2006). Il a été démontré par immuno-marquage de la protéine nucléaire Fos (exprimée dans des conditions d'activation neuronale) de plusieurs régions cérébrales chez le rat qu'après NSV gauche, l'amygdale, l'hypothalamus et le cortex cingulaire étaient activés (Naritoku et al. 1995). Dans une autre étude, une augmentation de la norépinephrine dans le cortex et l'hippocampe a également été mise en évidence (Roosevelt et al. 2006). De plus, il a été démontré que l'effet de la NSV sur le contrôle du nombre de crises augmente avec la durée du traitement (Boon et al. 2009 ; Colicchio et al. 2010; Labar 2004).

La NSV s'applique également au traitement de certaines formes de dépression pharmaco-résistante. En effet, il a été observé dans les années 1990 que les patients épileptiques traités par NSV ressentaient une amélioration de leurs humeurs (Handforth et al. 1998). Après des études précliniques, le traitement par la NSV de la dépression pharmaco-résistante a été accepté en mars 2001 en Europe et en juillet 2005 aux Etats-Unis (Groves and Brown 2005). Le suivi des résultats des patients a démontré que l'effet positif de la NSV s'amplifie avec la longueur du traitement (Rizvi et al. 2011). En effet, après un an de NSV, 53% des patients traités ressentent une amélioration et 33% sont en rémission totale contre respectivement 37% et 17% après trois mois de traitement (Schlaepfer et al. 2008).

Pour le traitement de ces deux pathologies, les fréquences de stimulation utilisées sont entre 20 et 30Hz afin d'avoir un effet sur le SNC par stimulation des afférences vagales et d'obtenir un effet thérapeutique. Peu d'effets secondaires sont répertoriés, aucun retentissement sur la fréquence cardiaque n'est observé, par contre un enrouement temporaire de la voix, une toux, un essoufflement, des picotements sont ressentis au début du traitement et s'estompent avec le temps (tableau 2) (Bao et al. 2011).

Effets secondaires	0-3 mois (n=232)	9-12 mois (n=209)
<b>Altération de la voix</b>	135 (58,2%)	113 (54,1%)
<b>Toux</b>	55 (23,7%)	13 (6,2%)
<b>Douleur dans le cou</b>	38 (16,4%)	27 (12,9%)
<b>Dyspnée</b>	33 (14,2%)	34 (16,3%)
<b>Dysphagie</b>	31 (13,4%)	9 (4,3%)
<b>Paresthésie</b>	26 (11,2%)	9 (4,3%)

**Tableau 2 : effets secondaires associés à la NSV de 0-3 mois et de 9-12 mois après implantation** (d'après Summary Information- VNS therapy system, U.S. Food and Drug Administration 2005).

Aujourd'hui environ 60 000 patients à travers le monde ont bénéficié de la NSV comme traitement. Elle pourrait être appliquée à d'autres pathologies telles que l'anxiété, la migraine (Groves and Brown 2005) ou l'obésité (Pardo et al. 2007), et également aux pathologies inflammatoires comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et la polyarthrite rhumatoïde. En effet cette technique stimule et active la voie anti-inflammatoire cholinergique (Borovikova et al. 2000b). En outre, ce traitement serait très intéressant pour les MICI de par son faible coût comparé à celui des traitements pharmacologiques et par son innocuité : il existe très peu d'effets secondaires qui s'estompent avec le temps. Il permettrait également d'éviter les problèmes

d'observance qui sont important dans les MICI, environ 30 à 50% des patients ne prennent pas correctement leurs traitements.

### **3. Le système immunitaire**

Le système immunitaire (SI) maintient l'intégrité de l'organisme en le défendant contre le non-soi (bactéries, virus) ou contre les cellules tumorales et en reconnaissant et tolérant le soi. Lors d'une infection, l'organisme met en place une réponse du système immunitaire afin d'éliminer les pathogènes. Il existe une réponse immunitaire innée (ou non spécifique) et une réponse immunitaire adaptative (spécifique). L'immunité innée constitue la première ligne de défense contre les organismes étrangers, elle est rapide. Elle met en jeu des substances humorales, des cascades protéolytiques (protéines de complément) et des composants cellulaires : les cellules phagocytaires (monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles).

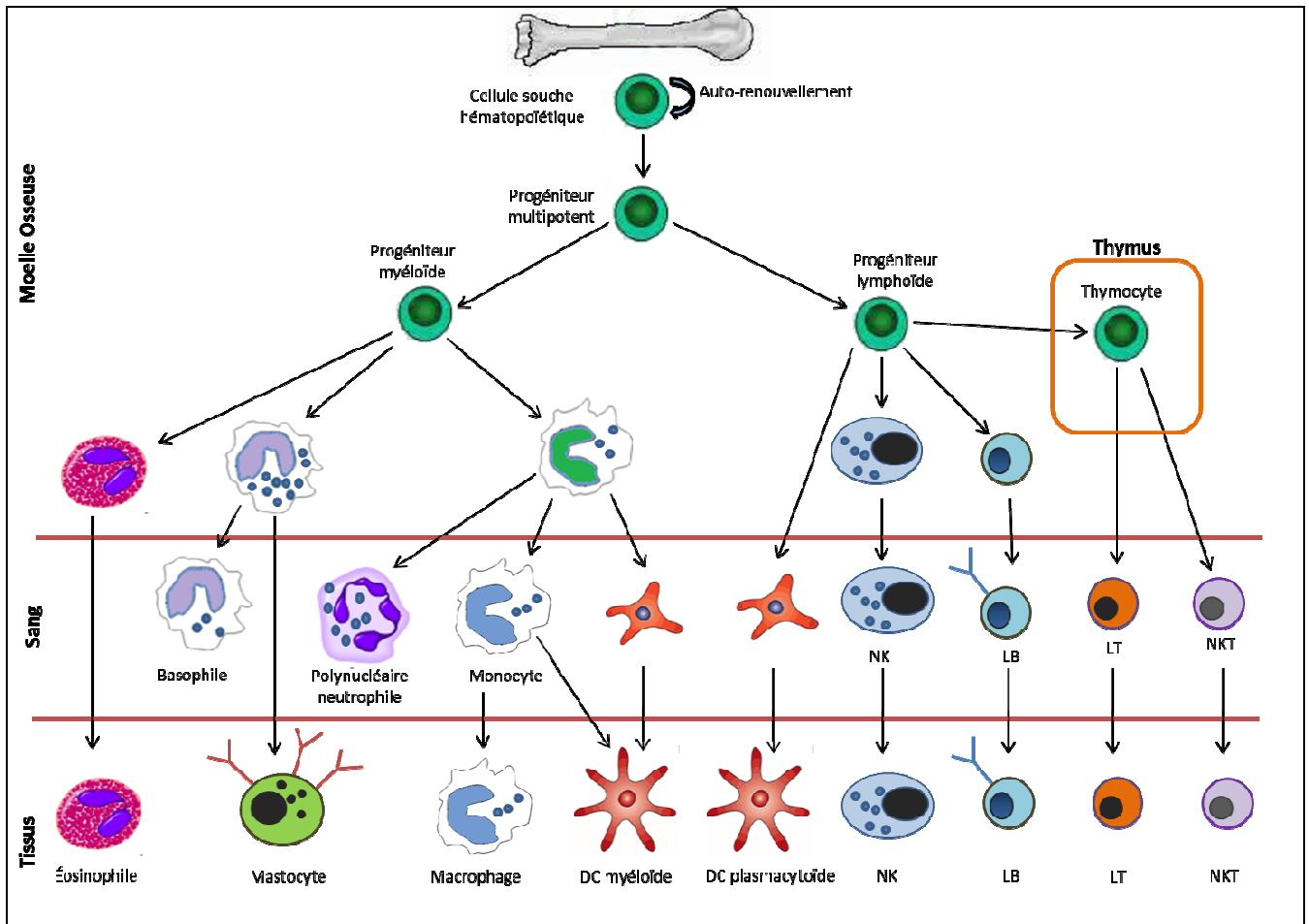
L'immunité adaptative comprend un ensemble de réponses cellulaires et humorales spécifiques de l'antigène, elle constitue la deuxième ligne de défense de l'organisme. Elle demande plus de temps que l'immunité innée pour se mettre en place. Elle a pour but d'éliminer spécifiquement le pathogène mais également de développer une mémoire de ce pathogène afin de pouvoir répondre plus rapidement et plus efficacement lorsqu'il apparaîtra à nouveau.

L'immunité innée et l'immunité acquise coopèrent afin de produire une immunité plus efficace. Les deux systèmes travaillent ensemble pour l'élimination d'un pathogène.

#### **3.1 Les cellules du système immunitaire**

La majorité des cellules immunitaires proviennent de cellules souches hématopoïétiques multipotentes dans la moelle osseuse. Ces cellules souches se différencient par la suite en cellules progénitrices lymphoïdes ou myéloïdes. A leur tour ces cellules se différencient pour donner différentes cellules matures. Les étapes de prolifération et de maturation se font dans la moelle osseuse à l'exception des lymphocytes T qui effectuent leur étape de maturation dans le thymus (figure 16).





**Figure 16 : les étapes de l'hématopoïèse.** DC : cellules dendritiques, NK : natural killer, LB : lymphocytes B, LT: lymphocytes T, NKT: natural killer T.

### 3.1.1 Les cellules lymphoïdes

Les cellules lymphoïdes sont à l'origine des lymphocytes, divisés en deux types cellulaires :

- les grands lymphocytes granuleux : les lymphocytes NK (natural killer) participant à la réponse immunitaire innée,
- les petits lymphocytes lisses : les lymphocytes B et T qui font partie de la réponse immunitaire adaptative. À l'état de base, ils sont localisés dans les tissus lymphoïdes.

Les lymphocytes NK sont localisés dans tous les tissus. Ils représentent 5 à 15% des lymphocytes circulants humains. Ils n'expriment pas de récepteur spécifique de l'antigène à leur surface. Ce sont des cellules de l'immunité innée qui jouent un rôle important dans la réponse anti-infectieuse et anti-tumorale. Ils reconnaissent et lysent les cellules qui expriment des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité 1 (CMH-1) comportant des anomalies (cellules infectées et tumeurs).

Les lymphocytes T (LT) représentent 75% des lymphocytes circulants chez l'humain. Ils sont responsables de l'immunité cellulaire. Ces lymphocytes proviennent également de la moelle osseuse,



mais ils migrent dans le thymus afin d'effectuer leur maturation. Lors de la maturation, les LT viennent à exprimer à leur surface une molécule de liaison à l'antigène (Ag) spécifique : le TCR (récepteur des cellules T). Le TCR est associé aux protéines du corécepteur CD3 (cluster de différenciation 3). Le TCR est un hétérodimère qui peut être constitué d'une chaîne  $\alpha$  associée à une chaîne  $\beta$ . Les lymphocytes portant un TCR  $\alpha\beta$  représentent 95% des LT et sont différenciés en deux sous-populations :

- Lymphocytes T CD4 + : ils expriment à leur surface le marqueur CD4. Ils sont également appelés T auxiliaires ou T helper (Th) ou les T régulateurs pour ceux exprimant également le FoxP3 (T reg) et ont pour fonction de moduler l'activité des autres cellules immunitaires. Il existe différentes sous-populations de Th classées selon les cytokines qu'ils sécrètent :
  - *Lymphocytes Th1* : favorisent l'immunité cellulaire, sécrètent l'IL-8, l'IL-2, le TNF- $\alpha$  et l'INF- $\gamma$ , favorisant l'inflammation ;
  - *Lymphocytes Th2* : favorisent l'immunité humorale, sécrètent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-10 (Mosmann et al. 1991);
  - *Lymphocytes Th17* : favorisent l'inflammation et l'auto-immunité, sécrètent de l'IL-17 (Corvaisier-Chiron and Beauvillain 2010 ; Langrish et al. 2005) ;
  - *Lymphocytes Treg* : nécessaires au maintien de la tolérance. Capables d'inhiber l'activation des autres lymphocytes T, sécrètent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ). Ils expriment le CD4, le CD25 et le facteur de transcription FOXP3 (forkhead box P3) (Chatila 2005).

Des modifications au niveau de la balance Th1/Th2 et Treg/Th17 ont été répertoriées dans des maladies inflammatoires auto-immunes ou dans des cas de colites (Corvaisier-Chiron and Beauvillain 2010 ; Sanchez-Munoz et al. 2008).

- Lymphocytes T CD8+ : ils expriment à leur surface le marqueur CD8. Ce sont les lymphocytes T cytotoxiques (Tc). Leur fonction est de lyser les cellules exprimant les antigènes spécifiques.

Les lymphocytes T peuvent également exprimer un TCR constitué d'une chaîne  $\gamma$  associée à une chaîne  $\delta$ . Ils représentent seulement 5% des lymphocytes circulants de l'humain ; ils assurent la surveillance des épithéliums où ils sont plus abondants (10 à 30%). Ils sont capables de reconnaître directement les Ag entiers par leur TCR et les cellules en état de stress ; ils répondent en lysant directement la cellule cible ou modulent l'activité d'autres cellules immunitaires.

Les lymphocytes NKT, contrairement aux cellules NK, expriment un TCR et le CD3 à leur surface, mais elles ne présentent ni le CD4 ni le CD8 (Lees et al. 2001). Ils représentent moins de 1% des LT circulants humains. Ils sont capables de reconnaître les lipides et les glycolipides présentés par des molécules proches des molécules du CMH-1 : le CD1d exprimé par les cellules présentatrices d'Ag (CPA). Les NKT activent la différenciation des monocytes en cellules dendritiques au cours de la réaction inflammatoire. Ils possèdent des propriétés immunorégulatrices (Bendelac et al. 2007; Wu and Van Kaer 2009; Wu and Van Kaer 2011).

Les lymphocytes B représentent 5 à 15 % des cellules lymphoïdes circulantes. Ils arrivent à maturation dans la moelle osseuse. Lorsqu'ils quittent celle-ci ils expriment à leur surface un récepteur de liaison à l'antigène : le BCR (récepteur des cellules B) qui est une immunoglobuline capable de reconnaître l'Ag directement contrairement aux TCR qui ne peuvent reconnaître l'Ag que lorsque ce dernier est lié à des molécules du CMH des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Lorsqu'ils sont activés par la reconnaissance de leur Ag spécifique ils se différencient en plasmocytes qui ont pour fonction la synthèse d'immunoglobulines. Ils jouent également le rôle de CPA.

### **3.1.2 Les cellules myéloïdes**

Les cellules myéloïdes participent toutes à l'immunité innée. Elles produisent les cellules myélocyaires (lignée des polynucléaires ou granulocytes) et les cellules monocyaires (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) au cours de l'hématopoïèse.

Les polynucléaires ou granulocytes sont réparties en plusieurs sous-familles :

- les polynucléaires neutrophiles qui représentent 90% des polynucléaires. Ce sont les premières cellules à intervenir lors d'une infection. Ils contiennent différents granules (tels que la myéloperoxydase (MPO), des lysozymes) synthétisés au cours de leur différenciation et qui leur permet d'éliminer le non-soi et d'activer la migration de nouveaux neutrophiles.
- les polynucléaires éosinophiles : ils sont localisés dans les tissus. Ils contiennent également des granules qui leur permettent d'intervenir dans la défense anti-parasitaire.
- les polynucléaires basophiles : ils sont les moins nombreux et jouent un rôle important dans l'allergie. Ils possèdent de nombreux granules qu'ils libèrent lorsqu'ils sont activés. De l'histamine et d'autres médiateurs chimiques sont retrouvés dans les granules qui sont à l'origine de la réponse inflammatoire.

- les mastocytes : ils sont abondants dans les tissus en contact avec l'environnement tels que les muqueuses ou la peau. Ils jouent également un rôle primordial dans l'allergie. Ils contiennent de nombreux granules et expriment à leur surface des récepteurs de haute affinité de l'immunoglobuline E (IgE). Lorsqu'ils sont activés ils libèrent de l'histamine (rôle primordial dans les allergies) et d'autres médiateurs chimiques à l'origine de la réponse inflammatoire.

Les phagocytes mononucléés regroupent toutes les cellules issues des monocytes.

- Les monocytes : ce sont des cellules retrouvées uniquement dans le sang. Ils circulent dans le sang puis migrent dans les tissus où ils se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques résidentes participant à la surveillance de ces tissus.
- Les macrophages : ce sont des cellules phagocytaires provenant de la différenciation des monocytes. Ils sont ubiquitaires et présentent des formes variées en fonction du tissu dans lequel ils résident et portent des noms différents (dans le foie : cellules de Küppfer, dans les poumons : macrophages alvéolaires, dans les tissus nerveux : cellules microgliales). Elles peuvent également jouer le rôle de CPA.
- Les cellules dendritiques : ces cellules présentent des expansions cytoplasmiques appelées dendrites. Elles expriment à leur surface de nombreux récepteurs reconnaissant des molécules de pathogènes (PRR) ainsi que le CD4 et les molécules du CMH-1 et CMH-2. Elles sont présentes dans tous les tissus de l'organisme. Elles jouent le rôle de cellules phagocytaires mais également de CPA. Elles ont pour fonction d'activer les lymphocytes T. Une fois l'Ag phagocyté, elles migrent dans les vaisseaux lymphatiques afin d'atteindre les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les antigènes aux lymphocytes T. Elles jouent également un rôle important au niveau du thymus dans le maintien de la tolérance du soi.

Ces différentes cellules immunitaires expriment à leur surface des molécules membranaires permettant de les distinguer les unes des autres et également de distinguer les étapes de maturation des lymphocytes. Ces molécules sont aussi appelées : cluster de différenciation (CD), et sont utilisés pour caractériser les sous-types cellulaires. Ces CD sont reconnus par des anticorps monoclonaux qui

peuvent être utilisés lors d'expériences en cytométrie en flux (tableau 3). Certains marqueurs sont différents entre l'Homme et le rat.

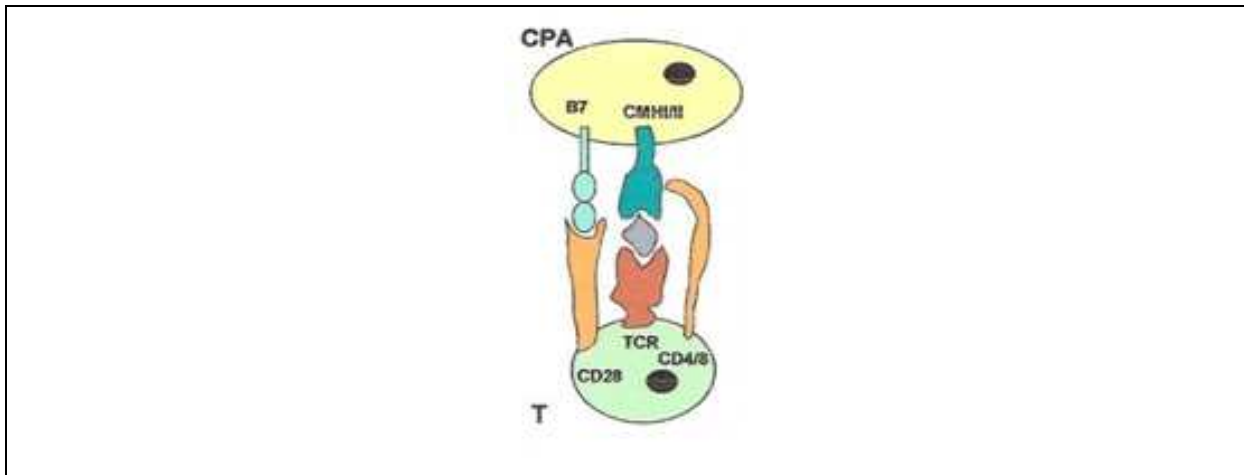
Cluster de différenciation rat	Cluster de différenciation Homme	Fonction	Cellules
CD3	CD3	Elément de transduction du signal du récepteur des TCR	LT
CD4	CD4	Molécule d'adhésion se liant aux molécules de classe II du CMH ; transduction du signal	LTh
CD8	CD8	Molécule d'adhésion se liant aux molécules de classe I du CMH ; transduction du signal	LTc
CD25	CD25	Sous-unité $\alpha$ du récepteur de la cytokine IL-2	Lymphocytes activés et LTreg
CD28	CD28	Récepteur de la molécule B7 de co-stimulation des CPA	LTh et LTc
CD45RA	CD19	Transduction du signal	LB
CD161a	CD56 et CD16	Modulation de la cytotoxicité médiée par les cellules NK	NK
CD3 et CD161 a	CD3, CD56 et CD16		NKT

**Tableau 3 : clusters de différenciation chez le rat et l'Homme des populations lymphocytaires.** CD : cluster de différenciation ; Th : lymphocyte T helper ou auxiliaire ; Tc : lymphocyte T cytotoxique ; Treg : lymphocytes T régulateurs ; NK : cellule natural killer ; NKT : cellule natural killer T.

Lors d'une infection, l'organisme répond dans un premier temps avec l'immunité innée jusqu'à atteindre le seuil d'activation de la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes T ne peuvent pas reconnaître un antigène directement avec leur TCR. Il faut que cet antigène soit tout d'abord phagocyté par une CPA comme les cellules dendritiques qui présentent alors des fragments protéolysés de l'Ag lié à des protéines de la membrane du CMH-1. Lorsque le LT naïf rencontre l'Ag couplé à une molécule de CMH-1 à la surface d'une CPA, le LT prolifère et se différencie en cellules T effectrices et en LT mémoires. Ces T effectrices vont sécréter divers facteurs comme les cytokines qui

jouent un rôle primordial dans l'activation des lymphocytes B, des LTc, des macrophages et des autres cellules participant à la réponse immunitaire.

L'activation des lymphocytes T requiert deux signaux : la reconnaissance antigénique par le TCR et un signal de co-stimulation passant par le CD28 exprimé sur le LT qui se lie au récepteur B7 de la CPA (figure 17). Si le signal de co-stimulation n'est pas réalisé, le lymphocyte T reste en anergie.



**Figure 17 : La synapse immunologique** : activation d'un lymphocyte T. CPA : cellule présentatrice d'antigène ; T : lymphocyte T.

### 3.1.3 La réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire est déclenchée dans l'organisme par la détection d'une agression. Elle est caractérisée par des symptômes locaux : la rougeur, le gonflement, la chaleur et la douleur. Lorsqu'elle est contrôlée et limitée dans le temps, elle met fin à l'agression en assurant la réparation des tissus lésés et en éliminant l'Ag. Dans ce cas, la réaction inflammatoire est considérée comme aiguë. Par contre, lorsque la réaction inflammatoire se prolonge elle est dite chronique et devient à ce moment-là délétère pour l'organisme (Libert 2003; Nathan 2002).

La réaction inflammatoire consiste en plusieurs étapes :

- Activation des cellules immunitaires résidentes. Les cellules agressées sécrètent des médiateurs (cytokines, HSP (*Heat Shock Protein*), enzymes) perçus par les cellules immunitaires résidentes : les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes. Ces cellules vont alors sécréter des facteurs solubles permettant le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'inflammation. Ces facteurs solubles sont des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-18), des substances vasodilatatrices (oxyde nitrique (NO), prostaglandines), des leucotriènes, et également des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- $\beta$ ) afin de réguler la réaction inflammatoire (de Waal Malefyt et al. 1991 ; Huston and Tracey 2011).

- Exsudation plasmatique sur le site de l'inflammation. Elle est provoquée par la vasodilatation des capillaires ainsi que par la perméabilité de l'endothélium. Ceci permet l'arrivée de nombreuses molécules antimicrobiennes directement sur le site de l'inflammation (le complément, les lectines, la lactoferrine).

- Extravasation ou diapédèse des leucocytes. Les leucocytes sanguins sont recrutés sur le site de l'inflammation. Les leucocytes atteignent les tissus inflammés grâce à des facteurs chimiotactiques.

Toutes les cellules recrutées interagissent afin d'optimiser leur action antimicrobienne et orientent la réaction inflammatoire adaptative.

- L'arrêt de la réaction inflammatoire est provoqué lorsque l'Ag ayant provoqué l'agression est éliminé. La réparation des tissus endommagés est alors engagée. Pour cela des médiateurs sont sécrétés tels que des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-13, IL-4) (tableau 4) inhibant l'activation des cellules et la production de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que l'activation de cellules permettant la réparation tissulaire : cellules endothéliales, kératinocytes, fibroblastes. Cet arrêt est également contrôlé par l'action des lymphocytes Treg de façon à éviter une réponse immunitaire exacerbée et les dommages tissulaires qu'elle provoquerait (Chatila 2005).

Cytokines	Cellules sécrétrices	Fonction
<b>IL-1</b>	Monocytes, macrophages, granulocytes, LT, LB, NK, cellules endothéliales, fibroblastes, kératinocytes, cellules musculaires lisses, astrocytes	Pro-inflammatoire ; provoque la fièvre
<b>IL-2</b>	Lymphocytes T, lymphocytes B, NK	Pro-inflammatoire ; prolifération des lymphocytes T et lymphocytes B
<b>IL-6</b>	Monocytes, macrophages, fibroblastes, LT, LB, granulocytes, éosinophiles, cellules musculaires lisses, mastocytes, cellules gliales, kératinocytes	Pro-inflammatoire ; provoque l'immunité innée et l'élimination des pathogènes
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Monocytes, macrophages, neutrophiles, LT, NK, granulocytes, astrocytes, microglie, fibroblastes, cellules musculaires lisses	Pro-inflammatoire ; provoque l'immunité innée et l'élimination des pathogènes
<b>IL-12</b>	LB, LT	Pro-inflammatoire ; stimule la prolifération des NK et cellules Th1 activées ; induit la différenciation en LThc
<b>IL-17</b>	LT CD4+	Pro-inflammatoire ; maintient l'inflammation
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	LB, LT, NK	Pro-inflammatoire ; augmente l'activité des macrophages ; inhibe la prolifération de LTh2
<b>HMGB-1</b>	Monocytes, macrophages	Pro-inflammatoire
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Macrophages, lymphocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, plaquettes	Anti-inflammatoire ; inhibe la prolifération des cellules épithéliales, lymphoïdes limitant la réponse inflammatoire et favorisant la cicatrisation
<b>IL-4</b>	Th2, mastocytes	Anti-inflammatoire ; stimule la prolifération des LB, induit la prolifération des LT, augmente l'activité phagocytaire
<b>IL-10</b>	LT, Th2, monocytes, LB, kératinocytes, mastocytes	Anti-inflammatoire ; réduit la production de cytokines par les LTh1

**Tableau 4 : récapitulatif des cytokines principales jouant un rôle dans la réaction inflammatoire.**

## **3.2 Régulation du système immunitaire par le SNC**

Le contrôle de la réponse immunitaire peut s'effectuer par l'intermédiaire de l'innervation directe des organes lymphoïdes périphériques. En effet, les terminaisons nerveuses sécrètent des neuromédiateurs pouvant moduler le fonctionnement des cellules du SI. De plus, le SI communique avec le SNC par voie nerveuse et humorale (cytokines), impliquant les voies sensorielles afférentes (afférences vagales et nociceptives).

### **3.2.1 Récepteurs de neuromédiateurs sur les cellules immunitaires**

La présence de récepteurs neuroendocriniens à la surface des cellules immunocompétentes est nécessaire pour la communication et la régulation du SNC sur le SI. En effet, il a été démontré que les leucocytes expriment à leur surface une large variété de récepteurs, notamment des récepteurs aux glucocorticoïdes et des récepteurs à l'ACh retrouvés sur les lymphocytes T et B, les monocytes et macrophages et sur les neutrophiles pour les récepteurs aux glucocorticoïdes uniquement.

La réponse de l'immunité innée pendant une infection ou une blessure est primordiale pour la protection de l'organisme contre une infection généralisée tel que le choc septique. La réponse inflammatoire déclenchée en réponse doit être contrôlée pour avoir un effet bénéfique pour l'organisme. La production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, HMGB1, IL-6) est bénéfique et favorise la coagulation et la réparation des tissus endommagés. Toutefois, si la production de ces cytokines est trop abondante et non contrôlée, cela engendre de graves problèmes au niveau des tissus et peut aller jusqu'au choc septique ou des pathologies inflammatoires (Hotchkiss and Karl 2003 ; Nathan 2002 ; Ulloa and Tracey 2005). Des thérapies visant à neutraliser ces cytokines ont été développées comme le traitement utilisant des anticorps monoclonaux anti-TNF pour la maladie de Crohn (Van Assche and Rutgeerts 2000), toutefois ces traitements provoquent de nombreux effets secondaires. A l'état de base, des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10, le TGF- $\beta$  ou les glucocorticoïdes, sont sécrétés afin de contrôler la réponse inflammatoire et d'éviter des réponses inflammatoires excessives. Ceci est contrôlé par l'action du SNC à travers le nerf vague et la voie anti-inflammatoire cholinergique décrite précédemment. Toutefois, un maillon supplémentaire peut être ajouté à la voie anti-inflammatoire cholinergique : la rate.

Il a été démontré que la rate, organe lymphoïde secondaire, joue un rôle primordial dans la régulation de l'inflammation par la voie anti-inflammatoire cholinergique (Huston et al. 2006).



### 3.2.2 Anatomie de la rate

La rate est située dans l'hypocondre gauche, elle mesure environ 12 cm de long chez l'adulte. Elle repose sur l'angle colique gauche. Elle présente deux faces, deux bords et deux pôles :

- la face ventro-médiale ou face gastrique est en regard de l'estomac ; au centre de cette face le hile ou pédicule vasculaire est retrouvé. En avant du hile, se trouve la facette gastrique et en arrière la facette rénale ;

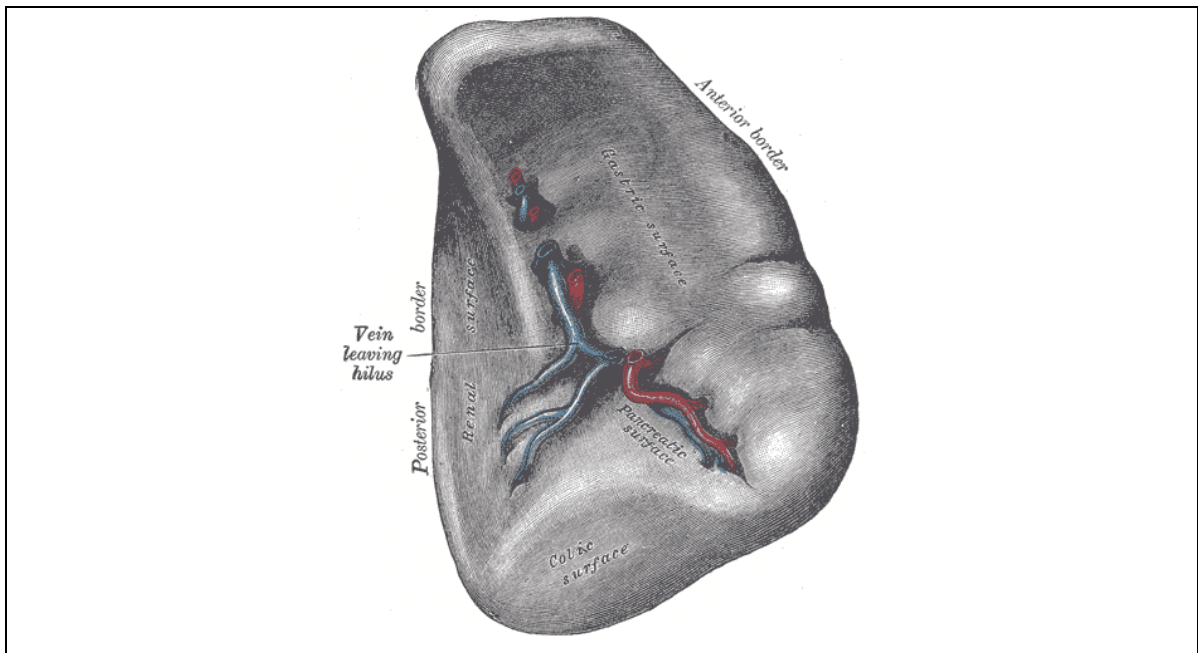
- la face dorso-latérale ou face diaphragmatique est face au diaphragme ;

- un pôle crânial arrondi ;

- un pôle caudal aplati : la facette colique ;

- un bord dorsal régulier et arrondi ;

- un bord ventral crénelé (figure 18).



**Figure 18 : la surface viscérale de la rate** (d'après Gray, Henry. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918)

La rate est entourée de péritoine, puis d'une capsule conjonctive envoyant des travées qui s'étendent dans le parenchyme. Trois parties peuvent être distinguées dans le parenchyme : la pulpe rouge, la pulpe blanche et la zone marginale :

- la pulpe rouge est plus étendue, c'est un réseau de sinus veineux et de cordons cellulaires (cordons de Billroth). Les cordons contiennent des plasmocytes, des macrophages, des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes. Les cordons s'étendent entre les sinus. C'est dans la pulpe rouge que les érythrocytes trop âgés ou anormaux sont éliminés.

- La pulpe blanche regroupe les tissus lymphoïdes sous forme d'amas (corpuscules de Malpighi) autour des rameaux artériels. Les lymphocytes T sont majoritaires dans la pulpe blanche.
- La zone marginale est à la jonction de la pulpe rouge et blanche. Elle contient des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes B formant des follicules (figure 19).

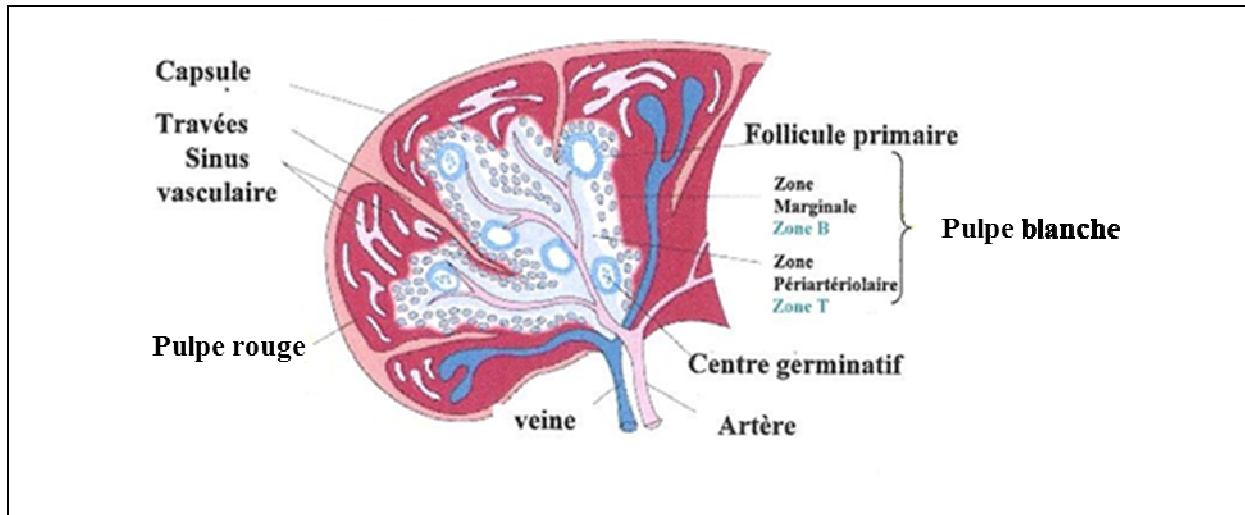


Figure 19 : Coupe transversale de la rate.

La rate est considérée comme le plus important des filtres du sang de l'organisme. Elle a deux rôles principaux, le premier consistant à retirer de la circulation sanguine et de détruire les érythrocytes trop âgés ou anormaux ainsi que les débris cellulaires et les microorganismes (Kraal 1992 ; Steiniger and Barth 2000) ; le deuxième est la participation à la réponse immunitaire de l'organisme.

Elle reçoit une grande quantité de sang par l'artère splénique et elle est drainée par la veine splénique dans le système porte. Sa structure permet l'existence de contacts étroits entre la circulation sanguine et les cellules immunitaires. La rate est un lieu important pour la capture d'Ag, la pulpe rouge est un filtre à Ag et la pulpe blanche sert à la réponse immunitaire. Ainsi elle peut répondre à des infections systémiques. Les Ag sont amenés à la rate par l'artère splénique, ils pénètrent dans celle-ci par les ramifications de l'artère jusqu'aux manchons périartériels. Ils entrent en contact avec des CPA, les cellules dendritiques. Ces dernières vont présenter l'Ag aux lymphocytes T (Attanavanich and Kearney 2004), ou aux lymphocytes B par le biais des cellules dendritiques folliculaires de la zone marginale et vont ainsi permettre la production de plasmocytes (Mebius and Kraal 2005). La répartition tissulaire des populations lymphocytaires dans la rate humaine est la suivante : 30-40% lymphocytes T, 50-60% lymphocytes B, 1-5% lymphocytes NK.

C'est également un organe effectuant beaucoup de phagocytose de part l'activité des macrophages spléniques capturant les antigènes circulants dans le sang. La rate permet de

déclencher deux types de réponse immunitaire : une réponse innée ou une réponse adaptative. La pulpe blanche est impliquée uniquement dans la réponse immune adaptative, alors que la zone marginale peut déclencher les deux types de réponses (présence de macrophages et de lymphocytes B).

Le rôle crucial de la rate dans la détection des antigènes et la protection de l'organisme a été démontré dans des études de splénectomie sur l'animal ou des études cliniques chez l'Homme. Sans rate, l'organisme répond de manière moins appropriée à l'antigène ce qui rend les personnes plus susceptibles aux infections.

### ***3.2.3 Rôle de la rate dans l'inflammation***

La rate est innervée par le nerf splénique qui contient une majorité de fibres nerveuses sympathiques. L'innervation postganglionnaire noradrénergique prend naissance dans le ganglion mésentérique coélique. Ces fibres nerveuses entrent dans la rate autour de l'artère splénique, elles sont retrouvées dans les zones lymphoïdes T et B.

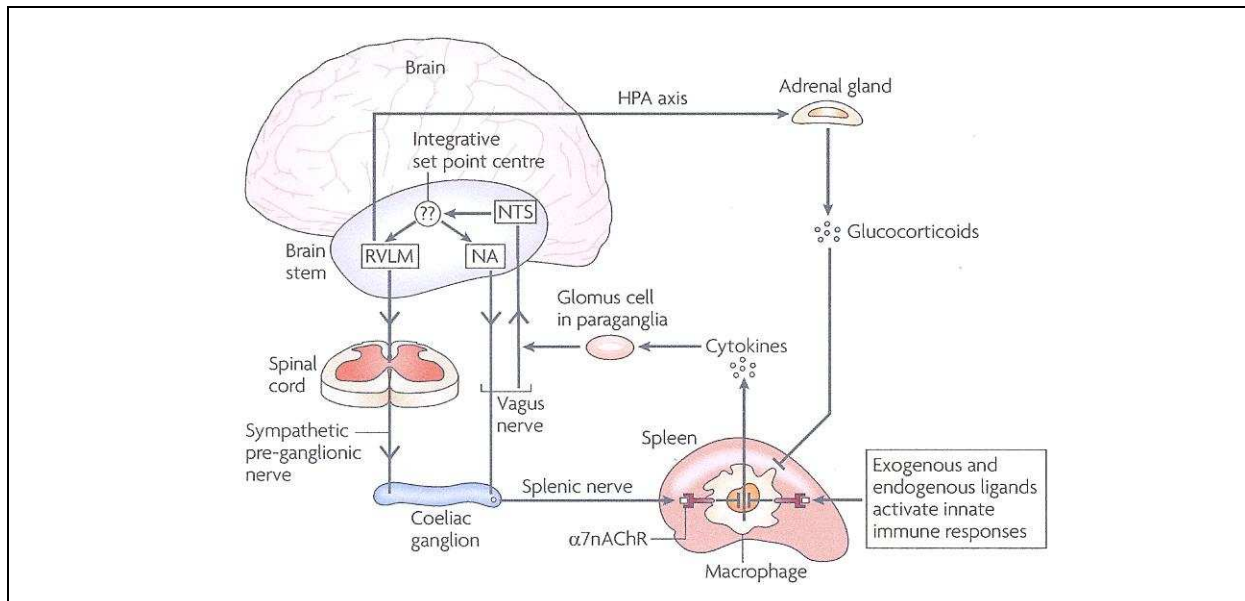
L'innervation parasympathique de la rate reste un point de controverse (Brandon and Rand 1961). Certaines études démontrent l'innervation directe de la rate par le NV (Buijs et al. 2008; Chen et al. 1996) pendant que d'autres décrivent une innervation indirecte (Bellinger et al. 1993 ; Nance and Sanders 2007 ; Rosas-Ballina et al. 2008). L'étude de Rosas-Ballina et al. propose une innervation indirecte de la rate par le NV qui modulerait le fonctionnement du nerf splénique par les récepteurs nicotiques sur le ganglion mésentérique coélique supérieur (Rosas-Ballina et al. 2008). Ceci induirait la stimulation des récepteurs adrénérgiques se trouvant à la surface des cellules immunitaires spléniques. Les travaux de Bellinger et al. montrent que les fibres nerveuses du NV atteignent le ganglion coélique où se trouvent les corps cellulaires des axones du nerf splénique et où les fibres du NV forment des synapses (Bellinger et al. 1993 ; Berthoud and Powley 1993 ; Berthoud and Powley 1996). Les fibres du nerf splénique maîtrisent alors la réponse immunitaire de la rate sous le contrôle du NV.

Dans l'étude réalisée par Buijs et al., il a été démontré, en utilisant une technique de traceur rétrograde injecté dans la rate et une analyse des neurones positifs au virus au niveau du SNC et notamment au niveau des neurones parasympathiques du noyau moteur dorsal du vague (DMNV), que la rate est innervée directement (Buijs et al. 2008).

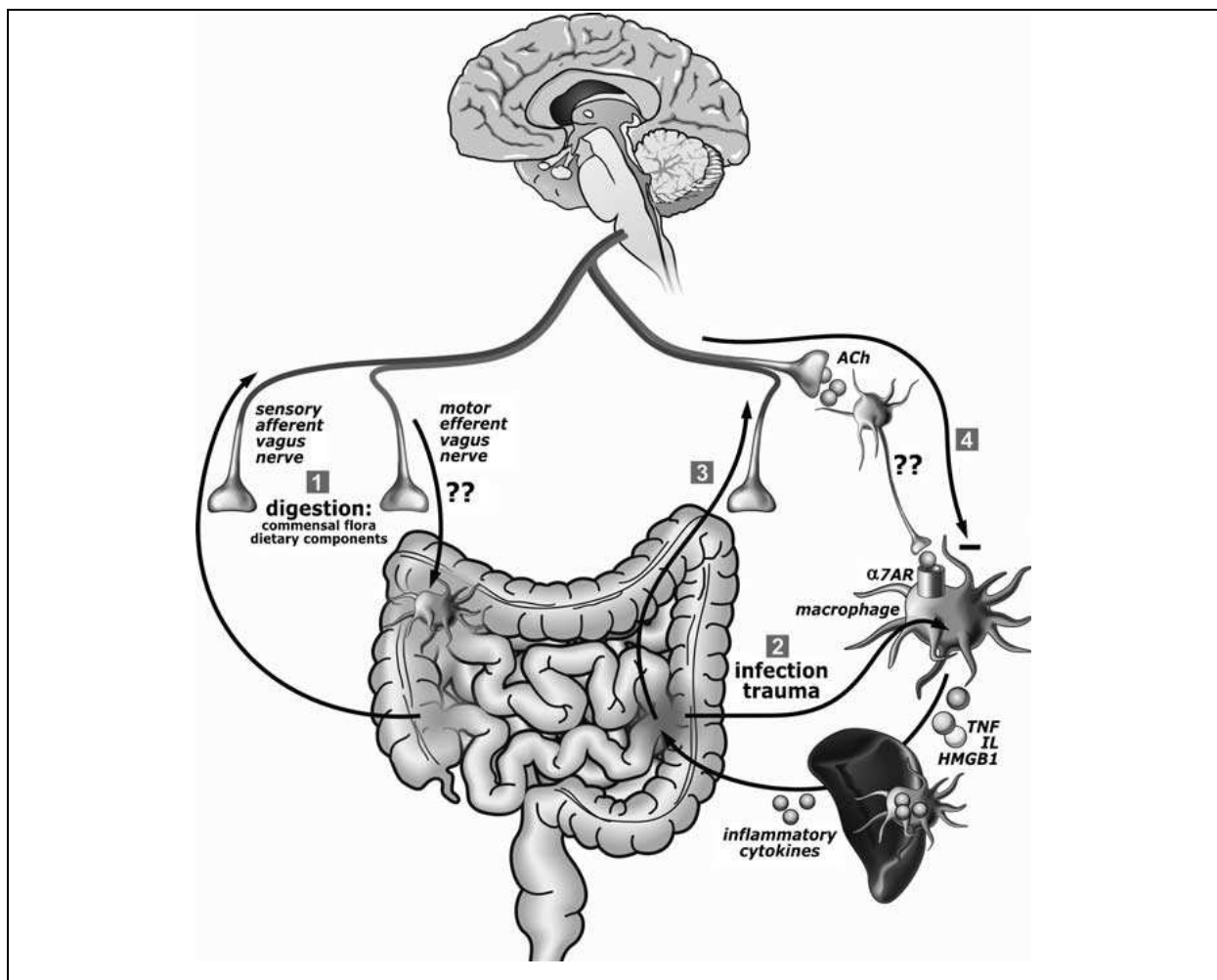
Cependant, même si l'innervation du NV à la rate n'est pas encore déterminée de manière sûre, le NV est capable de moduler l'activité immunitaire de la rate. En effet, lorsque la voie anti-inflammatoire cholinergique est activée, il a été démontré que les potentiels d'actions sont transmis

du NV au ganglion cœliaque et finalement au nerf splénique, permettant ainsi d'obtenir un effet anti-inflammatoire (Huston et al. 2006 ; Rosas-Ballina et al. 2008)

Les travaux de Huston et al. ont montré que la splénectomie chez des rats présentant une endotoxémie létale supprime complètement la diminution de sécrétion de TNF- $\alpha$  après NSV (Huston et al. 2006). Ces travaux ont également permis de mettre en évidence que lorsqu'une vagotomie de la branche cœliaque est réalisée, la NSV ne permet plus d'induire la diminution du TNF- $\alpha$  splénique et sérique. L'effet de la voie anti-inflammatoire cholinergique sur la rate est également dépendant de l'expression du récepteur  $\alpha 7nAChR$ . En effet, la NSV n'induit plus la diminution de TNF- $\alpha$  dans la rate chez des souris déficientes pour le récepteur  $\alpha 7nAChR$ . La rate fait donc partie intégrante de la voie anti-inflammatoire cholinergique (figure 20). La connexion entre le SNC, le NV et la rate permet une modulation de la réponse immunitaire rapide et précise. Celle-ci donne la possibilité de réguler l'inflammation en périphérie notamment au niveau intestinal (de Jonge and Ulloa 2007) (figure 21). Les macrophages ont été identifiés comme étant une source majeure de TNF- $\alpha$  et sont considérés comme étant la cible principale de la voie anti-inflammatoire cholinergique ; cependant d'autres cellules immunitaires sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (les lymphocytes, les cellules dendritiques) et le NV pourrait également moduler le fonctionnement de ces cellules. Effectivement, une étude récente (Huston et al. 2009) a mis en évidence qu'une activation pharmacologique par de la nicotine de la voie anti-inflammatoire cholinergique induit une diminution de manière dose dépendante de CD11b (molécule d'adhésion cellulaire et de chimiotactisme des leucocytes) exprimée à la surface de neutrophiles. La stimulation du NV peut avoir cet effet seulement si la rate est innervée. Une étude plus récente, (Karimi et al. 2010) a confirmé que l'effet du NV ne semble pas limité à son action sur les macrophages mais peut également avoir un rôle sur les lymphocytes spléniques. Cette étude met en avant le fait que le NV a un effet inhibiteur sur l'activité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spléniques. La vagotomie provoque une augmentation importante dans la prolifération et la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en culture cellulaire après stimulation (CD3/CD28) par rapport aux lymphocytes provenant des animaux non vagotomisés. Ces travaux ont également montré que l'effet du NV sur les lymphocytes est également médié par les récepteurs nicotiques. La nicotine induisait une atténuation de la prolifération et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après vagotomie ; néanmoins il semblerait que le récepteur  $\alpha 7nAChR$  ne soit pas primordial, un autre récepteur nicotinique pourrait être impliqué. Il a été décrit ultérieurement que le NV pouvait également provoquer l'effet anti-inflammatoire par le récepteur nicotinique  $\alpha 4\beta 2$  présent sur les macrophages et les lymphocytes (Matsunaga et al. 2001 ; van der Zanden et al. 2009).



**Figure 20 : relations entre la rate et le SNC dans la régulation de l'inflammation (d'après (Tracey 2009)).** NTS : noyau du tractus solitaire ; NA : noyau ambigu ; RVLM : rostral ventrolateral medullary.



**Figure 21 : les interactions du NV avec le TD (d'après (de Jonge and Ulloa 2007)).** 1 : pendant la digestion : activation des afférences vagales afin de transmettre l'information au SNC. 2 : pendant une infection : activation de la voie anti-inflammatoire cholinergique, 3 : les afférences signalent la présence de l'infection au SNC, 4 : les efférences vagales contrôlent la réponse inflammatoire impliquant la présence de la rate.

## 4. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Les MICI sont représentées par deux pathologies principales : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). La prévalence des MICI en France s'élève à environ 1/1000 habitants. Les MICI représentent un problème de santé publique.

Ce sont des pathologies inflammatoires chroniques du tube digestif. Elles peuvent se déclencher à tout âge. Elles évoluent par phases de poussées inflammatoires entrecoupées de phases de rémission. L'étiopathogénie des MICI reste mal connue et multifactorielle : génétique, environnementale (stress) (Gareau et al. 2008) et immunitaire (Fiocchi 1998). Un déséquilibre entre le système parasympathique et sympathique a été démontré chez les patients atteints de MICI (Sharma et al. 2009; Taylor and Keely 2007). Une dysautonomie sympathique est retrouvée dans la MC et vagale dans la RCH (Pellissier et al. 2010).

Les MICI provoquent une diminution de la tolérance immunitaire face aux molécules du soi (bactéries de la flore intestinale) qui induit une réponse immunitaire démesurée et non régulée (Fiocchi 1998 ; Sartor 2006). Cette réponse immunitaire inadaptée attaque la muqueuse intestinale et provoque une inflammation (Haroon et al. 2012). Cette réaction provient d'un déséquilibre de la balance Th1/Th2 et Th17/Treg (Veltkamp et al. 2011). Dans le cas de la MC il a été démontré qu'un excès de Th1/Th17 est présent alors que, pour la RCH, c'est un excès de Th2 qui est observé (Sanchez-Munoz et al. 2008).

Des études ont mis en évidence le rôle de l'environnement dans le déclenchement des MICI, une forte augmentation des MICI ayant pu être observée dans les pays industrialisés et nouvellement industrialisés (Pang et al. 2007). Le stress est révélé comme facteur de risque de la pathogénie des MICI (Bernstein 2010; Collins 2001 ; Reber et al. 2006 ; Tang et al. 2008).

Une prédisposition génétique existe, le gène NOD2/CARD15 ayant été identifié comme gène de susceptibilité (Fritz et al. 2011; Van Limbergen et al. 2009). Toutefois, seulement un patient sur cinq ayant cette susceptibilité génétique est atteint de MC «familiale». Ce gène est exprimé par de nombreuses cellules : les cellules immunitaires ainsi que les cellules de Paneth et les cellules épithéliales. Le rôle exact de ce gène reste encore mal connu (Berrebi et al. 2003).

### 4.1 Atteintes digestives

Dans la MC, l'inflammation peut toucher l'ensemble du TD (en particulier l'intestin grêle et le côlon) ; elle s'étend à travers toutes les couches de la paroi intestinale, elle est dite transpariétale

(Freeman 2003). La muqueuse est infiltrée par des monocytes et des LT principalement. Contrairement à la MC, la RCH est localisée au niveau du rectum et/ou du côlon et l'atteinte de la paroi intestinale est plus superficielle (Jonsson et al. 2007). La muqueuse présente une infiltration de neutrophiles, particulièrement dans les cryptes (Nikolaus and Schreiber 2007). La perméabilité intestinale est augmentée chez les patients atteints de MC (Wyatt et al. 1997). Les MICI sont des facteurs à risque pour le développement de cancers colorectaux. En effet il a été démontré que les cellules infiltrantes (neutrophiles, monocytes, lymphocyte T) activées sécrètent des médiateurs à l'origine de dommages de l'ADN induisant le développement de cancers (Eaden et al. 2001). La prévention du cancer colique chez les patients atteints de MICI relève d'un dépistage protocolisé. Un regain d'intérêt concernant la cicatrisation rapide de la muqueuse apparaît car si la muqueuse est cicatrisée rapidement le risque de cancer est diminué.

## **4.2 Symptômes**

Les symptômes intestinaux les plus fréquents sont la diarrhée causée par l'inflammation de la muqueuse intestinale et la douleur. Concernant la RCH les diarrhées sont souvent hémorragiques ce qui est très peu fréquent pour la MC. Des complications peuvent accompagner ces symptômes tels que des abcès, des fistules, des sténoses ou des occlusions dans la MC. Elles peuvent être révélatrices de la maladie. Une perte de poids importante, un retard staturo-pondéral chez l'enfant ainsi que de l'anémie sont également observées.

## **4.3 Traitements**

De nos jours les traitements sont soit pharmacologiques soit chirurgicaux. Les traitements pharmacologiques sont répartis en quatre groupes principaux : les salicylés tels que les 5-aminosalicylés en premier lieu ; puis les corticoïdes lorsque la pathologie évolue (par exemple en période de poussées sévères) ; les immunosuppresseurs sont ensuite utilisés couramment dans le traitement d'entretien de la MC et plus rarement de la RCH ; et finalement les biothérapies anti-TNF- $\alpha$  sont administrées en cas d'échec thérapeutique ou pour les formes sévères (effets secondaires assez importants, notamment des infections) (Banovic et al. 2009 ; Larauche et al. 2011). C'est la stratégie appelée «step-up», la question actuelle est le «top-down» c'est-à-dire commencer par des traitements plus forts afin de favoriser une cicatrisation plus rapide et de limiter l'évolution vers des formes compliquées.

Le traitement chirurgical est réservé aux patients ayant développé des complications ou des cancers et aux formes réfractaires au traitement. Par contre ce traitement est suspensif, en effet il provoque un soulagement rapide mais n'empêche pas l'atteinte d'autres parties du tube digestif. Environ 90% des patients atteints de MC sont opérés au moins une fois. La chirurgie est plus rare pour la RCH, elle est réalisée pour les formes suraiguës.

#### **4.4 Modèles expérimentaux d'inflammation colique**

Afin d'étudier les MICI et des nouvelles cibles thérapeutiques, des modèles d'inflammation digestive ont été élaborés depuis plusieurs décennies.

Plusieurs modèles ont été développés, différents agents chimiques peuvent être administré (DSS (*dextran sulfate de sodium*), TNBS (*acide trinitrobenzène sulfonique*), acide acétique, sensibilisation par *E. coli*) afin de provoquer une inflammation digestive (Alex et al. 2008; Strober et al. 2002 ; Wirtz et al. 2007). Des modifications génétiques (KO) permettant d'invalider un gène codant pour des cytokines telles que l'IL-2 ou l'IL-10 ou des protéines de signalisation cellulaire telle que STAT4 ont également été développées chez des souris permettant d'obtenir des modèles de colites (Schultz et al. 1999 ; Strober et al. 2002; Wirtz et al. 1999).

Pour ce travail nous avons choisi d'utiliser un modèle d'inflammation digestive aiguë couramment utilisé et reconnu comme modèle animal représentant la MC. Ce modèle consiste en l'injection intra-colique d'un agent chimique dénaturant, le TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique). Cet haptène, est mélangé avec de l'éthanol afin de faciliter sa diffusion à travers la muqueuse (Meregnani et al. 2011; Tateishi et al. 1997). Le TNBS provoque des modifications des protéines de l'hôte et ainsi entraîne une attaque des tissus digestifs par la réponse inflammatoire induite (Miceli and Jacobson 2003; Morris et al. 1989) . Les lésions ainsi provoquées sont très proches des lésions retrouvées chez les patients atteints de MC, elles sont transpariétales et intenses.



# III. PARTIE 1 : ETUDE DES EFFETS CENTRAUX DE LA NEUROSTIMULATION VAGALE SUR UN MODELE DE RAT SAIN ANESTHESIE

# **1. Résumé de l'étude 1 : étude des effets centraux de la NSV sur un modèle de rat sain anesthésié**

## **1.1 Objectif de l'étude**

Cette première étude a consisté en l'analyse du retentissement de la NSV basse fréquence (5 Hz) sur le SNC. Cette étude a été réalisée par imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) afin de visualiser en temps réel les effets de la NSV. L'objectif était de mettre en évidence le mécanisme d'action de la NSV basse fréquence afin d'étudier si l'effet anti-inflammatoire obtenu suite à la NSV est consécutif à une action directe ou bien indirecte médiée par le SNC. En effet, la NSV basse fréquence est reconnue pour stimuler préférentiellement les afférences vagales ; cependant la question initiale de cette étude était de savoir si la NSV basse fréquence ne stimulerait pas également les afférences vagales et aurait donc un effet sur le SNC.

## **1.2 Matériels et méthodes**

L'étude a été réalisée sur des rats Sprague-Dawley mâles. L'électrode de stimulation était placée sous anesthésie gazeuse (isoflurane) au niveau de la partie cervicale du nerf vague gauche. Les paramètres de stimulation utilisés étaient les suivants : 1 mA ; 5 Hz ; 0,5 msec ; périodes ON : 9 sec/min pendant 10 min. Les acquisitions d'IRMf ont été réalisées avec un système Brüker 4,7 Tesla, sur des rats sédatisés par du Dexdomitor (arrêt de l'anesthésie gazeuse). Pour mettre en évidence les activations BOLD liées à des modifications cardiovasculaires un contrôle a été réalisé : injection d'éphédrine (vasoconstricteur). Afin d'évaluer les rôles respectifs des afférences et des efférences vagales des vagotomies cervicales (au-dessus ou en dessous de l'électrode) ont été effectuées.

## **1.3 Résultats**

Les déactivations les plus significatives ont été observées après NSV au niveau des structures sous-corticales telles que la partie antérieure du noyau du tractus solitaire, du locus coeruleus, des noyaux parabrachial et vestibulaire, du colliculus inférieur ou du cervelet.

Aucune variation significative du signal BOLD ou des paramètres cardio-respiratoires n'a été mesurée après stimulation des efférences vagales. A l'inverse, la stimulation des afférences a induit les mêmes cartes de déactivations que celles obtenues chez les rats non vagotomisés.

En présence d'éphédrine, l'augmentation de la fréquence cardiaque est associée à une activation du signal BOLD, principalement localisée dans le locus coeruleus, la substance grise périaqueducale, le cervelet, le thalamus, l'insula et le cortex cingulaire.

La superposition des différentes cartes d'activations/déactivations a mis en évidence des structures déactivées uniquement par la NSV : le NTS, la partie antérieure du septum, la partie antérieure du cortex moteur, la partie postérieure et basale du cervelet.

#### **1.4 Conclusion**

Ces données montrent que certaines structures du SNC sont modulées par les afférences vagales lors de la NSV 5 Hz et pourraient indirectement participer à la régulation de l'inflammation digestive. L'effet anti-inflammatoire périphérique induit par la NSV 5 Hz ne serait donc pas uniquement dû à l'activation des afférences vagales lors de la NSV mais également à l'action des afférences vagales et du SNC.

## 2. Objectif de l'étude

Cette première étude a consisté à analyser les effets de la NSV basse fréquence (5 Hz) au niveau du système nerveux central (SNC) du rat. Elle a été réalisée afin de déterminer si la NSV basse fréquence, qui est déjà reconnue pour avoir un effet anti-inflammatoire périphérique en activant préférentiellement les afférences vagales (Bernik et al. 2002a; Borovikova et al. 2000b; Tracey 2007) n'activerait pas également les afférences vagales et aurait donc un rôle sur le SNC. Afin de visualiser en temps réel les effets de la NSV, la technique d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle a été utilisée. Cette expérimentation a fait l'objet d'une publication dans *Neuroimage*, en octobre 2010, «Dynamic Causal Modelling and physiological confounds: a functional MRI study of vagus nerve stimulation» (Picq et al. 2010).

## 3. Matériels et méthodes

### 3.1 Animaux

L'expérimentation a été réalisée sur 30 rats Sprague-Dawley mâles de 250 à 300g (Charles River, France). De nombreuses études sur la NSV (Bernik et al. 2002b ; Borovikova et al. 2000b ; de Jonge et al. 2005 ; Guarini et al. 2003; Meregnani et al. 2011) ainsi que sur l'inflammation colique (Miceli and Jacobson 2003; Morris et al. 1989) ont été effectuées chez le rat, modèle de référence pour ce genre d'investigation. C'est pourquoi nous avons choisi cette espèce animale pour les différentes expérimentations.

Avant toute manipulation, les animaux ont eu une période d'acclimatation à leur environnement de 7 jours.

Ils étaient hébergés dans des conditions de stabulation contrôlées :

- Température :  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ,
- Hygrométrie :  $50 \pm 10\%$ ,
- Cycle nyctéméral : 12 h/12 h, lumière de 8 h à 20 h, obscurité de 20 h à 8 h,
- Litière : copeaux de bois, changée 3 fois par semaine,
- Nourriture et eau : *ad libitum*.

### 3.2 Anesthésie

Les rats étaient anesthésiés par anesthésie gazeuse (système Minerve®, France). La phase d'induction était réalisée avec un mélange mixte : 3,5% d'isoflurane et 3l/min d'oxygène; lorsque l'animal était bien endormi (fréquence respiratoire d'environ 60/min) il était ensuite déplacé sur la table opératoire qui permet également de maintenir l'anesthésie (2,5% d'isoflurane et 1l/min d'oxygène).

### 3.3 Chirurgie

Tout au long de la chirurgie, la fréquence cardiaque et la saturation en oxygène étaient surveillées (système Nonnin - France). La température de l'animal était également maintenue à 37°C grâce à une couverture chauffante reliée à une sonde rectale (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard).

La phase chirurgicale a consisté en la mise en place de l'électrode de stimulation vagale (électrode animale bipolaire, Cyberonics®, France) (figure 22) au niveau de la portion cervicale du nerf vague (NV) (gauche ou droit) avec la technique d'implantation validée auparavant (Meregnani et al. 2011). L'implantation était effectuée sur les rats anesthésiés. Les animaux étaient préalablement rasés au niveau du triangle cervico-scapulaire ventral. Une incision au scalpel de la peau entre la mâchoire et la clavicule (1,5 cm) (figure 23 A) était réalisée pour permettre l'abord et la dilacération des muscles peauciers du cou. Puis, après avoir récliné les glandes salivaires (figure 23 B), le muscle sterno-cléido-mastoïdien était dilacéré dans le sens des fibres (figure 23 C) afin de dégager la loge carotidienne. Après l'isolement du paquet vasculo-nerveux (figure 23 D), l'électrode était placée autour de ce dernier (pôle positif : inférieur et pôle négatif : supérieur) (figure 23 E). L'électrode était ensuite fixée par un point sur le muscle (Soie F736, Ethicon, Neuchâtel, Suisse) (figure 23 F) et finalement la plaie était suturée par trois points cutanés simples (Vicryl JV452, Ethicon).

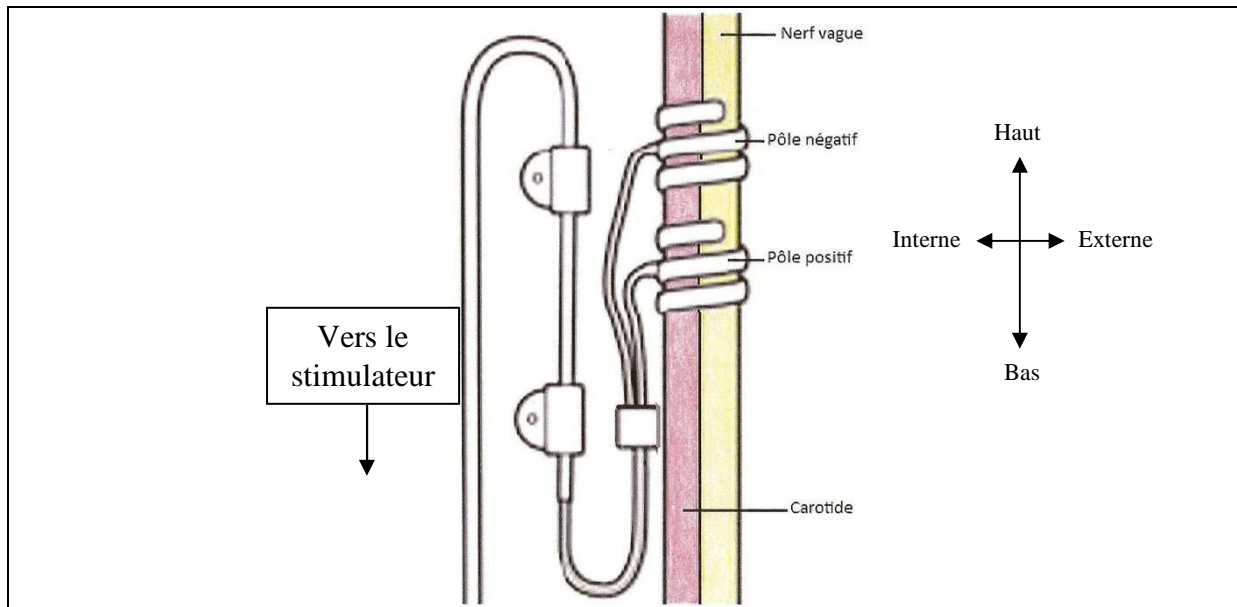


Figure 22 : schéma d'implantation de l'électrode de stimulation (Cyberonics) du nerf vague gauche.

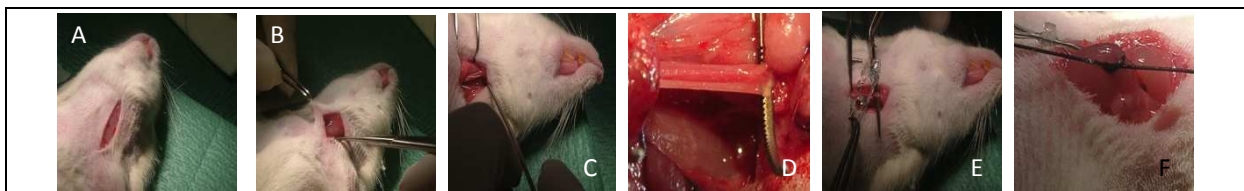


Figure 23 : les différentes phases chirurgicales de la mise en place de l'électrode de stimulation.

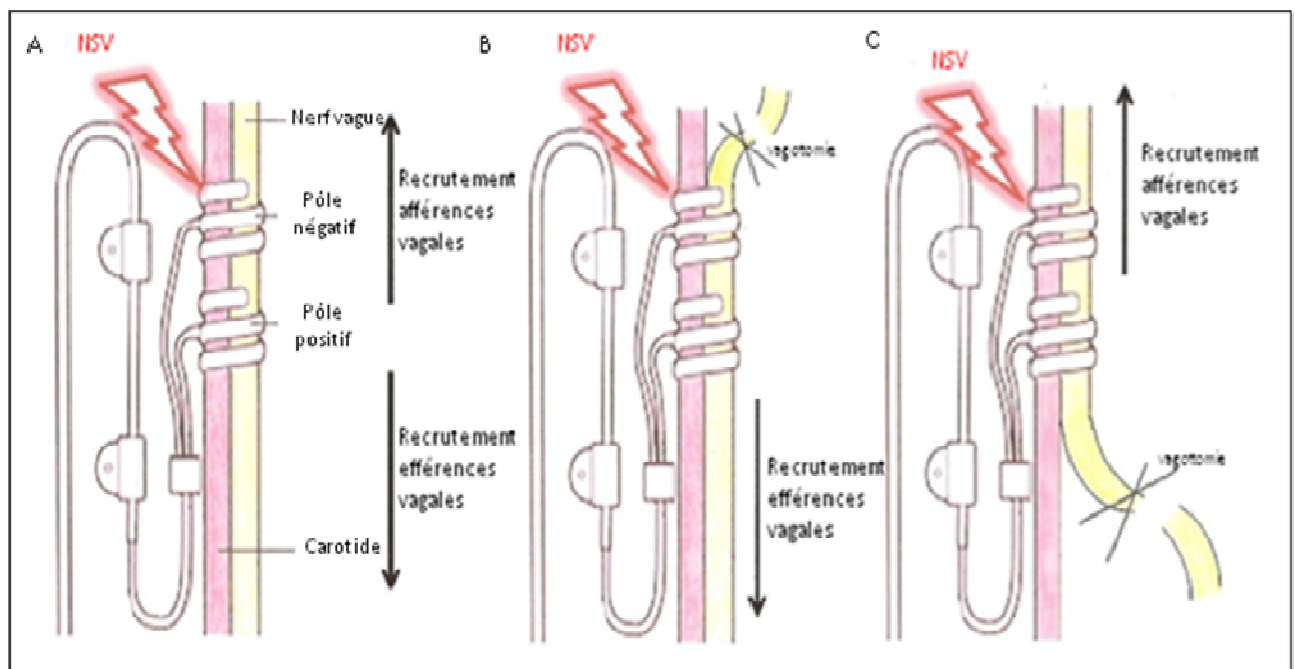
### 3.4 Contrôles réalisés pour cette expérimentation

#### 3.4.1 Effets de la NSV sur la fréquence cardiaque

Lors d'une étude préliminaire à l'étude par IRM fonctionnelle, l'électrocardiogramme de plusieurs rats anesthésiés (n=12) a été enregistré afin d'étudier l'effet de la NSV sur la fréquence cardiaque : à cet effet, trois aiguilles très fines (Vycon, 0,4 mm de diamètre) ont été placées en position sous-cutanée : une en regard de la pointe du cœur, une en position sous-claviculaire (droite) et la dernière sur la patte inférieure droite (type de dérivation DII). Ces aiguilles étaient reliées à un système d'acquisition Biopac MP150 (Cerom) comportant un amplificateur ECG 100C. Le logiciel AcqKnowledge® version 3.8.2 permet la visualisation, l'enregistrement du signal ECG (fréquence d'échantillonnage 2 kHz), et le calcul en temps réel de la fréquence cardiaque. Une voie permettait également de visualiser et d'enregistrer simultanément le signal de stimulation. Les rats, pendant cette étude sur la fréquence cardiaque, ont été stimulés selon deux protocoles différents : 1°) une stimulation avec une intensité de 1 mA, à fréquences croissantes (5 Hz, 10 Hz, 20 Hz), 3 min ON et 10 min OFF (n=6) du NV gauche puis du NV droit (ou inversement), ou 2°) trois heures de stimulation du NV gauche avec les paramètres de stimulation suivants : 1 mA, 5 Hz, 10 s ON et 90 s OFF (n=6).

### 3.4.2 Vagotomie

Lors de l'expérimentation par IRM fonctionnelle, afin d'évaluer l'effet de la stimulation des afférences ou des efférences vagales uniquement au niveau du SNC, une série de vagotomies cervicales a été effectuée. Pour procéder à la vagotomie, une fois l'électrode de stimulation placée sur le paquet vasculo-nerveux, le nerf vague était dissocié de la carotide et sectionné soit au-dessus de l'électrode (n=2) de stimulation afin de stimuler uniquement les efférences vagales ou en dessous de l'électrode (n=2) afin de stimuler uniquement les afférences vagales (figure 24).



**Figure 24 : vagotomies sélectives.** A : nerf vague intact, B : vagotomie au-dessus de l'électrode, C : vagotomie en dessous de l'électrode.

### 3.4.3 Activation pharmacologique du système cardiovasculaire

Afin de modifier la pression sanguine et de visualiser cet effet au niveau du SNC, des rats (n=7) ont reçu une injection de 0,05 ml d'éphédrine (10 mg/kg) dans la veine de la queue. L'éphédrine est une amine sympathicomimétique qui agit au niveau du SNC en augmentant la sécrétion de noradrénaline des neurones sympathiques. Ces derniers vont alors stimuler les récepteurs alpha et beta adrénergiques cardiaques. L'éphédrine augmente donc la fréquence cardiaque mais provoque également une vasoconstriction périphérique qui induit une augmentation importante de la pression sanguine (Avois et al. 2006).

### 3.5 Stimulation vagale

La chaîne de neurostimulation (Grass®) est constituée d'un stimulateur double S88, qui permet de régler le délai, la durée d'une impulsion élémentaire, ainsi que la fréquence et la durée des trains de stimulation. Chacune des deux voies de sortie du stimulateur (voies S1 et S2) est reliée en série à une unité d'isolement SIU5 et à une unité de courant constant CCU1. Les deux sorties R et B des deux unités CCU1 sont reliées en parallèle et le montage ainsi réalisé (figure 25) a permis d'effectuer une stimulation biphasique (figure 26) à courant constant par l'intermédiaire de l'électrode de stimulation bipolaire.

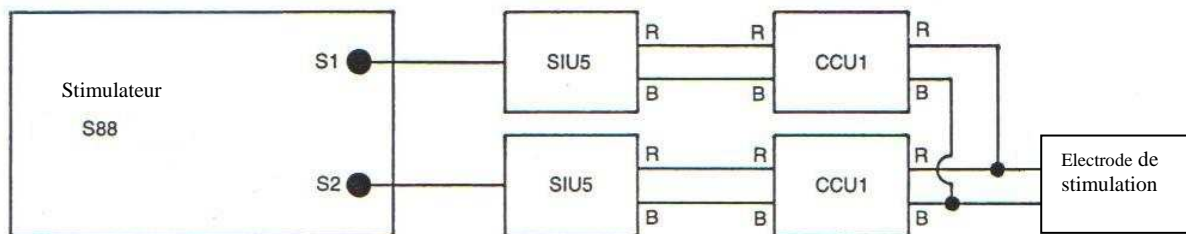


Figure 25 : schéma de la chaîne de stimulation (manuel d'instructions Grass Instrument Division).

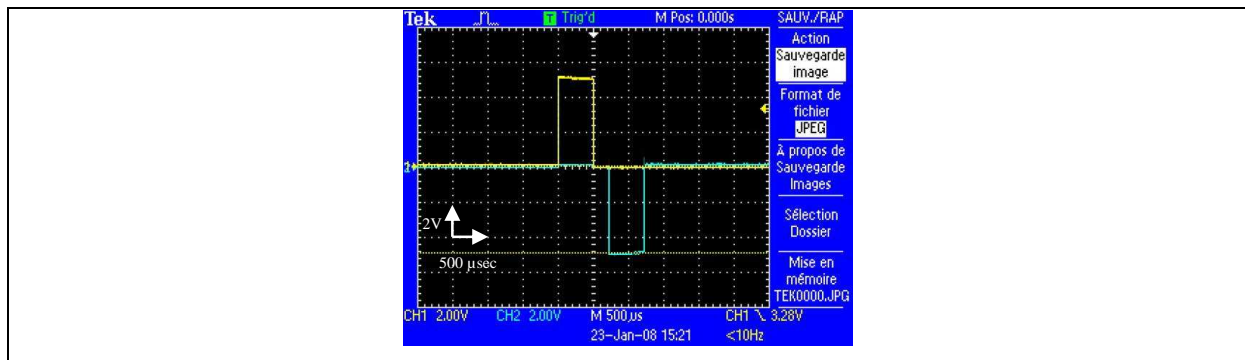


Figure 26 : visualisation à l'oscilloscope du signal de stimulation biphasique.

La figure représente le signal biphasique observé aux bornes d'une résistance de 5 K $\Omega$  simulant l'électrode, traversée par un courant de 1 mA, avec une durée d'impulsion élémentaire de 500  $\mu$ s.

Les paramètres de stimulation, connus pour activer préférentiellement les efférences vagales, adaptés aux séquences d'acquisition de l'IRM, ont été choisis à partir de plusieurs études (Bernik et al. 2002b; Borovikova et al. 2000b; Meregnani et al. 2011; Miceli and Jacobson 2003; Naritoku et al. 1995) et sont les suivants :



- Intensité : 1 mA,
- Fréquence : 5 Hz,
- Durée de pulse : 500  $\mu$ s,
- Trains de stimulation : 9 secondes ON et 51 secondes OFF pendant 10 minutes.

### **3.6 Préparation de l'animal pour l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf)**

Une fois l'électrode de stimulation mise en place, les animaux (n= 8) ont reçu 0,5 ml/kg d'un sédatif, le Dexdomitor® (Pfizer) par voie intra-musculaire lente, l'anesthésie gazeuse était alors immédiatement arrêtée. Ceci permet de maximiser la spécificité des activations *Blood Oxygenation Level Dependent* (BOLD) (Weber et al. 2006) et d'avoir des animaux sédatisés pendant les acquisitions dans l'aimant.

Les animaux ont été alors installés dans un berceau (Bruker, Allemagne) et immobilisés dans un cadre stéréotaxique pour éviter tout mouvement pendant l'examen. La température, la fréquence cardiaque ainsi que la fréquence respiratoire étaient monitorées. Pour maintenir la température de l'animal à 37°C, une couverture chauffante avec de l'eau circulant à l'intérieur reliée à une sonde rectale était glissée sous le rat dans le berceau. Des électrodes étaient placées sur la patte avant droite et arrière gauche de l'animal avec du gel conducteur afin d'enregistrer l'électrocardiogramme (ECG). Ces données physiologiques étaient visualisées par un système de monitoring pour petit animal, compatible avec l'imagerie par résonance magnétique. (Modèle 1025, SA Instruments Inc., New York, USA).

Les animaux étaient ensuite placés dans l'aimant. Ils respiraient librement un mélange d'air/O<sub>2</sub> pendant les expériences qui ne dépassaient pas une heure. A la fin de l'expérience, les animaux étaient de nouveau anesthésiés à l'isoflurane et euthanasiés par une injection de pentobarbital (Dolethal®, 200mg/kg) par voie intra-cardiaque, avant de retirer l'électrode.

### **3.7 Paramètres de l'imagerie par résonance magnétique**

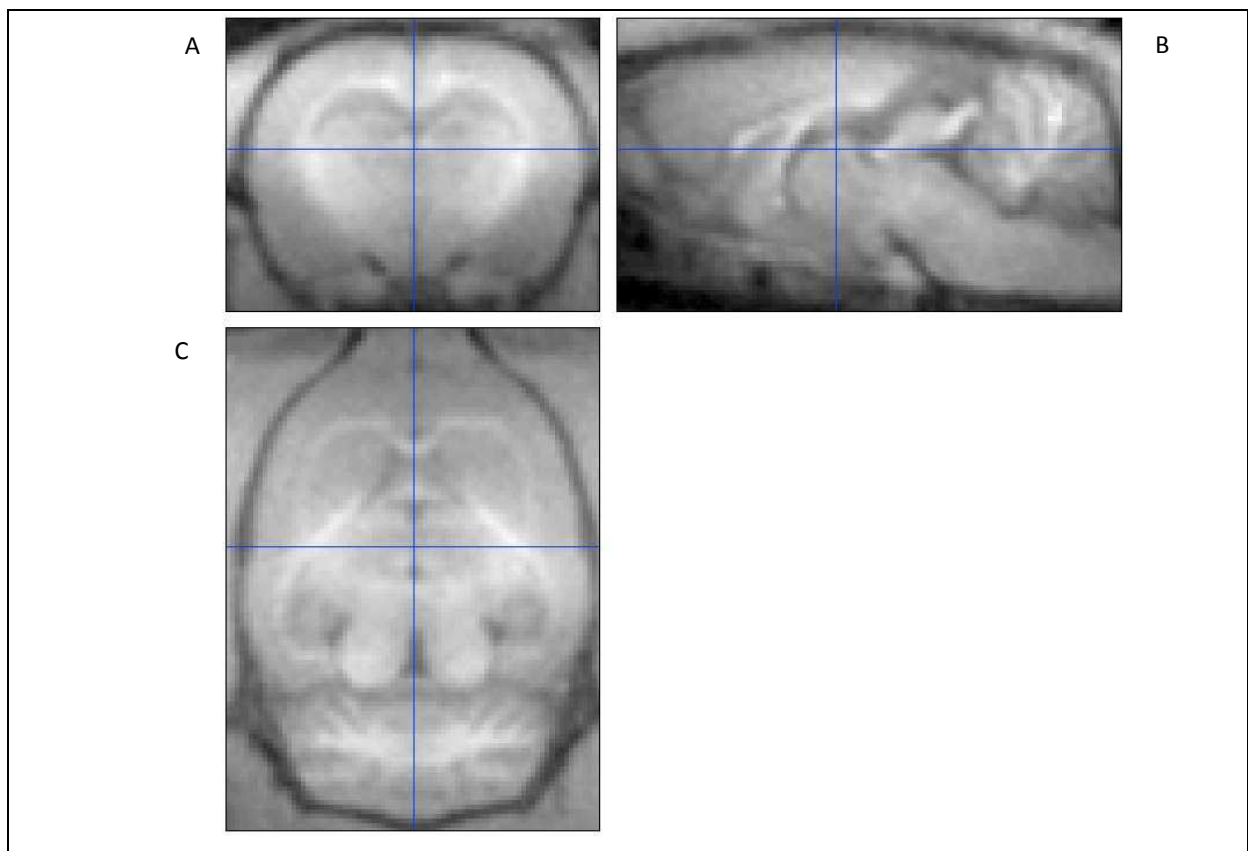
Les expériences ont été réalisées sur un scanner horizontal pour animal 4,7 Tesla Bruker Avance III, équipé d'un système de gradient de 21 cm. La transmission radiofréquence est faite par une bobine de volume de 12 cm de diamètre, et le signal de résonance est reçu avec une bobine de

surface placée sur la tête de l'animal pour permettre un enregistrement optimal du cerveau et du tronc cérébral. Les deux bobines sont découplées l'une de l'autre.

Afin que l'animal soit positionné au centre de l'aimant, des coupes FLASH (*Fast Low Angle Shot*) dans trois directions ont été réalisées. Des images anatomiques étaient réalisées pour la normalisation du cerveau en utilisant une séquence RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*) (figure 27). TE (temps d'écho) = 13,125 ms, TR (temps de répétition) = 5800 ms, facteur RARE = 8, temps d'acquisition = 3 min 30 s.

Une fois que tous les paramètres physiologiques étaient stabilisés, trois sessions d'IRMf de 10 minutes chacune étaient réalisées. Les signaux BOLD étaient obtenus en utilisant des multi-coupes coronales à écho de gradient (EPI) avec les paramètres suivants : TE = 30 ms, TR = 3 s, BW = 200 kHz, angle de bascule : 75, 25 coupes consécutives de 1 mm d'épaisseur ; FOV (champ de vue) = 25,6 x 25,6 mm ; matrice de 64 x 64 pixels, donnant une résolution spatiale de 0,4 x 0,4 x 1 mm.

Un protocole de type block a été utilisé permettant d'alterner les périodes ON et OFF de NSV. La durée de chaque session était de 10 minutes. Les animaux avaient un temps de récupération de 7 minutes entre chaque session.



**Figure 27 : images anatomiques.** Vue des différentes coupes A : coupe coronale B : coupe sagittale, C : coupe axiale.

### 3.8 Analyse des données d'IRMf

L'analyse standard des données d'IRMf a été réalisée sur SPM5 ([www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm](http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm), Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, Functional Imaging Laboratory, Londres, UK). Certains aspects de ce logiciel ont été adaptés à l'imagerie du rat en accord avec (Schweinhart et al. 2003). Les analyses de DCM (*Dynamic Causal Modelling*) ont été réalisées sur SPM8.

Pour chaque session, les volumes EPI étaient d'abord réalignés permettant ainsi de faire une correction du mouvement. Toutes les images étaient normalisées par rapport à un modèle avec les coordonnées choisies d'après l'atlas rat de Paxinos et Watson avec l'origine placée au niveau du bregma (Paxinos et Watson, 1997). Un modèle T2 fourni par (Schweinhart et al. 2003) a été utilisé.

### 3.9 Analyses statistiques des signaux BOLD

Les analyses statistiques des signaux BOLD ont été réalisées sur les images EPI lissées, normalisées et réalignées. Le régresseur d'intérêt a été obtenu en associant le paradigme NSV et la fonction réponse hémodynamique fournie par SPM5. Pour chaque animal les cartes d'activations statistiques  $t$  étaient obtenues. Les activations au niveau du groupe étaient obtenues en utilisant une analyse à effet fixe suivant les recommandations fournies par (Friston et al. 1999). La décision de faire une analyse à effet fixe a été prise en fonction de deux critères : un effectif réduit de rats pour chaque condition (trop faible pour réaliser une analyse à effet aléatoire) et une bonne reproductibilité au niveau des activations entre chaque animal.

### 3.10 La Dynamic Causal Modelling (DCM)

La DCM a été utilisée pour estimer les connectivités neuronales à partir des images obtenues par IRMf en utilisant un modèle biophysique qui lie l'activité synaptique aux processus hémodynamiques. La DCM en IRMf est une équation bilinéaire qui définit la connectivité entre des régions cérébrales (Friston et al. 2003). L'activité synaptique est alors transformée en signaux BOLD en utilisant un modèle hémodynamique. La DCM va procéder à une estimation conjointe des signaux BOLD, de la connectivité neuronale ainsi que des paramètres hémodynamiques. Pour estimer si les activations de la NSV pouvaient être expliquées par la propagation de l'activité neuronale du noyau du tractus solitaire (NTS, noyau d'entrée des afférences du nerf vague dans le système nerveux central), les données temporelles acquises des régions déactivées par la NSV étaient extraites.

Ensuite, en accord avec les déactivations observées, cinq régions d'intérêt ont été délimitées d'après l'atlas rat de Paxinos et Watson 1997. Les régions d'intérêt étaient les suivantes : le noyau du tractus solitaire (NTS), le cortex cingulaire (Cg), le cortex rétrosplénial granulaire (RSG), l'hippocampe antérieur (CA1), et l'insula (AI). Différents modèles avec ces cinq régions d'intérêt ont ensuite été comparés les uns aux autres en utilisant comme premier critère le fait que le NTS soit la première région d'intérêt à être activée par la NSV, puis qu'il y ait des activations bidirectionnelles entre ces régions d'intérêt.

## 4. Résultats

### 4.1 Modulation de la fréquence cardiaque par la NSV

Une étude sur l'impact de la NSV basse fréquence sur la fréquence cardiaque a été réalisée. Différents paramètres de stimulation ont été testés dans le but de déterminer les mieux adaptés permettant de provoquer un minimum de variations de la fréquence cardiaque et d'avoir le moins d'effets physiologiques possibles lors des acquisitions des signaux BOLD dans l'IRM.

#### 4.1.1 Stimulation discontinue (3 minutes ON, 10 minutes OFF) à fréquences croissantes

Les rats (n=6) ont été stimulés à fréquences croissantes (5 Hz, 10 Hz, 20 Hz) sur le NV gauche puis sur le nerf vague droit (ou inversement). Les stimulations duraient 3 minutes et étaient entrecoupées de pauses de 10 minutes. Les données obtenues ont montré un effet direct de la NSV sur la fréquence cardiaque qui se traduit par une diminution de celle-ci (bradycardie). La moyenne de la fréquence cardiaque a été calculée sur une période de 3 minutes lors de la phase témoin (juste avant la première stimulation), pendant les stimulations à 5 Hz, 10 Hz ou 20 Hz. Pour le NV droit il existe une relation entre la fréquence de stimulation et la diminution de la fréquence cardiaque observée (témoin = 404 BPM, 5 Hz = 373 BPM, 10 Hz = 363 BPM, 20 Hz = 347 BPM) (figure 28). En effet la fréquence cardiaque diminuait d'autant plus que la fréquence de stimulation augmentait. Alors que pour le NV gauche, un effet plus faible a été observé (témoin = 407 BPM, 5Hz = 393 BPM, 10 Hz = 393 BPM, 20 Hz = 394 BPM) (figure 29) (la bradycardie induite par la NSV du NV droit à 5Hz était de 19% alors qu'elle n'était que de 6% pour le NV gauche) ainsi qu'une absence de corrélation entre la fréquence de stimulation et la bradycardie provoquée. La stimulation à plus haute fréquence (10 ou 20 Hz) provoquait des effets non-désirés sur la majorité des rats : de longues apnées ou de multiples pauses respiratoires. Ces effets respiratoires n'étaient pas retrouvés pendant la NSV 5 Hz. Pour notre étude, il était important de minimiser les effets cardiovasculaires c'est pourquoi la NSV du NV gauche à la fréquence de 5Hz a été choisie comme paramètre de stimulation pour la suite des expériences. Ceci nous a permis de valider les paramètres de stimulation initialement choisis à partir de données bibliographiques (5 Hz, 1 mA, 500 µsecondes).

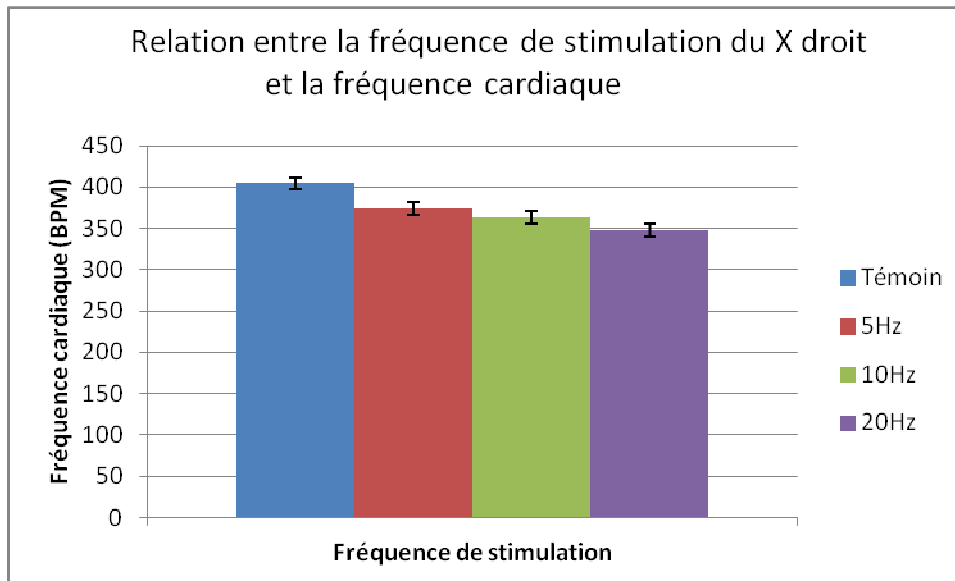


Figure 28 : effet de différentes fréquences de stimulation (5, 10 et 20 Hz) du NV droit (X) sur la fréquence cardiaque moyenne (en battements par minutes) calculée sur une période de 3 min. n=1.

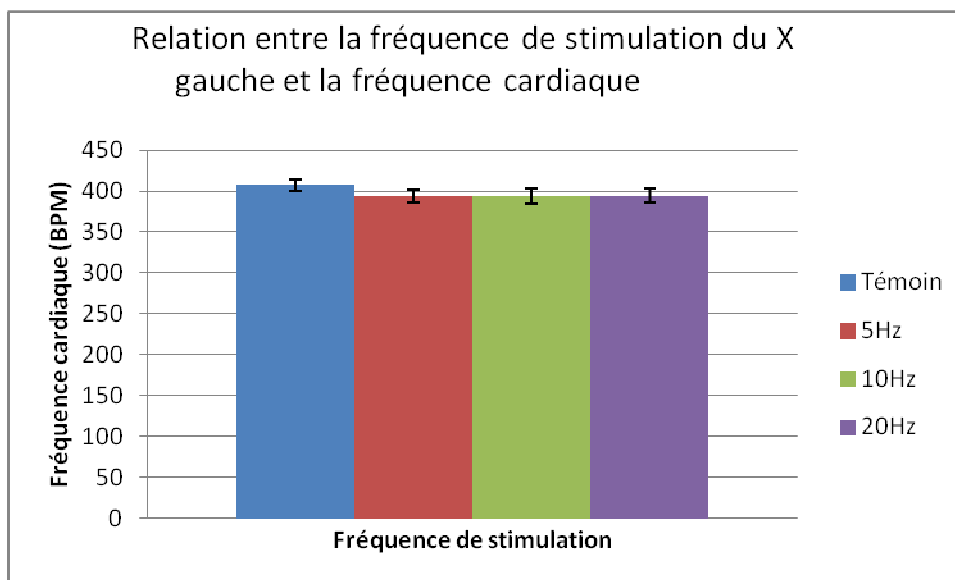
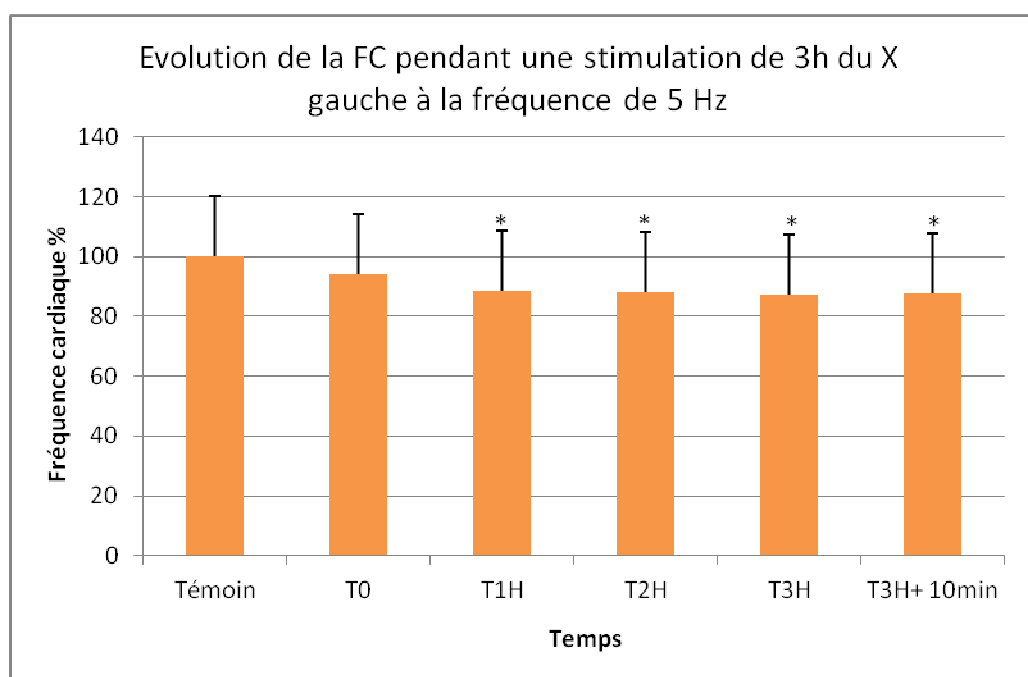


Figure 29 : effet de différentes fréquences de stimulation (5, 10 et 20 Hz) du NV gauche (X) sur la fréquence cardiaque moyenne (en battements par minutes) calculée sur une période de 3 min. n=1.

#### 4.1.2 Stimulation continue pendant 3 heures du nerf vague gauche

Une stimulation pendant 3 heures à la fréquence de 5Hz du nerf vague gauche a ensuite été réalisée sur un second groupe de rats (n=6) afin d'étudier les effets de la NSV continue sur la fréquence cardiaque durant une plus longue période. Les moyennes de la fréquence cardiaque étaient calculées sur 4 cycles de stimulations (400 sec) en phase témoin (avant la première stimulation), dès le début de la stimulation, 1 heure après le début de la stimulation, 2 heures après, 3 heures après et finalement 10 minutes après la fin de la stimulation (figure 30). Une faible diminution de 6% était observée dès le début de la stimulation. Le maximum de la baisse de la

fréquence cardiaque était atteint après 1 heure de stimulation (- 11%). Puis une phase de stabilisation était observée durant les 2 heures suivantes. La diminution de la fréquence cardiaque était significative ( $p < 0,05$ ) à partir de 1 heure après le début de la stimulation jusqu'aux 10 minutes post stimulation (test non paramétrique Wilcoxon). Ces données nous ont confortés dans le choix de stimuler le NV gauche plutôt que le droit pendant des petites périodes (9 sec) pour étudier les effets centraux de la NSV par IRMf afin de limiter les effets cardio-vasculaires et donc des variations retrouvées au niveau des signaux BOLD lors des acquisitions dans l'IRM.

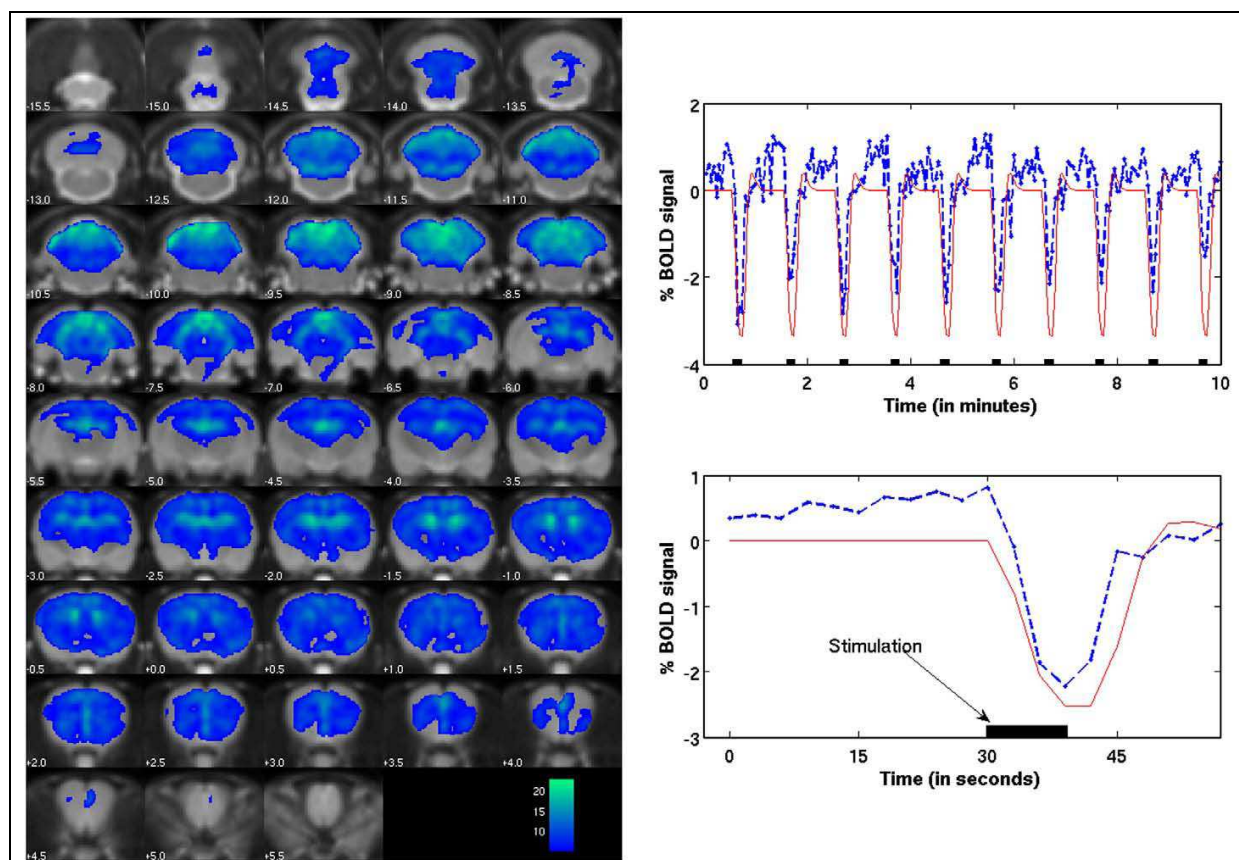


**Figure 30 :** variation de la moyenne de la fréquence cardiaque en fonction du temps : avant (T0), pendant (T1h, T2h et T3h) et après (T3h+10min) stimulation 5 Hz du nerf vague gauche.

#### 4.2 Signaux BOLD lors de la NSV 5Hz

De nombreuses déactivations induites par la NSV ( $p < 0,001$ , FWE (*Family Wise Error Rate*) corrigé) étaient observées au niveau de chaque animal séparément et retrouvées lors de l'analyse de tous les animaux confondus ( $n=8$ ) (figure 31). Par contre aucune activation significative n'était retrouvée, ni au niveau de l'animal ni au niveau du groupe. Lors de l'analyse de groupe il était observé que la plus grande partie du cerveau était déactivée, toutefois les plus fortes déactivations étaient retrouvées principalement dans les structures sous-corticales tel que le noyau du tractus solitaire (NTS) antérieur, le locus coeruleus, le noyau parabrachial et le noyau vestibulaire, dans l'hippocampe antérieur, dans les colliculi inférieur et supérieur, ou dans le cervelet. Les déactivations

corticales les plus significatives se trouvaient dans le cortex rétrosplénial, le prélimbique, l'infrahimbique, l'antérieur cingulaire ainsi que l'insulaire agranulaire.



**Figure 31 : déactivations induites par NSV 5Hz, étude de groupe (n=8).** Gauche: cartes statistiques  $t$  de déactivations ( $p < 0,001$  FWE (Family Wise Error Rate) corrigé). En haut à droite : moyenne de groupe de la variation des signaux BOLD dans le NTS (bleu) superposé au régresseur d'intérêt (rouge) obtenu après convolution de la fonction réponse hémodynamique avec la stimulation (noir). En bas à droite : moyenne de toutes les stimulations.

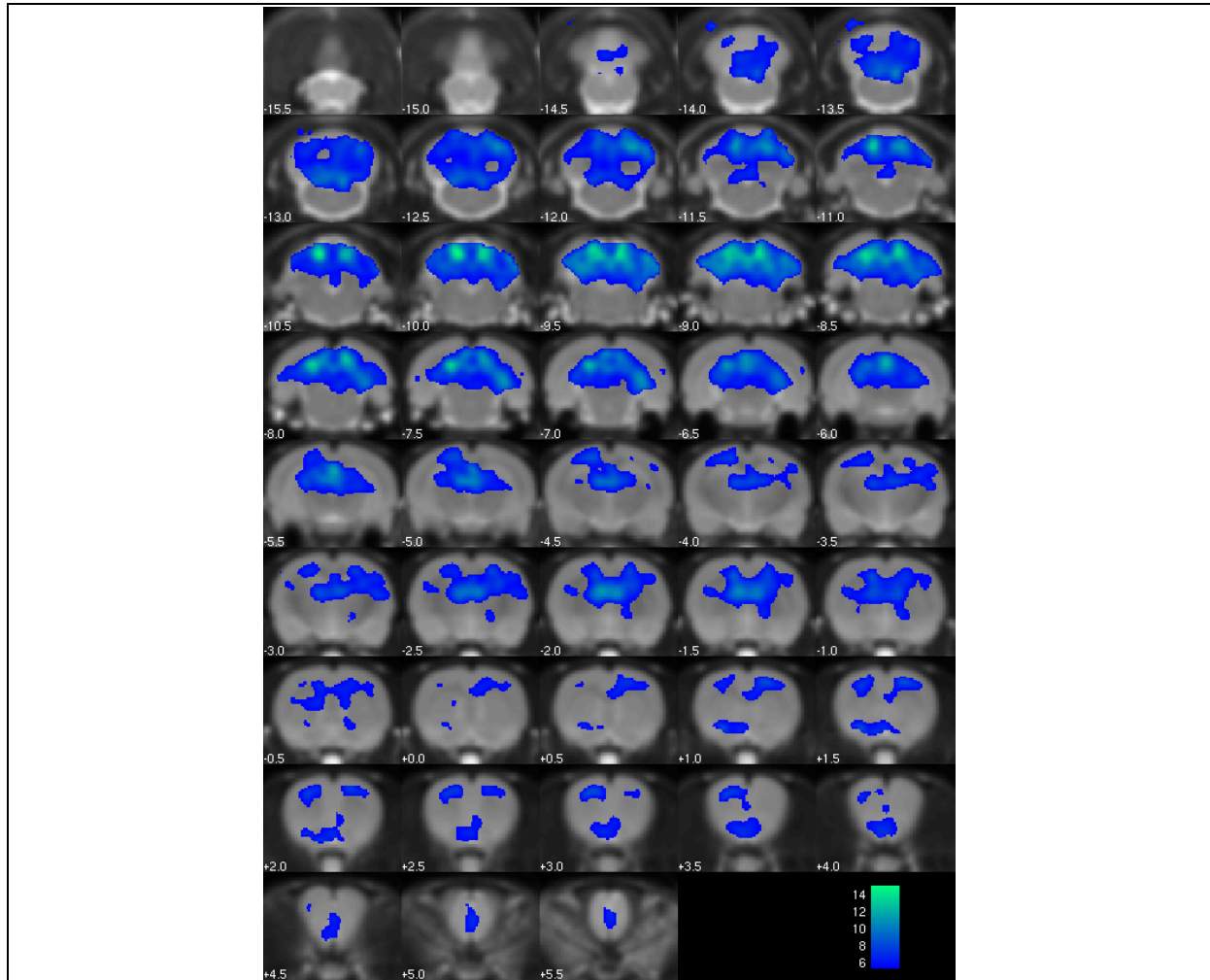
Afin de déterminer si les déactivations observées étaient provoquées par un changement hémodynamique dû à une diminution de la fréquence cardiaque entraînant donc une variation du signal BOLD ou également à une activité neuronale induite par la NSV basse fréquence, différents contrôles ont été également réalisés : des vagotomies cervicales sélectives et une activation pharmacologique du système cardiovasculaire.

#### 4.2.1 Vagotomies

Deux types de vagotomies cervicales ont été réalisées : vagotomie au-dessus de l'électrode de stimulation (donc stimulation des efférences vagues uniquement) ou vagotomie en dessous de l'électrode (stimulation des afférences vagues uniquement). Lorsque la NSV était appliquée aux efférences du nerf vague gauche (vagotomie au-dessus de l'électrode) (n=2), aucune modification n'était observée au niveau des signaux BOLD ni au niveau de l'activité cardiaque et respiratoire. A



l'inverse, lorsque la NSV était appliquée aux afférences vagales (vagotomie en dessous de l'électrode) (n=2), les cartes d'activations neuronales ainsi que la fréquence cardiaque étaient modifiées comme observé chez les animaux non vagotomisés (figure 32).

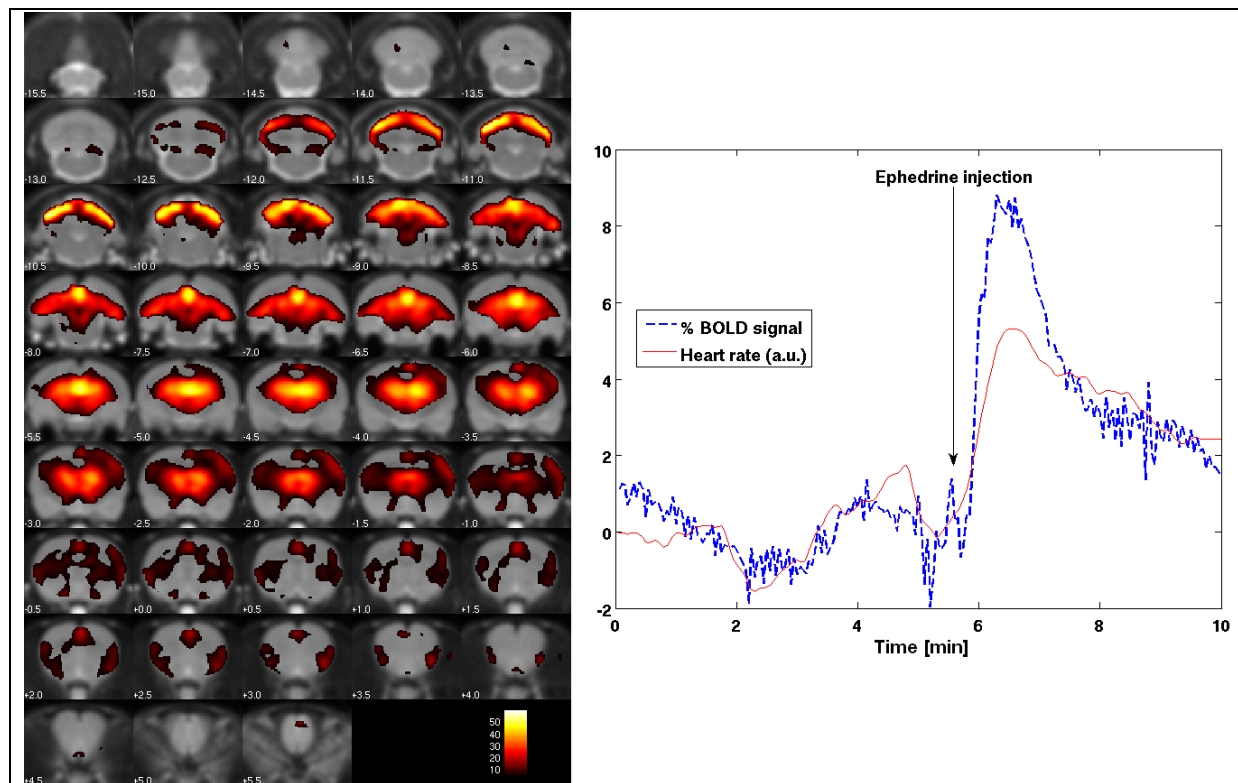


**Figure 32 : désactivations induites par la stimulation des afférences vagales du NV gauche (n=2, cartes statistiques  $t$ ,  $p < 0,001$ , FWE corrigé) (vagotomie en dessous de l'électrode).**

#### **4.2.2 Activation pharmacologique du système cardiovasculaire**

Afin de provoquer un changement de fréquence cardiaque important, une injection en i.v. d'éphédrine (vasoconstricteur) a été réalisée pour observer les répercussions de l'augmentation de la fréquence cardiaque au niveau des signaux BOLD et pouvoir les comparer avec les signaux BOLD obtenus pendant la NSV chez des rats non vagotomisés. Entre 1 et 2 minutes après l'injection d'éphédrine, une augmentation de la fréquence cardiaque d'environ 20% par rapport aux valeurs basales était observée. La fréquence cardiaque diminuait ensuite progressivement pour atteindre 10% de la valeur basale à la fin des acquisitions d'IRMf (i.e. 5 minutes après l'injection). Aucun effet sur la respiration lors de l'injection d'éphédrine n'était constaté. L'augmentation de la fréquence

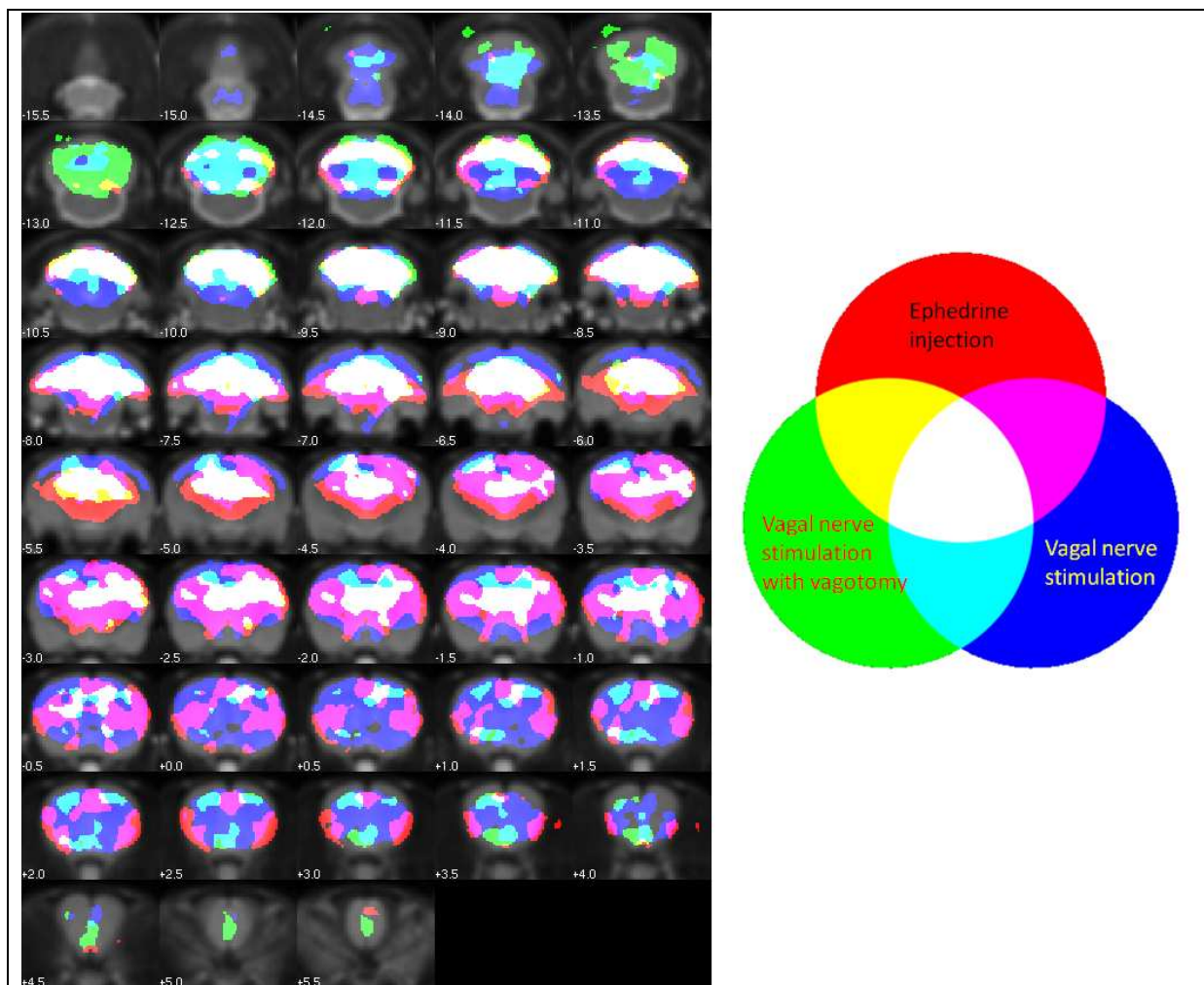
cardiaque était corrélée à des activations BOLD très répandues, principalement situées dans le locus coeruleus, la substance grise périaqueducale (SGPA), le cervelet, le thalamus, et le cortex insulaire et cingulaire (figure 33).



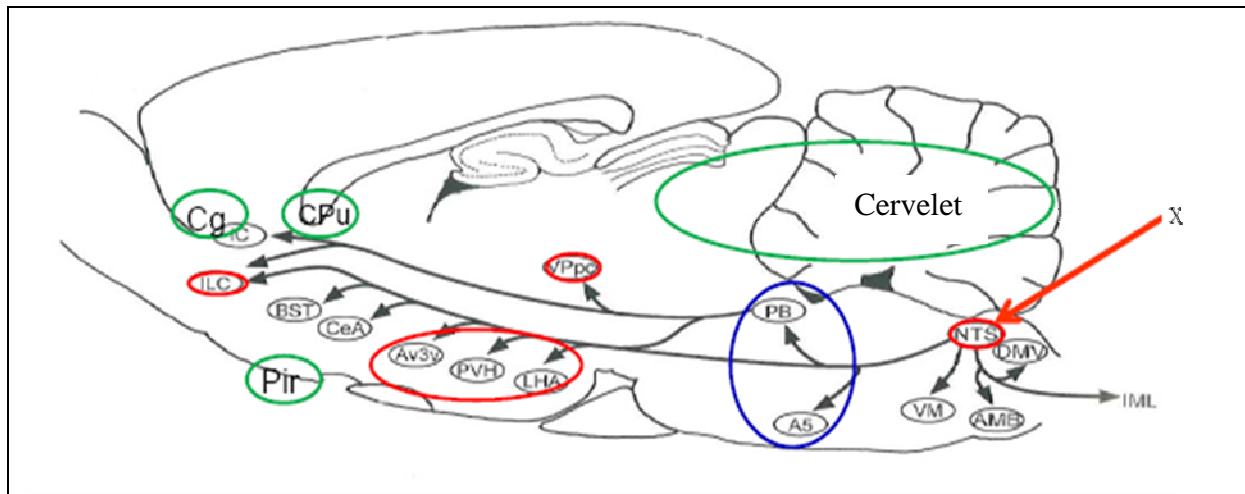
**Figure 33 : activations induites par injection en i.v. d'éphédrine** (gauche) (n=7, cartes statistiques  $t$ ,  $p < 0.001$ , FWE corrigé). Droite : Variations des données temporelles acquises de la fréquence cardiaque (rouge) et le signal BOLD moyenné sur tous les voxels du cerveau activés (bleu) pour un rat. Une excellente corrélation entre les deux variables est observée.

#### 4.2.3 Superposition des cartes d'activations d'IRMf

Afin de comparer les différentes régions activées ou déactivées observées pendant les acquisitions des différents contrôles, les cartes d'activations/déactivations ont été superposées. De nombreuses zones d'activations/déactivations neuronales ont été obtenues selon les différentes conditions (NSV sur rats non vagotomisés, NSV des afférences vagales ou des afférences vagales (vagotomies), activation par injection d'éphédrine) et se superposaient lors de l'analyse de groupe. Toutefois, des zones spécifiquement déactivées par la NSV ont été retrouvées (en bleu sur l'image ci-dessous) dans la partie supérieure du bulbe rachidien (région du NTS), dans la partie antérieure du septum, dans la partie antérieure du cortex moteur, et dans la partie postérieure et basale du cervelet (figure 34).



**Figure 34 : superposition des différentes cartes d'activations neuronales.** Ces cartes binaires sont obtenues d'après les cartes statistiques  $t$  ( $p < 0.001$ , FWE corrigé). La superposition des différentes conditions est codée en couleurs primaires. Les déactivations induites spécifiquement par la NSV sont en bleu (NSV sur rats non vagotomisés), vert (NSV sur rats vagotomisés), en cyan pour les deux conditions.



**Figure 35 : schéma des aires déactivées par la NSV.** NTS : noyau du tractus solitaire ; PB : parabrachial, A5 : groupes de neurones noradrénergiques ; VPpc : noyau ventropostérieur parvocellulaire de l'hypothalamus, LHA : aire latérale postérieure hypothalamique ; PVH : groupes cellulaires tubérales hypothalamiques (incluant les noyaux paraventriculaires et dorsomédians) ; Av3v : aire antérovентrale du troisième ventricule ; Pir : cortex piriforme ; ILC : cortex infra limbique ; Cg : cortex cingulaire ; CPU : noyau caudé et putamen.

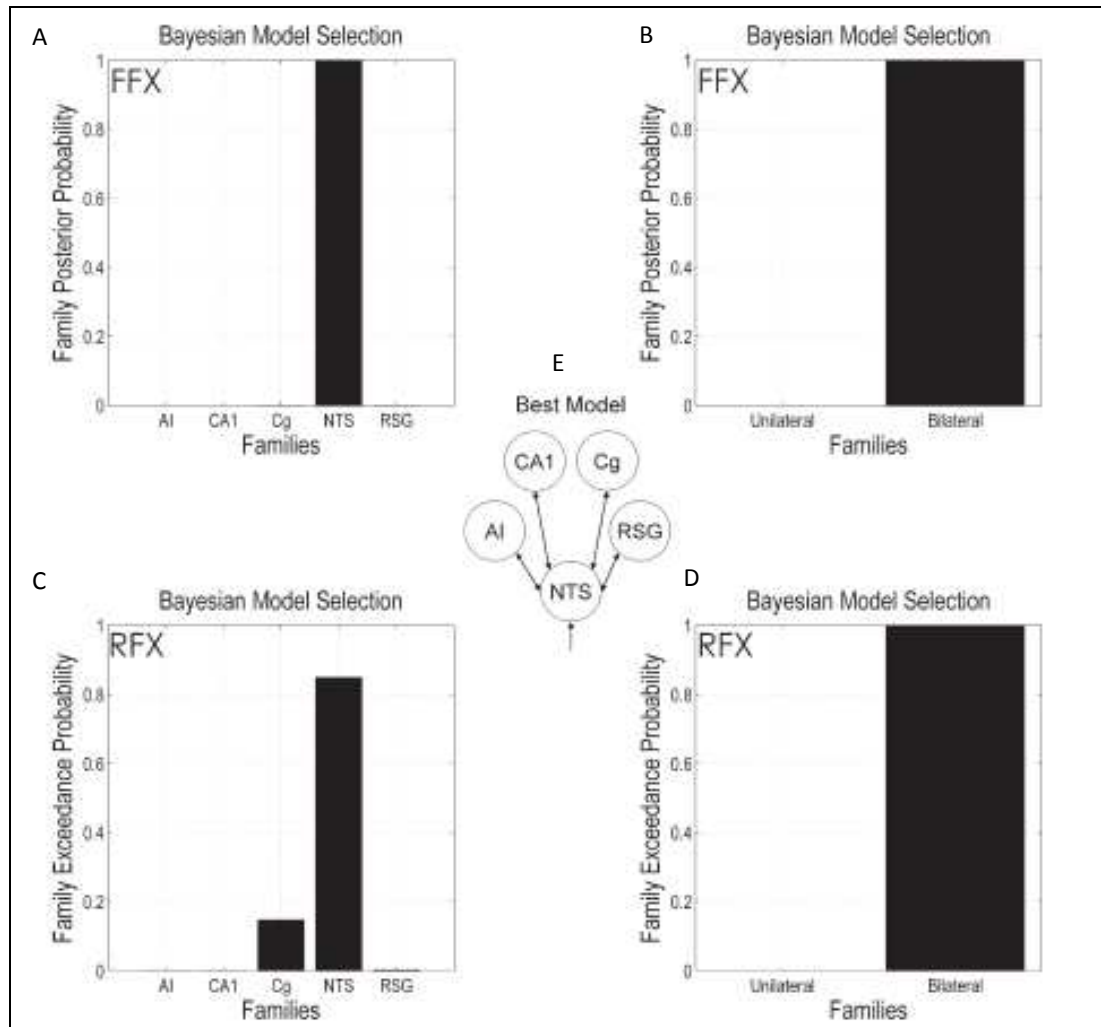
### 4.3 Analyse par la Dynamic Causal Modelling (DCM)

Afin d'analyser la connectivité entre les réseaux neuronaux déactivés et déterminer si les déactivations observées après NSV pouvaient être expliquées par une propagation de l'activité neuronale du NTS, une analyse DCM a été réalisée. Les régions d'intérêt ont été choisies préalablement, de la manière suivante : les acquisitions en temps réel des régions déactivées par la NSV étaient extraites, puis cinq régions d'intérêt étaient choisies d'après l'atlas rat Paxinos et Watson : le noyau du tractus solitaire (NTS), le cortex cingulaire (Cg), le cortex rétrosplénial granulaire (RSG), l'hippocampe antérieur, et l'insula (AI). Trois rats ont été retirés de l'analyse DCM car le rapport signal/bruit était trop faible dans les régions d'intérêt prédéfinies. L'analyse était donc réalisée sur les enregistrements des signaux BOLD des données temporelles acquises pendant la NSV du nerf vague gauche de 5 animaux. Une sélection Bayésienne des modèles a été faite au niveau de l'analyse de groupe sur des familles de modèles afin de tester les deux caractéristiques suivantes : 1) l'entrée du signal se fait par le NTS et 2) la DCM doit détecter des connectivités bilatérales entre les différentes régions neuronales. 410 modèles de DCM sont générés :

- 205 modèles concernant la structure d'entrée du signal induit par la NSV ont été générés : 5 régions d'intérêts ont été définies, il existait 41 modèles possibles qui connectaient de manière unidirectionnelle la région d'intérêt 1 aux autres (avec la région d'intérêt 1 comme point d'entrée du signal). En supposant que toutes les régions d'intérêts pouvaient être le point d'entrée du signal NSV :  $41 \times 5 = 205$  modèles unidirectionnels. Cinq familles de modèles ont donc été définies d'après le nom de la structure d'entrée du signal.

- De plus, 205 modèles bidirectionnels ont également été générés d'après les 205 modèles unidirectionnels afin de pouvoir étudier si les connectivités inter régions étaient bidirectionnelles ou non. Deux familles de modèles ont été définies : 1) connections unidirectionnelles ou 2) connections bidirectionnelles.

Dans un premier temps nous avons déterminé quelle structure était le point d'entrée du signal lors de la NSV. Pour cela 41 modèles ont été comparés. Le modèle présentant le NTS comme structure recevant les afférences vagues et donc le signal d'entrée lors de la NSV était le plus plausible comparé aux autres régions d'intérêt (analyse à effet fixe FFX : AI = 0, CA1 = 0, Cg = 0, NTS = 1, RSG = 0 ; analyse à effet aléatoire RFX : AI = 0,0003, CA1 = 0,0002, Cg = 0,1474, NTS = 0,8493, RSG = 0,0028). Les résultats montraient que le NTS était le noyau d'entrée le plus probable. Le cortex cingulaire (Cg) venait en deuxième position, et les probabilités étaient très faibles pour les autres scénarios (figure 36 A et C). Deuxièmement, nous avons étudié quel type de connectivité reliait les régions d'intérêts. Nous avons vérifié si la DCM pouvait retrouver la présence de connectivité bilatérale en comparant les 210 modèles avec des connections unilatérales (ou directionnelles) et les 210 autres modèles avec des connections bilatérales (ou bidirectionnelles) (analyse à effet fixe FFX : unilatérale = 0, bilatérale = 1 ; analyse à effet aléatoire : unilatérale = 0, bilatérale = 1) (figure 36 B et D). Les données montraient clairement l'existence de connections neuronales bidirectionnelles. Le modèle le plus robuste était donc celui présentant des connectivités bidirectionnelles entre les régions d'intérêt plutôt qu'unidirectionnelles. Le modèle le plus probable était donc celui combinant ces deux caractéristiques : le NTS comme noyau d'entrée avec des liaisons bidirectionnelles entre les différentes régions d'intérêts (figure 36 E).



**Figure 36 : analyse de groupe (n=5) sélection Bayésienne des groupes de 410 modèles testés. En haut (A et B): analyse à effet fixe (FFX) avec une analyse de probabilité postérieure. En bas (C et D) : analyse à effet aléatoire (RFX) avec une analyse de probabilité par dépassement. A gauche (A et C) : les familles sont réalisées pour estimer le point d'entrée de la NSV (le nom de chaque groupe représente la structure d'entrée). A droite (B et D) : les familles sont regroupées par modèles représentant un type de connectivité entre les différentes régions soit unidirectionnelle ou bidirectionnelle. Au centre (E) : le modèle le plus représentatif choisi parmi les 410 modèles. AI : insula ; CA1 : hippocampe antérieur ; Cg : cortex cingulaire ; RSG : cortex rétrospécial granulaire (RSG), NTS : noyau du tractus solitaire.**

## 5. Discussion

Très peu d'études ont été effectuées sur les effets centraux de la NSV à basse fréquence. Une étude par IRMf de la NSV a été réalisée sur des patients atteints de dépression (Lomarev et al. 2002). Lors de cette étude, différentes fréquences de stimulation (5 Hz ou 20 Hz) étaient testées afin d'étudier leur répercussion sur le SNC. Aucune activation significative n'était observée lors de la NSV 5 Hz alors que la NSV 20 Hz induisait des activations bilatérales dans la partie postérieure du cortex orbitofrontal, dans l'hypothalamus ainsi que dans le globus pallidus. Toutefois les auteurs exposent les limitations de cette étude et les précautions à prendre pour l'analyse des résultats. En effet l'étude a été réalisée sur un petit nombre de patients (n=6). Ces patients étaient tous sous plusieurs traitements différents et présentaient des réponses cliniques divergentes ainsi que des temps de stimulation et des paramètres de NSV différents. Une autre expérimentation (Osharina et al. 2006) plus récente a été réalisée pour étudier l'activation neuronale lors de la NSV basse fréquence sur un modèle de rat. Cette expérimentation reposait sur la quantification de la protéine Fos (marqueur d'activation neuronale non spécifique) par méthode d'immunohistochimie dans le noyau du tractus solitaire (NTS) après NSV à différentes fréquences (1 Hz ou 10 Hz) afin de déterminer si la fréquence de stimulation avait un effet sur l'activation neuronale. Cette étude a démontré que l'augmentation de la fréquence de stimulation avait une grande influence sur la réponse cardio-respiratoire (apnées et diminution de la fréquence cardiaque plus importantes à 10 Hz qu'à 1 Hz) et sur la quantité de neurones activés dans des parties du NTS jouant un rôle dans le contrôle cardio-respiratoire. Une augmentation importante de l'expression de Fos est observée lors d'une NSV 10 Hz par rapport à 1 Hz. Une forte expression de la protéine Fos est observée dans le NTS. Celle-ci n'est pas retrouvée de manière homogène dans les différentes parties du NTS mais préférentiellement dans les noyaux jouant un rôle dans le contrôle cardio-respiratoire (noyaux ventrolatérale, dorsomédiale, et commissurale).

Notre expérimentation est la première réalisée par IRMf sur les effets de la NSV aiguë chez le rat. Lors des acquisitions, de fortes diminutions du signal BOLD, ou désactivations, ont été observées pendant la stimulation du NV gauche. L'étude sur les répercussions de la NSV sur la fréquence cardiaque a démontré que la stimulation du NV gauche à 5 Hz provoquait une faible bradycardie. Ces paramètres de stimulation sont ceux provoquant le moins de variations au niveau cardio-respiratoire. Toutefois, cette légère diminution de la fréquence cardiaque induite lors de la NSV était répercutée au niveau du signal BOLD. Il était donc important de savoir si les désactivations, correspondant à une diminution du débit sanguin, retrouvées au niveau du SNC pendant la NSV provenaient uniquement d'un changement hémodynamique induit par la bradycardie ou s'il y avait

également une activité neuronale. La zone de désactivation la plus importante se trouvait au niveau du noyau d'entrée du NV dans le SNC, c'est-à-dire dans le NTS. Les autres régions de désactivations importantes étaient dans les structures reliées au NTS tel que le noyau parabrachial (NPB), le locus coeruleus, l'hippocampe et le cervelet (Xu and Frazier 1995).

Les désactivations très étendues et nombreuses que nous avons obtenues lors de notre étude sont différentes des données trouvées dans une autre étude sur la NSV utilisant la neuro-imagerie fonctionnelle où le métabolisme du glucose est mesuré par FDG-PET (2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose – tomographie par émission de positrons) (Dedeurwaerdere et al. 2005). Dans cette étude, les changements du métabolisme pendant une NSV aiguë sont retrouvés au niveau de l'hippocampe (diminution) et du bulbe olfactif.

Les données des études sur des patients pendant une NSV aiguë montrent des activations et désactivations localisées dans des structures différentes. Dans l'étude de Lomarev et al. les auteurs réalisent une expérience par IRMf sur des patients atteints de dépression majeure. La NSV 5 Hz pendant 13 secondes ne provoque aucune activation significative, par contre la NSV 20 Hz induit des activations significatives bilatérales au niveau de la partie postérieure du cortex orbito-frontal, dans l'hypothalamus, dans le globus pallidus et également de manière moins importante dans le thalamus (Lomarev et al. 2002). Une étude similaire portant sur des patients atteints de dépression et traités par NSV 20 Hz montrent une désactivation au niveau du cortex préfrontal ventro-médian et une activation au niveau de l'insula droite pour les patients présentant un degré de dépression plus important (Nahas et al. 2007). Toutefois, le travail de Bohning et al. réalisé par IRMf et effectué également sur des patients atteints de dépression et traités par NSV montre une activation au niveau du cortex orbito-frontal, pariéto-occipitale, temporal, de l'hypothalamus et de l'amygdale (Bohning et al. 2001). Une autre étude d'IRMf, menée sur des patients épileptiques avec une NSV de 30Hz pendant 30 secondes, met en évidence des activations au niveau des lobes frontaux et occipitaux, dans le lobe pariétal, dans le gyrus cingulaire et temporal, dans l'insula et le thalamus et dans le cervelet (Liu et al. 2003). L'étude de Sucholeiki et al., également réalisée par IRMf sur des patients épileptiques traités par NSV 30 Hz, montre des activations au niveau du gyrus temporal supérieur gauche, du gyrus frontal inférieur bilatérale et du gyrus frontal moyen bilatérale (Sucholeiki et al. 2002). Un travail supplémentaire portant sur des patients épileptiques traités par NSV 30 Hz a montré, par IRMf, des activations au niveau du thalamus et des cortex insulaires (Narayanan et al. 2002). L'étude par IRMf de Dietrich et al. sur la NSV transcutanée à 25 Hz réalisée sur des adultes sains montre des activations significatives au niveau du tronc cérébral (dans le locus coeruleus), dans le thalamus, dans le cortex préfrontal gauche, dans l'insula, dans le gyrus cingulaire postérieur gauche. Des désactivations sont également retrouvées au niveau du noyau accumbens gauche et



l'hémisphère cérébelleux droit (Dietrich et al. 2008). Les nombreuses différences au niveau des données obtenues peuvent être expliquées par plusieurs facteurs : changement des paramètres et des protocoles de stimulation, études réalisées sur l'animal ou l'Homme, l'état de santé du patient ainsi que les traitements pris par le patient, l'anesthésie utilisée pour les études sur l'animal, l'utilisation de traceurs ou d'agents de contrastes, les divergences au niveau des protocoles des scans, ou la méthode d'analyse utilisée (PET (tomographie par émission de positrons), SPECT (tomographie comptée à émission de photon unique) ou IRMf). Il est également difficile de comparer des résultats obtenus chez le rat et chez l'Homme.

Nos données montrent un effet important de la composante cardio-respiratoire sur les effets centraux pendant la NSV. En effet, nous avons observé que les déactivations au niveau du SNC étaient concomitantes avec la diminution de la fréquence cardiaque induite par la NSV. Nous avons également remarqué que les régions les plus déactivées dans le cerveau lors de la NSV appartenaient au système de régulation central du système nerveux autonome (Saper 2004). Les différents contrôles réalisés (vagotomies orientées et injection d'éphédrine) nous ont permis de mettre en évidence non seulement l'effet de la composante cardio-respiratoire mais également un effet de l'activité neuronale sur les réponses BOLD obtenues.

1) Les vagotomies cervicales sélectives ont permis de voir les rôles respectifs des afférences et efférences vagales lors de la NSV. En effet, il n'y avait aucune activation neuronale centrale lorsque les afférences vagales étaient coupées (stimulation des efférences uniquement), alors que les mêmes cartes de déactivations étaient obtenues lorsque les afférences vagales étaient sectionnées et que seules les afférences vagales étaient stimulées. Ces vagotomies permettent de montrer un rôle majeur des afférences vagales et suggèrent la nécessité d'activation des noyaux de régulation du mésencéphale pour expliquer les réponses BOLD obtenues lors de la NSV et non pas l'activation des récepteurs cardiaques.

2) Lors de l'injection i.v. d'éphédrine, une augmentation de la fréquence cardiaque était observée chez les animaux et cette augmentation était corrélée aux changements de signaux BOLD (activations) dans beaucoup de régions également déactivées lors de la NSV. Nous avons observé uniquement des activations lors de l'injection d'éphédrine, à l'inverse de la NSV où seules des déactivations ont été observées. Les principales régions d'activation BOLD étaient localisées dans la SGPA, le thalamus, le cervelet, l'hippocampe, l'insula et le cortex cingulaire. La plupart de ces structures appartiennent au système autonome central (Saper 2004), au système sérotoninergique (Harding 2004) et au système noradrénergique (Aston-Jones 2004). L'activation de ces structures concorde avec la notion d'activation du système de régulation central du système nerveux autonome. La comparaison des résultats obtenus lors de la NSV et lors de l'injection

d'éphédrine nous permet d'émettre l'hypothèse suivante : les déactivations obtenues lors de la NSV sont une réponse à la baisse de la fréquence cardiaque qui se traduit par une diminution du débit sanguin qui se répercute sur le signal BOLD. Au contraire, le fait d'augmenter la fréquence cardiaque, lors de l'injection d'éphédrine, augmente le débit sanguin et ceci se traduit par des activations au niveau des signaux BOLD. Ces résultats montrent qu'il est possible qu'une importante partie des déactivations observées pendant la NSV corresponde à des réponses physiologiques indirectes.

Comme la NSV est accompagnée d'une faible bradycardie qui influence la réponse BOLD, il est difficile de distinguer les effets neuronaux des effets cardio-respiratoires qui influencent fortement les signaux BOLD. En effet plusieurs études réalisées par IRMf ont mis en évidence l'importance des effets cardiovasculaires contaminants les signaux BOLD (même à l'état de repos) et surtout la difficulté de reconnaître les activations neuronales pures des effets physiologiques cardio-respiratoires (Birn et al. 2006 ; Dagli et al. 1999 ; de Munck et al. 2008; Gray et al. 2009; Wise et al. 2004). L'utilisation de la DCM dans notre étude a permis d'établir la présence d'une composante neuronale dans les signaux IRMf enregistrés malgré la composante physiologique (diminution de la fréquence cardiaque pendant la NSV) influençant les signaux BOLD. La DCM repose sur des connaissances neuroanatomiques établies. Dans notre expérimentation, si les connectivités neuronales obtenues lors de la NSV 5 Hz étaient en accord avec les voies neuronales du NV connues, c'est-à-dire : le NTS reçoit les afférences vagales, alors ceci était une démonstration indirecte de la composante neuronale dans les signaux BOLD observés. Afin d'étudier si les connectivités neuronales obtenues lors de l'expérimentation étaient comparables aux voies neuronales du NV connues, une comparaison de différents modèles a été effectuée. La comparaison de modèles au niveau du groupe a montré que le NTS était bien la région la plus susceptible de recevoir les afférences vagales par rapport aux quatre autres structures d'intérêt (le cortex cingulaire, l'hippocampe (CA1), l'insula et le cortex retrosplénial granulaire), ce qui est en accord avec les connaissances neuroanatomiques du NV. De plus, les résultats de l'analyse DCM étaient renforcés par le fait que la famille des modèles présentant des connectivités bidirectionnelles était plus plausible que celle présentant des connectivités unidirectionnelles entre les différentes structures d'intérêt, ce qui est en accord avec les résultats d'études neuroanatomiques. Le meilleur modèle au niveau du groupe (figure 36) montre des connections directes et rapides du NTS vers les autres régions cérébrales. Ces données vont dans le sens où le NTS est reconnu comme étant un point d'entrée dans le SNC, servant de «hub» et assurant la redistribution des signaux. La NSV 5 Hz active préférentiellement le système de régulation central du système nerveux autonome.

La NSV basse fréquence a été décrite comme recrutant principalement les afférences vagales afin de provoquer l'effet anti-inflammatoire périphérique (Bernik et al. 2002b; Borovikova et al.

2000b ; Naritoku et al. 1995). Les résultats de notre étude montrent que la NSV à la fréquence de 5 Hz active également les fibres afférentes et induit une activité neuronale. Le fait que la NSV à cette fréquence active des réseaux neuronaux est intéressant car cette stimulation pourrait, en plus d'activer les efférences vagales et la voie classique anti-inflammatoire cholinergique, activer l'axe anti-inflammatoire hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien et provoquer un «double» effet anti-inflammatoire (voie humorale versus voie nerveuse). Cependant, le cortisol qui est un reflet de l'activation de l'axe HPA n'a pas été dosé dans cette étude. L'utilisation de l'IRMf pour cette étude s'est montrée complexe en raison de la présence d'une forte composante physiologique induite par la NSV à prendre en compte. L'utilisation de la DCM a permis de mettre en évidence l'activité et la connectivité neuronale en se basant sur les connaissances neuroanatomiques de ces réseaux.

IV. PARTIE 2 : ETUDE DES EFFETS  
PERIPHERIQUES DE LA NSV COUPLEE A  
DIFFERENTS ANESTHESIQUES SUR UN  
MODELE DE RAT SAIN

# **1. Résumé de l'étude 2 : étude des effets périphériques de la NSV couplée à différents anesthésiques sur un modèle de rat sain**

## **1.1 Objectif de l'étude**

Cette étude a été réalisée afin d'analyser les effets périphériques de la NSV sur les différentes sous-populations lymphocytaires spléniques chez le rat sain. Elle a également été effectuée pour étudier l'influence de différents anesthésiques (isoflurane ou pentobarbital) sur les effets périphériques de la NSV sur la rate.

## **1.2 Matériel et méthodes**

Les rats mâles Sprague-Dawley ne présentant pas d'inflammation digestive étaient répartis en cinq groupes expérimentaux anesthésiés à l'isoflurane (anesthésie gazeuse) et cinq groupes expérimentaux anesthésiés au pentobarbital (injection intrapéritonéale). Les groupes expérimentaux étaient :

- groupe contrôle (rats anesthésiés et euthanasiés),
- groupe NSV 20 min (rats anesthésiés et stimulés 20 min),
- groupe Sham 20 min (rats anesthésiés, opérés mais non stimulés),
- groupe NSV 3h,
- groupe Sham 3h.

La rate était prélevée après sacrifice (Dolethal, 1ml intra-cardiaque) afin d'étudier les sous-populations lymphocytaires spléniques par cytométrie en flux.

## **1.3 Résultats**

Une différence de résultats a été observée entre les rats anesthésiés à l'isoflurane et au pentobarbital. Les rats anesthésiés à l'isoflurane et stimulés 3h, comparés au groupe Sham 3h, présentaient une diminution de la cellularité totale splénique, du nombre de lymphocytes et de toutes les autres sous-populations lymphocytaires spléniques. Ce résultat n'était pas retrouvé pour les rats anesthésiés au pentobarbital.

L'utilisation du pentobarbital a mis en évidence un effet de la chirurgie et/ou de l'anesthésie : diminution du nombre de lymphocytes T pour tous les groupes opérés comparé au groupe contrôle ainsi qu'une augmentation de l'activation lymphocytaire pour le groupe Sham 3h comparé au groupe contrôle.

Une diminution de l'activation lymphocytaire a été observée pour le groupe NSV 3h comparé au groupe Sham 3h ainsi qu'une diminution du pourcentage de NKT par rapport aux lymphocytes T pour

le groupe NSV 3h comparé au groupe Sham 3h. Ces résultats sont en faveur d'un rôle de la NSV 3h qui permettrait d'inhiber l'activation lymphocytaire et de jouer un rôle sur des cellules aux propriétés immunorégulatrices.

La NSV 20 min n'induisait pas d'effet au niveau des sous-populations lymphocytaires spléniques quel que soit l'anesthésique utilisé.

Le dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture pendant 48h a mis en évidence une différence importante de sécrétion de TNF- $\alpha$  entre les splénocytes issus de rats anesthésiés à l'isoflurane ou au pentobarbital. L'isoflurane inhiberait la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les splénocytes en culture par rapport aux splénocytes issus de rats anesthésiés au pentobarbital. Ce résultat renforce l'argument selon lequel l'isoflurane possède des propriétés anti-inflammatoires.

#### **1.4 Conclusion**

Le choix de l'anesthésique en expérimentation animale est primordial et délicat surtout dans le cas d'études touchant à l'inflammation. L'utilisation du pentobarbital semble plus adaptée pour l'étude de phénomènes pro- ou anti-inflammatoires que l'isoflurane qui semble présenter des interférences avec la NSV et posséder des propriétés anti-inflammatoires.

Les données obtenues sur les animaux «sains» montrent un effet inhibiteur de la NSV 3h au niveau de l'activation lymphocytaire et une action sur les cellules immunorégulatrices (NKT) spléniques. Ces données permettent d'avoir des informations sur le mécanisme d'action de la NSV chez un modèle de rat en état non-inflammé et pourront être comparées aux données obtenues lors de l'étude 3 réalisée chez un modèle de rat présentant une inflammation digestive (colite expérimentale).

## 2. Objectif de l'étude

Classiquement, l'effet anti-inflammatoire périphérique obtenu après NSV est reconnu comme étant dû à une action directe de l'acétylcholine sécrétée par les afférences vagales sur les récepteurs nicotiques exprimés à la surface des macrophages. Cette fixation provoque alors l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B induisant la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Toutefois, ce mécanisme d'action semble trop limité pour expliquer l'effet anti-inflammatoire périphérique provoqué par la NSV.

Cette étude a été réalisée afin de mettre en évidence les effets périphériques de la NSV sur le système immunitaire, plus particulièrement au niveau des populations lymphocytaires spléniques. En effet, il a été récemment démontré que la rate joue un rôle primordial dans la voie anti-inflammatoire cholinergique. En effet, la splénectomie inhibe la modulation de l'inflammation par la voie anti-inflammatoire cholinergique dans un modèle d'inflammation systémique (Huston et al. 2006 ; Huston et al. 2009 ; Karimi et al. 2010; Rosas-Ballina et al. 2008).

L'hypothèse de cette étude était que l'effet anti-inflammatoire obtenu au niveau digestif après NSV basse fréquence pourrait, en plus de la voie classique sur les macrophages, être également induit par une action du NV sur la rate mettant en jeu une sous-population lymphocytaire splénique particulière.

Nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur un modèle de rat «sain» ne présentant pas d'inflammation périphérique afin d'étudier le mécanisme d'action de la NSV dans un état basal sans avoir de perturbation induite par la présence d'une inflammation périphérique. Dans un deuxième temps (cf. partie 3) l'étude a été menée sur un modèle de rat présentant une colite expérimentale.

Cette étude a également été effectuée pour évaluer l'influence de différents anesthésiques (isoflurane ou pentobarbital) sur les effets périphériques de la NSV sur la rate.

### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1 Animaux

L'expérimentation a été réalisée sur des rats Spragues-Dawley mâles de 260 à 280g (Janvier, Le Genest St Isle, France). Avant toute manipulation, les animaux ont été acclimatés à leur environnement pendant au minimum 7 jours. L'ensemble des expériences a été effectué pendant des créneaux horaires identiques afin de limiter l'influence des variations circadiennes : l'anesthésie commençait à 9h00 du matin, suivie de la phase de chirurgie et NSV, les animaux étaient euthanasiés et prélevés en début d'après-midi, puis l'étude de cytométrie en flux commençait dès que les prélèvements étaient effectués.

Les rats étaient hébergés dans des conditions de stabulation contrôlées :

- Température :  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ,
- Hygrométrie :  $50 \pm 10\%$ ,
- Cycle nyctéméral : 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 expériences étaient réalisées en deux temps sur des animaux anesthésiés :

- Une phase chirurgicale permettant la mise en place de l'électrode de stimulation,
- Une phase de stimulation du nerf vague gauche.

Le chronogramme suivant présente le déroulement de l'expérience :

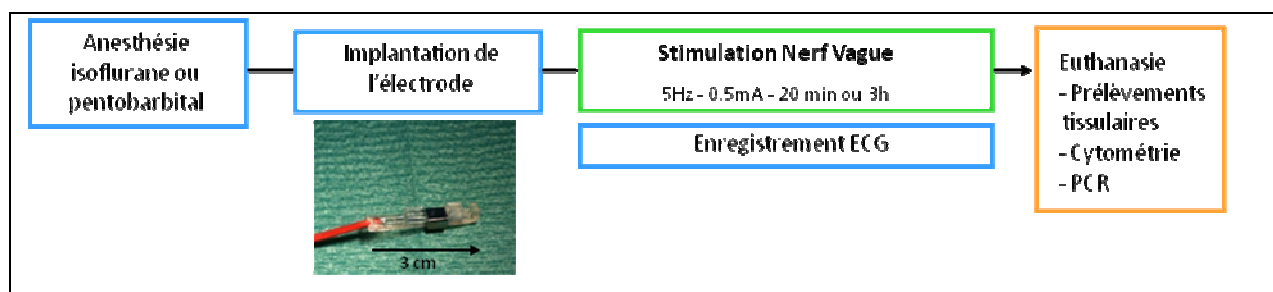


Figure 37 : chronogramme de l'expérimentation animale.



### 3.2 Anesthésie

Deux protocoles d'anesthésie ont été évalués :

- Anesthésie gazeuse (système Minerve®, France) à l'isoflurane (de la même manière que pour l'étude des effets centraux de la NSV vu précédemment), ou
- Injection intrapéritonéale (IP) de pentobarbital (125µl/100g).

Lors des expériences, la durée totale d'anesthésie était de 1h20 ou 4 h selon le protocole de stimulation utilisé (20min ou 3h de stimulation). Pendant toute la durée de l'anesthésie, la température de l'animal était maintenue à 37°C au moyen d'une couverture chauffante reliée à une sonde rectale (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Un suivi de la saturation en oxygène et de la fréquence cardiaque pendant l'expérimentation était assuré par un capteur optique placé sur une des pattes inférieures de l'animal (système Nonnin - France). L'électrocardiogramme des rats était également enregistré grâce à trois aiguilles très fines (Vycon, 0,4mm de diamètre) placées en position sous-cutanée : une à la pointe du cœur, une sous-claviculaire et la dernière sur la patte inférieure droite (type de dérivation DII) de la même manière que pour l'expérimentation précédente sur les effets centraux de la NSV.

### 3.3 Chirurgie

La phase chirurgicale consiste à mettre en place l'électrode de stimulation vagale qui n'était plus une électrode de stimulation Cyberonics comme pour la première étude (par manque de matériel) mais une électrode animale bipolaire rigide, Harvard Apparatus (Les Ulis, France) (ref : PY8 73-0336) (figure 38) au niveau de la portion cervicale du nerf vague gauche. L'implantation était réalisée sur les rats anesthésiés (isoflurane ou pentobarbital) de la même manière que précédemment décrit dans l'étude 1 sur les effets centraux de la NSV. Toutefois, l'électrode de stimulation Harvard n'était pas placée autour du paquet vasculo-nerveux comme pour l'électrode de stimulation Cyberonics. En effet, l'électrode Harvard était placée directement sur le nerf vague gauche. Pour ce faire, il était donc nécessaire de rajouter une étape de chirurgie : une fois le paquet vasculo-nerveux isolé, le nerf vague était repéré et dissocié de la carotide. Le nerf vague gauche était alors placé dans l'électrode de stimulation (figure 39).

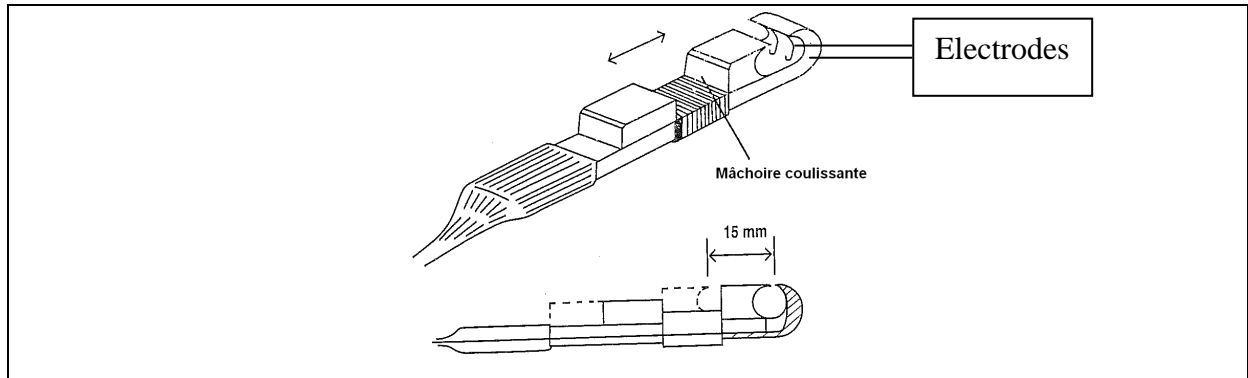


Figure 38 : schéma de l'électrode de stimulation Harvard.

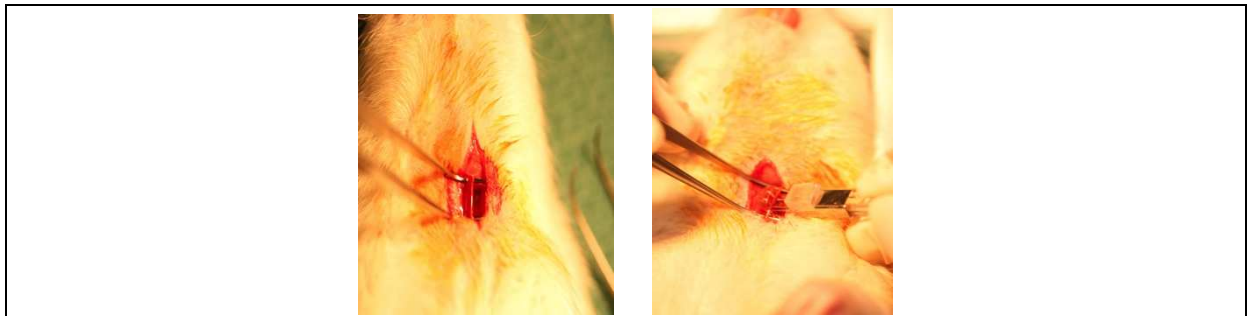


Figure 39 : dissociation du nerf vague gauche et mise en place de l'électrode de stimulation Harvard.

### 3.4 Stimulation vagale

La chaîne de neurostimulation (Grass®) reste la même que celle précédemment utilisée pour l'analyse des effets centraux de la NSV. Toutefois certains paramètres de stimulation sont différents car l'électrode n'est pas la même et nous n'avons pas la contrainte du temps des séquences d'acquisitions de l'aimant (modifications en gras):

- Intensité : **0,5mA** (l'intensité est diminuée car ici seul le NV est stimulé et non pas le paquet vasculo-nerveux comme dans l'étude précédente),
- Fréquence : 5 Hz,
- Durée de pulse : 500µs,
- Trains de stimulation : **30s ON, 5min OFF**,
- Stimulation pendant 20 minutes ou 3 heures.

Le profil de la stimulation est schématisé sur la figure 40 :

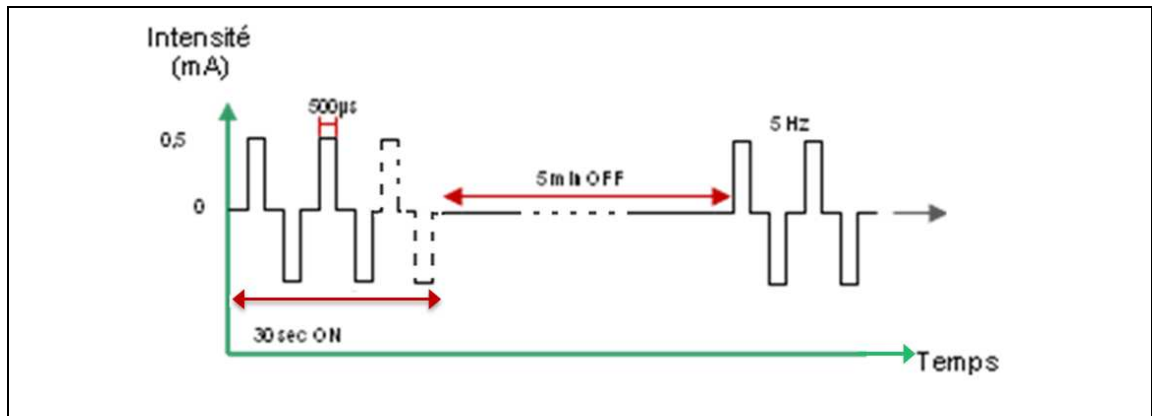


Figure 40 : paramètres de la stimulation électrique.

### 3.5 Groupes d'animaux

5 groupes d'animaux, avec 10 animaux par groupe, ont été utilisés pour chaque anesthésique (isoflurane ou pentobarbital) lors de cette expérimentation:

- groupe contrôle: pas de chirurgie, ni de stimulation, seulement l'anesthésie immédiatement suivie de l'euthanasie,
- groupe NSV 20 min : stimulation vagale pendant 20 min,
- groupe NSV 3h : stimulation vagale pendant 3h,
- groupe Sham 20 min : anesthésie poursuivie pendant 20 min après la mise en place de l'électrode, sans stimulation,
- groupe Sham 3h : anesthésie poursuivie pendant 3h après la mise en place de l'électrode, sans stimulation.

### 3.6 Euthanasie et prélèvements

Trente minutes après la fin de la stimulation, les rats étaient euthanasiés par une injection intracardiaque massive de pentobarbital (Dolethal®, 200mg/kg). Une laparotomie était pratiquée et la rate était prélevée pour être dissociée afin de réaliser l'analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques par cytométrie en flux, ainsi que différents dosages par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ou RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) quantitative.

### 3.7 Analyse par cytométrie en flux

#### 3.7.1 Préparation des cellules

Une fois la rate prélevée, cette dernière a été immédiatement placée dans un tube Falcon contenant 10ml de tampon phosphate (*Phosphate Buffer Saline* : PBS) supplémenté en albumine sérique bovine à 1% (*Bovin Serum Albumin* : BSA) froid. La rate était ensuite placée sur un filtre en nylon (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) de 100 µm pour en dissocier mécaniquement les cellules à l'aide d'un piston de seringue. Les cellules isolées ont été diluées avec 20 ml de tampon de lyse (lyse hypotonique au chlorure d'ammonium, dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la solution mère dans l'eau) permettant l'élimination des érythrocytes. Après centrifugation, les cellules ont été lavées avec du PBS et filtrées à nouveau sur un tamis de 40 µm pour éliminer les agrégats. Après un dernier lavage au PBS, le culot était repris dans 10 ml de PBS BSA 1%. Une numération au bleu trypan en cellule de Malassez a été réalisée afin de connaître le nombre de cellules isolées par rate.

#### 3.7.2 Immunomarquage des cellules

Chaque marquage a été réalisé sur 1 million de cellules. Les cellules ont été incubées pendant 45 min dans des tubes contenant un volume final de 300 µl de PBS BSA 1% et un mélange d'anticorps (tableau 5) à 4°C. Pour chacun de ces marquages, des contrôles isotypiques ont été réalisés afin de déterminer le seuil de positivité d'expression des antigènes selon la stratégie «*Fluorescence Minus One - FMO*» (Roederer 2001).

Anticorps	Fournisseur	Clone	Fluorochromes
CD3	BD Biosciences	1F4	APC
CD4	BD Biosciences	OX-35	PE – Cy 5
CD8	BD Biosciences	OX-8	FITC
CD25	BD Biosciences	OX-39	PE
CD45RA	BD Biosciences	OX-33	PE
CD161a	BD Biosciences	10/78	FITC
TCR alpha –beta	BD Biosciences	R73	PerCP
TCR gamma-delta	BD Biosciences	V65	PE

**Tableau 5 : liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages.** APC : allophycocyanine, FITC : isothiocyanate de fluorescéine, PE : phycoérythrine, PE-Cy5 : tandem phycoérythrine-cyanine 5, PerCP : peridinin chlorophyll protein.

A la fin du temps d'incubation, les cellules ont été lavées au PBS (3ml/tube), puis centrifugées à 400 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et les culots étaient resuspendus dans

500 µl de PBS + 5 µg/ml de Hoechst 33258 (Sigma). Cette sonde fluorescente permet le marquage des cellules mortes et ainsi d'apprécier la viabilité cellulaire.

### **3.7.3 Analyse des cellules**

Les cellules ont été analysées sur un FACS LSRII (BD Biosciences). L'APC est excité par un laser rouge (633nm), le Hoechst est excité par un laser UV (351nm), les autres fluorochromes sont excités par un laser bleu (488nm). Les doublets ont été éliminés de l'analyse ainsi que les cellules mortes (marquage positif au Hoechst 33258). Les données de cytométrie ont été interprétées avec le logiciel Flowjo (Tree Star, Ashland, OR, USA) (figure 41).

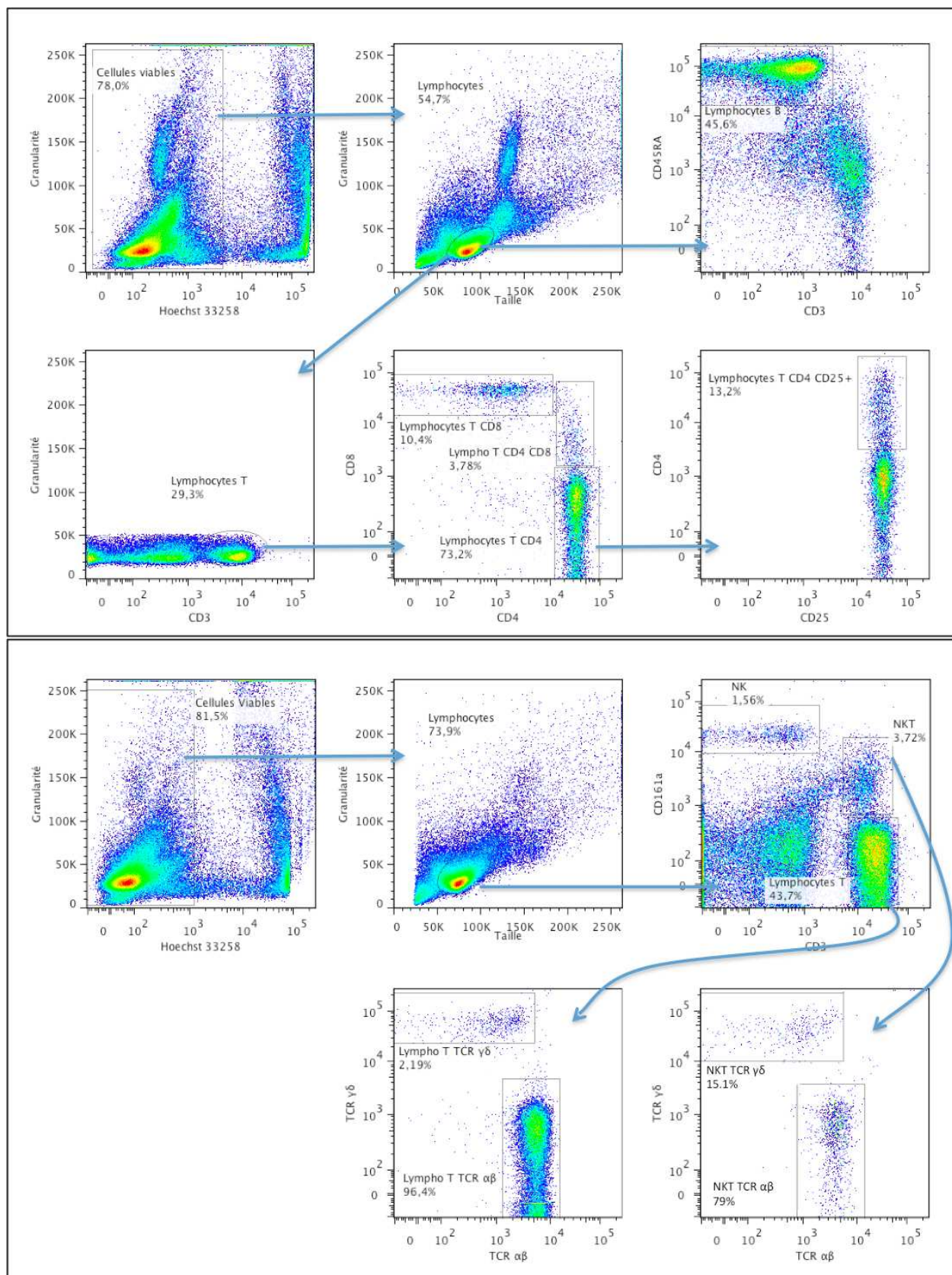


Figure 41 : histogrammes biparamétriques représentant les stratégies de fenêtrage pour les différentes sous-populations lymphocytaires spléniques.

### **3.7.4 Culture cellulaire**

Afin d'induire une activation des lymphocytes *in vitro*,  $1.10^6$  cellules non immunomarquées, préalablement dissociées, ont été mises en culture dans des plaques 96 puits. Il y avait 10 puits par animal (5 puits dans lesquels les cellules étaient activées et 5 autres où elles ne l'étaient pas). Les puits dans lesquels les cellules étaient activées étaient coatés pendant 48h avec de l'anticorps anti-CD3 en solution (clone : 1F4, AbD serotec, Oxford, UK). Après 48h, les puits étaient lavés avec 200 $\mu$ l de PBS et remplis avec du milieu de culture RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*), du sérum de veau fœtal (10%) (SVF) ainsi que de l'anticorps anti-CD28 en solution (2 $\mu$ l/ml) (clone : JJ319, AbD serotec, Oxford, UK). Les cellules témoin « non-activées » étaient cultivées dans des puits non coatés contenant du milieu de culture RPMI et du SVF sans l'anticorps anti-CD28. Les plaques étaient ensuite placées dans une étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pendant 48h. A la fin de ces 48 heures, les surnageants étaient récupérés et conservés à -80°C afin de doser les cytokines sécrétées par les splénocytes en culture par la technique CBA (*Cytometric Beads Array*).

### **3.7.5 Dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture**

Ce dosage a été réalisé avec le kit CBA Rat Soluble Protein Flex Sets (BD Biosciences, France). Cette technique est apparentée à un dosage ELISA classique, mais elle permet de doser plusieurs cytokines simultanément par cytométrie en flux en utilisant un minimum de surnageant issu des cultures cellulaires de splénocytes activés ou non-activés. Cette technique repose sur l'utilisation d'un mélange de billes en latex présentant à leur surface un anticorps de capture spécifique d'une protéine. Les billes ont des intensités de fluorescence intrinsèques différentes permettant de les distinguer les unes des autres et de les identifier en fonction de leur spécificité. Une troisième fluorescence correspond à la quantité de protéine détectée grâce à un deuxième anticorps. Ces paramètres de fluorescence sont analysés par cytométrie en flux. Les cytokines dosées étaient : l'interleukine-4 (IL-4), le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine-1  $\alpha$  (IL-1  $\alpha$ ), l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), l'interleukine-10 (IL10) et l'interleukine-6 (IL-6).

### 3.8 Quantification des ARNm par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

La PCR est une amplification exponentielle, cyclique et ciblée de l'ADN. Les caractères exponentiel et cyclique lui confèrent respectivement une grande sensibilité et une importante reproductibilité. L'amplification de l'ADNc (ADN complémentaire) est régie par l'équation:

$$N_c = N_0(1+\epsilon)^c$$

où  $N_c$  est le nombre de molécules amplifiées,  $N_0$  est le nombre initial de molécules,  $\epsilon$  est l'efficacité d'amplification et  $c$  le nombre de cycles. Plus la quantité d'ADNc (ADN complémentaire) initiale est importante plus le seuil de détection de la fluorescence est atteint rapidement. Ce seuil de détection (CP : Crossing Point ou CT : Cycle Threshold) est utilisé pour la quantification.

La q RT-PCR nécessite quatre étapes : broyage, extraction d'ARN, reverse transcription afin de synthétiser de l'ADNc, et quantification par PCR en temps réel sur LightCycler (LightCycler Instrument, Roche Applied Science).

L'amplification par PCR est suivie en temps réel par un intercalant fluorescent le SYBR Green (intercalant dont le rendement quantique de fluorescence est fortement augmenté une fois lié de manière non spécifique à l'ADN double brin). La fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. Le but de cette expérience est de quantifier les ARNm cibles présents dans les splénocytes (un million par rat) obtenus après dissociation mécanique de la rate et qui ont été directement placés et conservés dans 350µl de solution de tampon de lyse (tampon RLT) (Qiagen, Courtaboeuf, France) à -80°C.

La quantification des ARN donne une information intéressante car ils représentent la réponse d'une cellule à un stimulus tel qu'une inflammation, une agression, une stimulation. Cette réponse est faite en fonction de l'état de la cellule et de son environnement. Cette information que fournit l'ARNm est en amont au niveau de la régulation cellulaire et représente donc une réponse relativement pure et aisée à quantifier. Toutefois la q RT PCR nous permet d'analyser des variations de quantité d'ARNm qui ne sont pas obligatoirement équivalentes aux quantités de protéines. Cette technique présente donc des limites notamment au niveau de la quantité initiale d'ARNm à doser. Lorsque la quantité initiale n'est pas assez importante la quantification de l'expression des gènes cibles ne sera pas réalisable. Cette limitation oblige donc à éliminer certains gènes cibles selon la quantité d'ARNm présente. Une autre limitation de cette technique est qu'il n'est pas possible de déterminer si la variation de l'ARNm quantifié provient d'une augmentation de la synthèse ou d'une diminution de la dégradation de cet ARNm.



### **3.8.1 Extraction des ARN**

L'extraction des ARN a été réalisée sur l'automate Qiacube (Qiagen) en utilisant le kit RNeasy mini kit Animal Cells (Qiagen) sur colonne. La purification d'ARN a été effectuée en plusieurs étapes. Tout d'abord les cellules étaient lysées et homogénéisées en présence du tampon de lyse RLT fortement concentré en thiocyanate de guanidine inactivant les RNases afin de purifier des ARN intacts. Puis de l'éthanol a été ajouté pour assurer une bonne fixation de l'ARN sur la membrane silicatée de la colonne. Ensuite, l'échantillon était placé sur une *RNeasy Mini spin colonne* où l'ARN total se fixe sur la membrane silicatée de la colonne et les contaminants sont retirés par une succession de lavages. Les ARN étaient alors élués dans de l'eau.

### **3.8.2 Vérification de la qualité et de la concentration des éluats**

Les éluats d'ARN totaux ont ensuite été dosés (2 µl) à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop® ND1000 (NanoDrop Technologies Inc., USA) pour déterminer la concentration et la pureté des ARN élués de chaque échantillon. Les ARN ont été congelés à – 80°C en attendant l'étape de transcription inverse.

### **3.8.3 Transcription inverse**

La transcription inverse des ARN totaux en ADNc a été réalisée grâce à l'enzyme Sensiscript Transcriptase inverse (Qiagen) qui est une enzyme recombinante hétérodimérique exprimée dans *E.coli*, adaptée à la transcription inverse des faibles concentrations d'ARN (ici <50ng/µl). La réaction a été réalisée à partir d'un volume de 50 ng d'ARN dans 20 µl final avec 50 µM d'amorce oligo (dT), un mélange de dNTP à 5 mM et un inhibiteur de RNase 20 U/µl.

### **3.8.4 PCR quantitative en temps réel sur LightCycler**

La PCR a été réalisée avec le kit *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Applied Science) sur un automate LightCycler (LightCycler Instrument, Roche Applied Science). Après dénaturation, l'amplification se déroule en trois étapes pendant 50 cycles :

- La dénaturation : l'ADNc est chauffé à 95°C pendant 10 minutes.
- L'hybridation : la température est définie selon la nature des amorces. Elle est descendue d'environ 5°C en dessous de la température de fusion (T<sub>m</sub>). Cette baisse va permettre aux amorces de se fixer de façon spécifique sur les séquences complémentaires des fragments d'ADN dénaturé.
- L'élongation : la température est à 72°C pendant 8 secondes où la Taq polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN par polymérisation de désoxyribonucléotides.

### **3.8.5 Gènes cibles étudiés**

Chaque amorce a été dessinée (MacVector) et optimisée lors d'une étude préliminaire selon les conditions détaillées dans le tableau suivant (Peinnequin et al. 2004). La PCR a été optimisée sur un pool de la totalité des échantillons. Après amplification, une courbe de fusion était réalisée pour vérifier la spécificité de la PCR.

Les gènes cibles étudiés sont des gènes jouant un rôle important dans l'inflammation et donnant des informations sur l'état inflammatoire de la cellule (tableau 6).

- ARNm de cytokines : - cytokines pro-inflammatoires : TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-2 et IL-2ra (récepteur  $\alpha$  de l'IL-2) ;
  - cytokines anti-inflammatoires : IL-10, IL-4.
- ARNm de la protéine modulatrice de voie intracellulaire de signalisation : NF $\kappa$ Bia (inhibiteur du facteur de transcription NF $\kappa$ B). Il présente une signification fonctionnelle car l'augmentation de son ARNm montre qu'il a été utilisé et dégradé et que la cellule est en train d'en reconstituer.
- ARNm du marqueur exprimé de lymphocytes T régulateurs : FoxP3.

Le niveau d'expression de l'IL-17, l'IL-10, l'IL-4 et l'IFN- $\gamma$  s'est avéré trop faiblement exprimé ne nous permettant donc pas de les quantifier.

Gènes		Amorces	T° H	Réf. GenBank	NC
<b>ARBP</b>	Sens	F1: 5'-CCTGCACACTCGCTTCTAGAG-3'	54°C	NM_022402	50
	Antisens	R1: 5'-CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG-3'			
<b>ARBP</b>	Sens	F3 : 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAATA-3'	54°C	NM_022402	50
	Antisens	R3 : 5'-CATGCGGATCTGCTGCATCT-3'			
<b>CYCA</b>	Sens	F3: 5'-GGCAAATGCTGGACCAAACAC-3'	56°C	NM_017101	50
	Antisens	R3: 5'-CTTCCCAAAGACCACATGCTTG-3'			
<b>HPRT</b>	Sens	F1: 5'-CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC-3'	60°C	NM_012583	50
	Antisens	R1: 5'-GCAGTCAGCAAAGAACTTATAGCC-3'			
<b>NFκBia</b>	Sens	F2: 5'-AGCTGACCCTGGAAAATCTTCAG-3'	55°C	NM_001105720	50
	Antisens	R2: 5'-CCTCCAAACACACAGTCATCGTAG-3'			
<b>TNF-α</b>	Sens	F4 : 5'-AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC-3'	58°C	NM_012675	50
	Antisens	R4 : 5'-TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'			
<b>FoxP3</b>	Sens	F2 :5'-CACACGCATGTTTCGCTACTTC-3'	57°C	NM_001108250	50
	Antisens	R2 :5'-TCCACTCGCACAAAGCACTTG-3'			
<b>IL-2</b>	Sens	F2: 5'- TTCACTTGAAGACGCTGGAAA-3'	56°C	NM_053836	50
	Antisens	R2: 5'- ACCACAGTTGCTGGCTCATCAT-3'			
<b>IL-2ra</b>	Sens	F2: 5'- GTGGGTTACCTGGCAACATAG-3'	54°C	NM_013163	50
	Antisens	R2: 5'- CCCTGGGCTCCAAGTTC-3'			
<b>IFNγ</b>	Sens	F1: 5'-AAGTGTCATCGAATCGCACCTG-3'	60°C	NM_005106	50
	Antisens	R1: 5'-CAGCTTTGTGCTGGATTGTGG-3'			

**Tableau 6 : amorces et conditions de PCR.** En rouge : les gènes rapporteurs ; TH : température d'hybridation ; NC : nombre de cycles ; ARBP : *acidic ribosomal phosphoprotein* ; CyCA : *cyclophilin A* ; HPRT : *hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase* ; NFκBia : *nuclear factor of κ light chain gene enhancer in B-cells inhibitor α* ; TNF-α : *tumor necrosis factor* ; FoxP3 : *Forkhead box P3* ; IL-2 : interleukine-2 ; IL-2ra : chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 ; IFN-γ : interféron γ.

### 3.8.6 Traitement et normalisation des données

La quantification est basée sur la détermination du Crossing Point (CP) en utilisant la méthode du maximum de la dérivée seconde (LightCycler Software v.3.1). Le CP correspond à la quantité d'ADN maximale en limite de la phase exponentielle.

La normalisation est réalisée par moyenne géométrique de trois gènes en utilisant le logiciel Genorm. Les trois gènes de référence utilisés et validés dans cette étude étaient : le gène de la Cyclophiline A (CYCA), celui de l'hypoxanthine-guanine phosphorybosyl transférase (HPRT), et celui de la phosphoprotéine ribosomale acide (ARBP). Ces trois gènes ont donc été utilisés pour normaliser les quantités respectives de chacun des marqueurs étudiés. La normalisation est utilisée afin

d'atténuer les différences de rendements obtenus lors des différentes étapes réalisées pour arriver à la quantification des ARNm.

La quantification a été effectuée par la méthode de comparaison des cycles de sorties ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) avec la correction d'efficacité de PCR.

### **3.9 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le programme GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, Californie, USA). L'ensemble des résultats a été analysé avec un test non-paramétrique Mann-Whitney. Les données étaient considérées comme statistiquement significatives lorsque  $p < 0,05$ . Les résultats sont présentés de la manière suivante : moyenne  $\pm$  erreur standard.

## 4. Résultats

### 4.1 Etude des effets de la NSV chez le rat anesthésié à l'isoflurane

#### 4.1.1 Analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques par cytométrie en flux

Afin d'étudier l'implication des différentes populations du système immunitaire de la rate dans l'effet anti-inflammatoire du nerf vague, différentes sous-populations lymphocytaires spléniques provenant d'un modèle de rat anesthésié à l'isoflurane ont été analysées par cytométrie en flux. Cinq groupes expérimentaux étaient étudiés : contrôle, sham 3h ou 20min (rats anesthésiés, opérés mais non stimulés), NSV 3h ou 20min (rats anesthésiés, opérés et stimulés). Les valeurs moyennes des différentes populations étudiées sont répertoriées dans le tableau suivant tout d'abord sous forme de pourcentage par rapport à une population donnée puis en valeur absolue (nombre de cellules x1000 par rate dissociée).

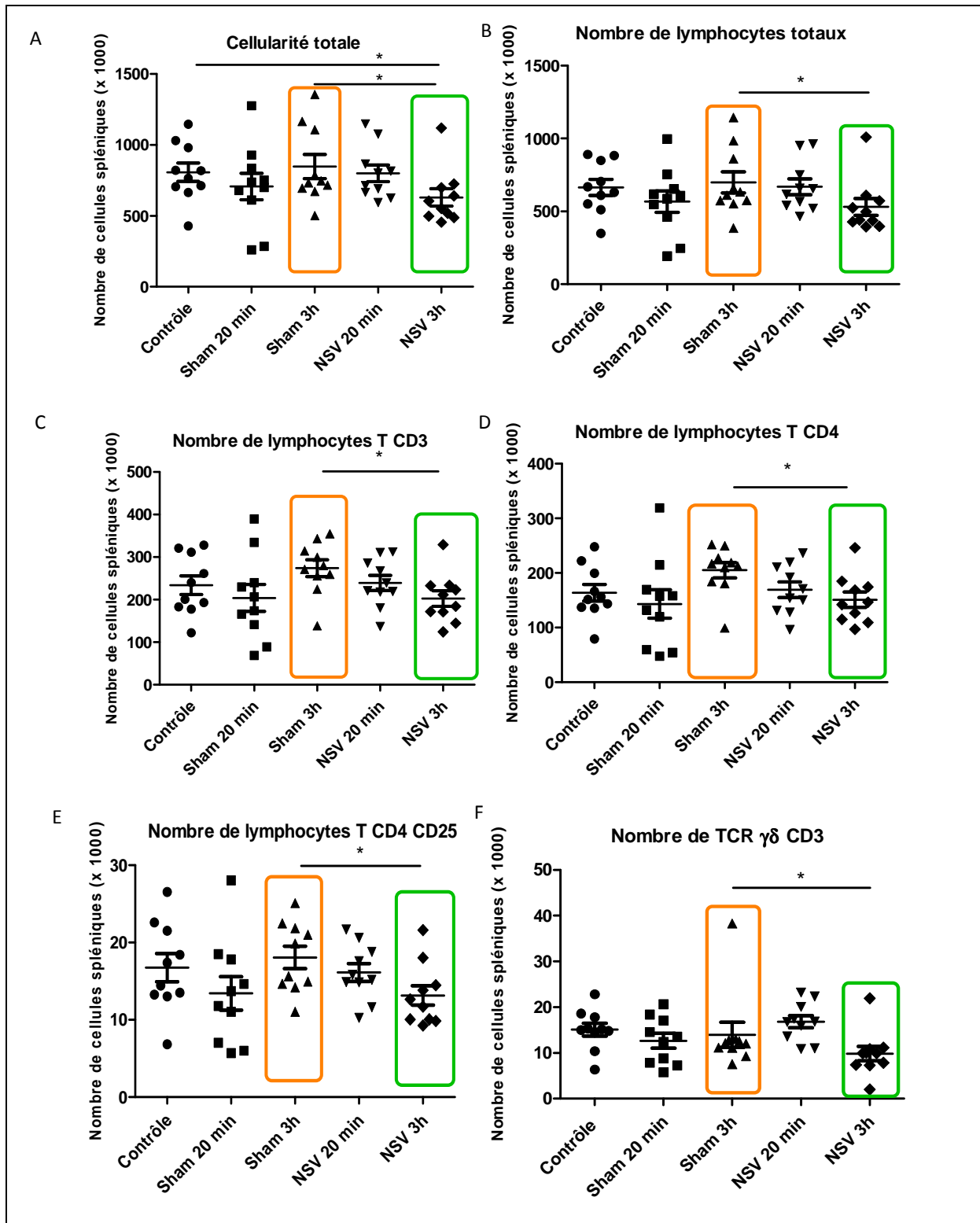
	Contrôle isoflurane		Sham 20 min isoflurane		Sham 3h isoflurane		NSV 20 min isoflurane		NSV 3h isoflurane	
	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM
% lymphocytes totaux/ cellules totales	82.2	1.2	80.3	1.7	82.1	1.2	83.3	1.3	83.9	1.3
% lymphocytes T/ lymphocytes	35.4	2.3	35.5	1.7	40.5	2.4	36.2	2.0	38.9	2.0
% lymphocytes T CD4/ CD3	70.4	2.2	68.4	4.0	75.1	1.6	70.6	2.5	74.5	1.6
% CD25/ CD4	10.5	1.1	9.9	0.5	8.9	0.5	9.7	0.4	8.8	0.3
% lymphocytes T CD8/ CD3	21.3	2.5	23.7	3.6	18.4	1.5	22.1	2.3	18.5	1.4
balance CD4/CD8	0.3	0.0	0.4	0.1	0.2	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0
double positif CD4 CD8/ CD3	2.4	0.2	2.2	0.2	2.1	0.1	2.3	0.1	2.5	0.1
% lymphocytes B/ lymphocytes	37.1	3.1	37.5	2.5	38.6	2.4	38.3	2.7	37.2	2.5
% NK / lymphocytes	2.7	0.3	2.3	0.3	2.4	0.2	3.2	0.5	2.4	0.5
% NKT / lymphocytes T	9.2	0.7	8.3	0.7	7.9	0.6	8.7	0.3	10.4	3.5
% TCRαβ/ CD3	93.2	0.5	93.2	0.5	94.6	0.6	93.4	0.4	94.8	0.5
% TCRγδ/ CD3	5.8	0.5	5.7	0.5	4.6	0.5	5.7	0.3	4.2	0.5
% TCRαβ/ NKT	65.9	2.7	65.5	2.5	68.4	2.7	65.2	2.2	71.1	2.4
% TCRγδ/ NKT	28.5	2.6	29.8	2.6	25.6	2.4	30.9	2.1	25.0	2.2
cellularité totale	806.8	68.5	706.6	98.1	847.2	89.0	799.6	62.0	629.6	64.7
nombre de lymphocytes totaux	664.7	58.3	566.6	77.5	697.9	76.3	668.8	57.4	530.7	61.0
nombre de lymphocytes T	233.9	23.4	204.0	33.5	274.1	20.8	239.2	18.8	202.7	19.2
nombre de lymphocytes T CD4	163.9	16.1	143.2	27.6	205.1	14.6	169.0	15.1	151.0	14.8
nombre de lymphocytes T CD4 CD25+	16.8	1.9	13.4	2.3	18.1	1.5	16.1	1.2	13.1	1.3
nombre de lymphocytes T CD8	50.8	8.9	44.9	7.8	50.8	6.4	52.8	7.0	37.4	4.0
nombre de lymphocytes B	241.6	28.4	209.4	28.8	280.7	49.6	259.4	32.3	198.1	25.4
nombre de NK	18.1	2.5	12.4	1.8	17.4	2.8	21.4	3.3	13.7	4.0
nombre de NKT	26.7	3.1	21.0	3.4	26.2	3.6	28.2	2.4	26.6	9.7
nombre de LT avec TCRαβ	250.7	26.7	225.1	36.8	284.8	25.4	281.8	27.1	222.4	33.4
nombre de LT avec TCRγδ	15.1	1.5	12.7	1.7	14.0	2.9	16.8	1.4	9.9	1.7
nombre de NKT avec TCRαβ	17.5	2.0	13.9	2.5	17.5	2.1	18.4	1.8	19.9	8.0
nombre de NKT avec TCRγδ	7.7	1.2	6.1	1.1	7.0	1.6	8.7	0.9	5.8	1.6

**Tableau 7 : valeurs moyennes des différentes sous-populations lymphocytaires obtenues par cytométrie en flux pour les rats anesthésiés à l'isoflurane.** Données présentées sous forme de pourcentage par rapport à une population cellulaire parente donnée, puis en valeur absolue (nombre de cellules x1000 par rate dissociée).

Parmi ces différents groupes, des variations en nombre de cellule ont pu être observées.

- Tout d'abord une diminution significative de la cellularité totale splénique a été observée chez le groupe NSV 3h comparé au groupe Sham 3h (diminution d'environ 25% ;  $p < 0,05$ ) de même que pour le groupe NSV 3h comparé au groupe contrôle (diminution d'environ 22% ;  $p < 0,05$ ) (figure 42 A).
- Cette diminution significative pour le groupe NSV 3h a été retrouvée pour d'autres sous-types cellulaires :
  - o lymphocytes totaux (diminution d'environ 24% entre NSV 3h et Sham 3h ;  $p < 0,05$ ) (figure 42 B),
  - o lymphocytes T (diminution d'environ 26% entre NSV 3h et Sham 3h ;  $p < 0,05$ ) (figure 42 C),
  - o lymphocytes T CD4 (diminution d'environ 26% entre NSV3h et Sham 3h ;  $p < 0,05$ ) (figure 42 D),
  - o lymphocytes T CD4 activés (CD4 CD25+) (diminution d'environ 27% entre NSV3h et Sham 3h;  $p < 0,05$ ) (figure 42 E).
- Un effet de la NSV sur les cellules T possédant le récepteur TCR  $\gamma\delta$  était également observé. La NSV induisait une diminution significative du nombre de cellules TCR  $\gamma\delta$  pour le groupe NSV 3h comparé au groupe Sham 3h (diminution d'environ 29%;  $p < 0,05$ ) (figure 42 F).
- Une diminution, bien que non significative, était aussi observée pour le groupe NSV 3h comparé au groupe Sham 3h pour les sous-populations suivantes :
  - o lymphocytes T CD8 (diminution d'environ 26% entre NSV 3h et Sham 3h),
  - o lymphocytes B (diminution d'environ 29% entre NSV 3h et Sham3h),
  - o cellules NK (diminution d'environ 21% entre NSV 3h et Sham 3h),

Les données obtenues montrent également que la NSV 20 min n'avait pas d'effet significatif sur les sous-populations lymphocytaires spléniques.



**Figure 42 :** nombre de cellules des différentes sous-populations lymphocytaires spléniques par rate (A : cellularité totale, B : nombre de lymphocytes totaux, C : nombre de lymphocytes T CD3, D : nombre de lymphocytes T CD4, E : nombre de lymphocytes T CD4 CD25+, F : Nombre de lymphocytes CD3 TCR $\gamma\delta$ ) issue de rats anesthésiés à l’isoflurane, après dissociation. Cadre vert : groupe NSV 3h ; cadre orange : groupe Sham 3h. (\* :  $p < 0,05$ ).

Les différences de cellularité entre le groupe NSV 3h et Sham 3h ont été retrouvées pour la très grande majorité des sous-populations étudiées. Ces résultats suggèrent un effet global de la NSV sur toutes les sous-populations lymphocytaires spléniques, non-spécifique à une sous-population donnée.

#### 4.1.2 Dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture

Afin d'approfondir l'étude et de déterminer les répercussions de la NSV sur la fonctionnalité des splénocytes, un dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture a été réalisé. Le dosage CBA des cytokines suivantes: IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-10 a été effectué sur les surnageants de culture de 48 heures des splénocytes activés (co-activation CD3 CD28) ou non activés. Les valeurs moyennes des concentrations des cytokines dosées (en pg/ml) sont récapitulées dans les tableaux suivants.

	Contrôle activé isoflurane		Sham 20 min activé isoflurane		Sham 3h activé isoflurane		NSV 20 min activé isoflurane		NSV 3h activé isoflurane	
	moyenne	$\pm$ SEM	moyenne	$\pm$ SEM	moyenne	$\pm$ SEM	moyenne	$\pm$ SEM	moyenne	$\pm$ SEM
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	10713.9	2304.1	9547.9	1944.0	10439.6	2401.5	7431.9	1624.5	14078.1	1798.8
<b>IL-6</b>	253.3	53.9	220.7	31.8	166.5	14.0	153.6	7.5	206.8	16.0
<b>IL-1</b>	81.3	5.7	75.9	3.7	70.9	1.4	75.3	2.1	78.9	3.8
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	662.6	90.8	600.5	80.0	568.9	73.9	573.4	59.5	775.2	190.2
<b>IL-10</b>	688.6	180.0	433.6	85.6	492.8	97.0	558.3	58.0	695.3	97.3
<b>IL-4</b>	91.2	11.1	79.0	6.7	82.3	7.8	91.8	10.5	103.3	15.2
	Contrôle NA isoflurane		Sham 20 min NA isoflurane		Sham 3h NA isoflurane		NSV 20 min NA isoflurane		NSV 3h NA isoflurane	
	moyenne	$\pm$ SEM	moyenne	$\pm$ SEM	moyenne	$\pm$ SEM	moyenne	$\pm$ SEM	moyenne	$\pm$ SEM
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	170.0	0.5	170.3	0.6	171.3	1.6	170.0	1.2	169.3	0.7
<b>IL-6</b>	160.3	18.9	154.9	7.0	135.2	8.5	160.9	14.7	184.7	16.1
<b>IL-1</b>	67.1	1.4	68.2	1.1	65.5	1.1	64.9	1.7	65.5	2.1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	266.1	22.2	237.2	10.6	205.7	7.0	232.8	8.9	209.9	7.0
<b>IL-10</b>	691.5	236.1	775.2	160.0	760.0	129.1	838.2	166.3	1079.9	237.4
<b>IL-4</b>	49.2	0.6	50.4	0.6	49.2	0.8	49.5	0.7	50.1	1.0

Tableau 8 : valeurs moyennes des concentrations en pg/ml des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture de splénocytes préalablement activés ou non activés (NA).

Les sécrétions de cytokines ne sont considérées comme quantifiables que lorsqu'une différence significative est observée entre les cellules activées et non-activées. Bien que cette augmentation significative ait été observée pour, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4, aucune variation significative n'a été retrouvée entre les différents groupes expérimentaux.

Les résultats obtenus lors de cette étude sur le rat anesthésié à l'isoflurane sont en contradiction avec notre hypothèse de départ. En effet, d'après la littérature (Karimi et al. 2010)



nous nous attendions à obtenir un effet spécifique de la NSV sur une sous-population lymphocytaire splénique particulière : les lymphocytes T CD4, plutôt qu'un effet général touchant toutes les sous-populations lymphocytaires. Nous avons remis en cause l'utilisation de l'isoflurane, et en effet il a été décrit dans la littérature que cet anesthésique possède des propriétés anti-inflammatoires (Boost et al. 2009; Flondor et al. 2008 ; Hofstetter et al. 2007). Pour s'affranchir des effets non-désirés de cet anesthésique, nous avons alors renouvelé la même expérience en utilisant un autre anesthésique, le pentobarbital, décrit comme n'agissant pas sur l'inflammation. Celui-ci est utilisé comme anesthésique «contrôle» dans les différents articles étudiant les effets des anesthésiques sur l'inflammation (Hofstetter et al. 2005; Lee et al. 2004 ; Plachinta et al. 2003).

## 4.2 Etude des effets de la NSV chez le rat anesthésié au pentobarbital

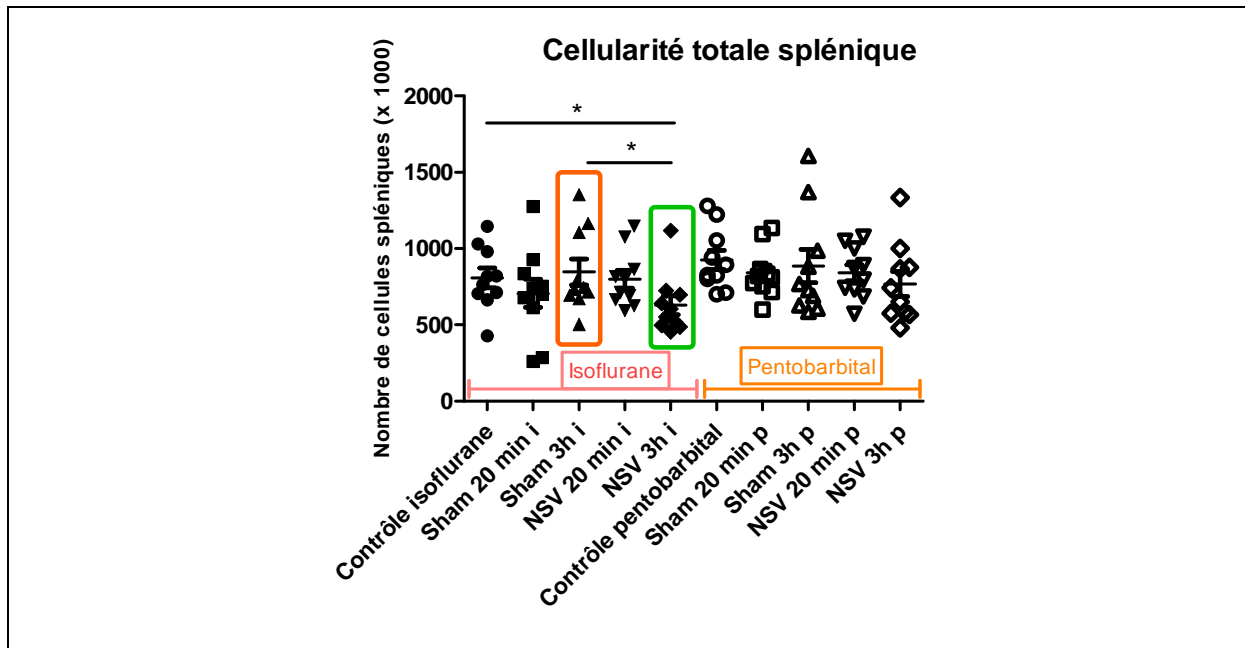
### 4.2.1 Analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques par cytométrie en flux

Les valeurs moyennes acquises lors de l'analyse par cytométrie en flux des différentes populations étudiées sont répertoriées dans le tableau suivant de la même manière que pour l'expérience précédente sur les rats anesthésiés à l'isoflurane.

	Contrôle pentobarbital		Sham 20 min pentobarbital		Sham 3h pentobarbital		NSV 20 min pentobarbital		NSV 3h pentobarbital	
	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM
% lymphocytes totaux/ cellules totales	80.0	1.5	81.1	1.2	81.1	1.0	80.4	1.0	81.5	0.7
% lymphocytes T/ lymphocytes	36.8	2.4	30.8	3.7	27.0	1.0	29.6	2.2	30.5	1.6
% lymphocytes T CD4/ CD3	70.6	1.8	68.1	3.3	70.4	1.3	71.6	3.2	71.7	2.6
% CD25/ CD4	9.6	0.4	10.6	0.8	12.2	0.6	10.9	0.3	10.5	0.5
% lymphocytes T CD8/ CD3	21.7	1.9	22.9	3.2	21.2	1.1	19.8	3.1	20.8	2.4
balance CD4/CD8	0.3	0.0	0.4	0.1	0.3	0.0	0.3	0.1	0.3	0.0
double positif CD4 CD8/ CD3	2.2	0.1	2.5	0.3	2.5	0.2	2.3	0.1	2.2	0.1
% lymphocytes B/ lymphocytes	40.1	3.5	39.8	2.3	45.2	2.1	41.2	2.7	44.3	2.3
% NK / lymphocytes	2.0	0.3	2.9	0.3	2.5	0.3	2.5	0.2	2.2	0.4
% NKT / lymphocytes T	8.6	0.4	11.8	0.8	12.3	0.8	11.2	1.0	9.4	0.7
% TCRαβ/ CD3	93.8	0.8	91.2	1.0	91.0	0.7	91.2	1.2	93.1	0.5
% TCRγδ/ CD3	4.6	0.4	6.7	0.7	7.3	0.6	6.5	0.6	5.5	0.5
% TCRαβ/ NKT	67.1	4.2	58.9	3.8	60.2	3.3	60.5	3.3	65.4	2.4
% TCRγδ/ NKT	23.5	1.4	30.0	2.3	30.9	2.8	28.1	2.1	25.6	2.3
<b>cellularité totale</b>	<b>925.6</b>	<b>67.0</b>	<b>840.8</b>	<b>54.5</b>	<b>885.2</b>	<b>115.3</b>	<b>841.6</b>	<b>55.4</b>	<b>767.8</b>	<b>86.4</b>
<b>nombre de lymphocytes totaux</b>	<b>742.1</b>	<b>58.6</b>	<b>681.3</b>	<b>44.9</b>	<b>719.6</b>	<b>94.6</b>	<b>675.2</b>	<b>43.1</b>	<b>625.1</b>	<b>69.5</b>
<b>nombre de lymphocytes T</b>	<b>274.9</b>	<b>30.8</b>	<b>212.7</b>	<b>30.8</b>	<b>196.8</b>	<b>29.4</b>	<b>202.1</b>	<b>24.3</b>	<b>190.0</b>	<b>22.9</b>
<b>nombre de lymphocytes T CD4</b>	<b>194.8</b>	<b>22.8</b>	<b>142.3</b>	<b>19.2</b>	<b>138.8</b>	<b>21.2</b>	<b>144.3</b>	<b>17.6</b>	<b>137.9</b>	<b>19.6</b>
<b>nombre de lymphocytes T CD4 CD25+</b>	<b>18.8</b>	<b>2.5</b>	<b>14.4</b>	<b>1.7</b>	<b>17.2</b>	<b>3.2</b>	<b>15.6</b>	<b>1.8</b>	<b>14.4</b>	<b>2.0</b>
<b>nombre de lymphocytes T CD8</b>	<b>60.5</b>	<b>8.5</b>	<b>52.1</b>	<b>12.5</b>	<b>41.7</b>	<b>6.5</b>	<b>41.5</b>	<b>10.1</b>	<b>38.1</b>	<b>5.0</b>
<b>nombre de lymphocytes B</b>	<b>305.2</b>	<b>47.9</b>	<b>268.5</b>	<b>18.9</b>	<b>326.8</b>	<b>48.9</b>	<b>277.9</b>	<b>24.9</b>	<b>275.4</b>	<b>32.4</b>
<b>nombre de NK</b>	<b>14.4</b>	<b>1.7</b>	<b>19.0</b>	<b>1.9</b>	<b>18.8</b>	<b>3.7</b>	<b>17.1</b>	<b>1.8</b>	<b>12.7</b>	<b>2.1</b>
<b>nombre de NKT</b>	<b>29.8</b>	<b>3.6</b>	<b>32.6</b>	<b>3.5</b>	<b>32.5</b>	<b>4.6</b>	<b>29.9</b>	<b>3.4</b>	<b>22.5</b>	<b>2.8</b>
<b>nombre de LT avec TCRαβ</b>	<b>297.1</b>	<b>34.0</b>	<b>228.2</b>	<b>26.3</b>	<b>214.4</b>	<b>28.8</b>	<b>220.9</b>	<b>25.8</b>	<b>203.5</b>	<b>24.6</b>
<b>nombre de LT TCRγδ</b>	<b>14.6</b>	<b>2.6</b>	<b>15.6</b>	<b>0.9</b>	<b>17.9</b>	<b>3.5</b>	<b>15.2</b>	<b>1.7</b>	<b>11.9</b>	<b>1.4</b>
<b>nombre de NKT avec TCRαβ</b>	<b>19.9</b>	<b>2.6</b>	<b>19.1</b>	<b>2.1</b>	<b>19.5</b>	<b>2.9</b>	<b>18.1</b>	<b>2.3</b>	<b>15.0</b>	<b>2.3</b>
<b>nombre de NKT avec TCRγδ</b>	<b>7.1</b>	<b>1.2</b>	<b>9.4</b>	<b>0.7</b>	<b>10.3</b>	<b>1.8</b>	<b>8.3</b>	<b>1.2</b>	<b>5.6</b>	<b>0.8</b>

**Tableau 9 : valeurs moyennes des différentes sous-populations lymphocytaires obtenues par cytométrie en flux pour les rats anesthésiés au pentobarbital.** Données présentées sous forme de pourcentage par rapport à une population cellulaire donnée, puis en valeur absolue (nombre de cellules x1000 par rate dissociée).

Tout d'abord aucune diminution significative de la cellularité splénique totale n'a été observée comme cela a pu être le cas lors de l'utilisation de l'isoflurane (figure 43).

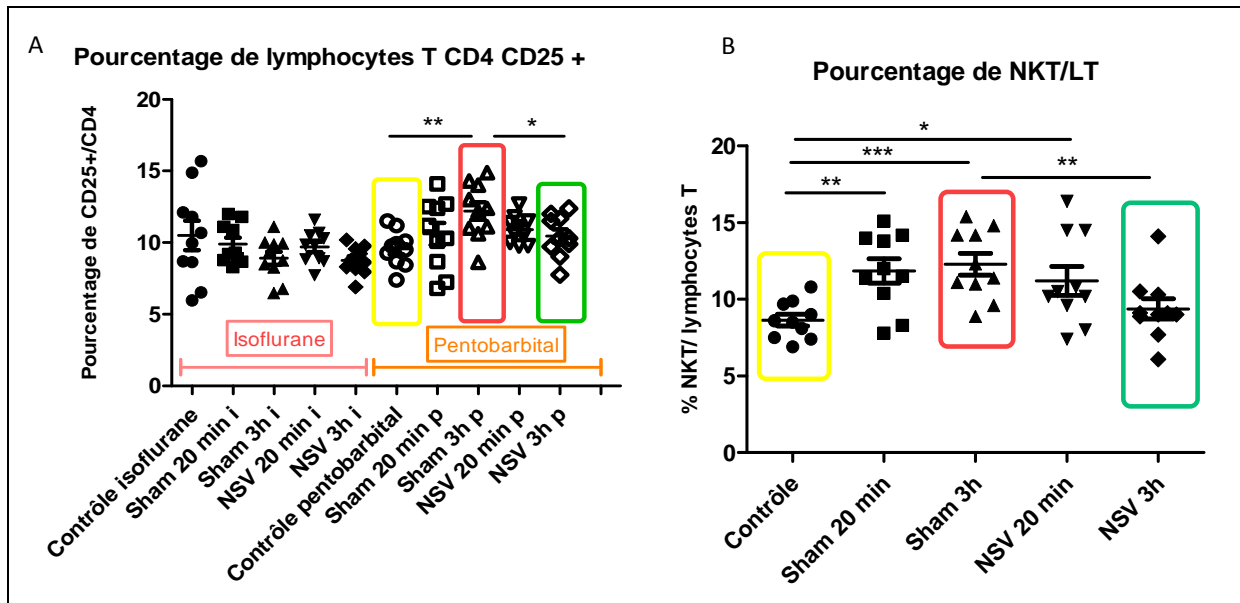


**Figure 43 : cellularité totale splénique pour les différentes conditions** (Contrôle, Sham 20min ou 3h, NSV 20min ou 3h) et selon l'anesthésique utilisé (i : isoflurane, p : pentobarbital). Cadre vert : groupe NSV 3h isoflurane ; cadre rouge : goupe Sham 3h isoflurane. (\* :  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.1 Effet de la NSV sur les sous-populations lymphocytaires spléniques

Une hausse significative (environ 27% ;  $p < 0,05$ ) de l'activation lymphocytaire (pourcentage de CD25+ dans la population des lymphocytes T CD4) pour le groupe Sham 3h comparé au groupe Contrôle a été observée (figure 44 A), celle-ci pourrait être causée par l'inflammation provoquée par la chirurgie. Toutefois, un effet de la NSV est distingué car l'activation lymphocytaire était diminuée significativement (diminution d'environ 14%,  $p < 0,05$ ) pour le groupe NSV 3h par rapport au groupe Sham 3h.

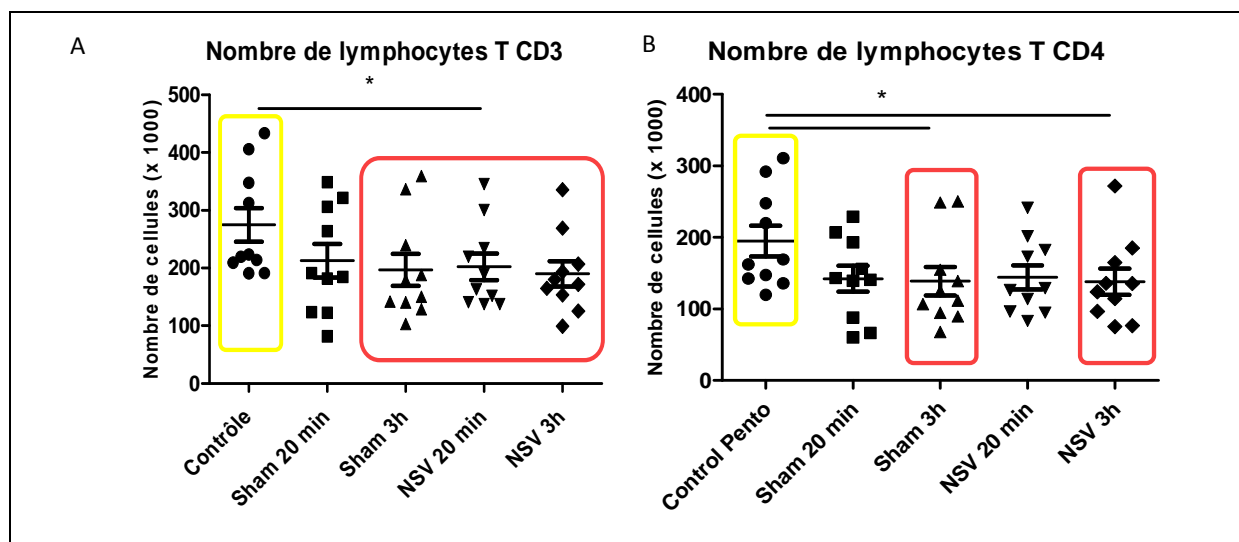
L'effet de la NSV se retrouve également au niveau de la population des NKT, une diminution significative (environ 19% ;  $p < 0,05$ ) du pourcentage de NKT par rapport aux lymphocytes T a été observée pour le groupe NVS 3h comparé au groupe Sham 3h. Cet effet n'était pas retrouvé lors de l'utilisation de l'isoflurane (figure 44 B).



**Figure 44 : effets de la NSV sur les lymphocytes T et les NKT spléniques.** A : pourcentage de CD25 + parmi la population des LT CD4 représentant l'activation lymphocytaire en fonction des différentes conditions (Contrôle, Sham 20 min ou 3h, NSV 20 min ou 3h) et de l'anesthésique utilisé (i : isoflurane, p : pentobarbital). Cadre rouge : groupe Sham 3h ; cadre jaune : groupe Contrôle ; cadre vert : groupe NSV 3h. B : pourcentage de NKT parmi les lymphocytes T spléniques chez des rats anesthésiés au pentobarbital en fonction des groupes expérimentaux. Cadre jaune : groupe contrôle ; cadre rouge : groupe Sham 3h ; cadre vert : groupe NSV 3h. (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.2.1.2 Effet de l'anesthésie et/ou de la chirurgie sur les sous-populations lymphocytaires spléniques

Un effet sur tous les groupes d'animaux opérés par rapport au groupe Contrôle (anesthésié et euthanasié sans opération) a été observé. En effet, pour tous les animaux ayant eu la chirurgie permettant la mise en place de l'électrode de stimulation, une diminution d'environ 27% du nombre de lymphocytes T CD3 (groupes NSV 3h, Sham 3h et NSV 20 min par rapport au contrôle ;  $p < 0,05$ ) était observée (figure 45 A). Cette baisse était également observée pour la population de lymphocytes T CD4 (diminution significative d'environ 29% pour les groupes NSV 3h et Sham 3h par rapport au groupe contrôle;  $p < 0,05$  ; et diminution non significative pour les groupes Sham 20min et NSV 20min d'environ 26 % par rapport au groupe contrôle) (figure 45 B). Ces variations en nombre de cellules pourraient être le résultat d'une réaction inflammatoire précoce induite par la chirurgie au niveau du site de l'implantation de l'électrode.



**Figure 45 : effet de l’anesthésie et/ou de la chirurgie sur les lymphocytes T spléniques.** Nombre de lymphocytes T (A) et de lymphocytes T CD4 (B) spléniques après dissociation de la rate issue de rats anesthésiés au pentobarbital. Cadre jaune : groupe contrôle. (\* :  $p < 0,05$ ).

L’utilisation du pentobarbital, répertorié comme n’ayant pas d’effet sur l’inflammation, a permis d’obtenir des données différentes sur l’analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques.

Toutefois, les résultats concernant la NSV 20min sont les mêmes que pour l’étude chez les rats anesthésiés à l’isoflurane : pas d’effet de la NSV 20min sur les sous-populations lymphocytaires spléniques. Ceci pourrait s’expliquer par le fait que la NSV ne dure pas assez longtemps pour induire des changements au niveau splénique.

#### 4.2.2 Dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture issus des rats anesthésiés au pentobarbital

Un dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture a été réalisé comme précédemment sur les rats anesthésiés à l’isoflurane. Les valeurs moyennes des concentrations dosées des différentes cytokines sont récapitulées dans le tableau suivant.

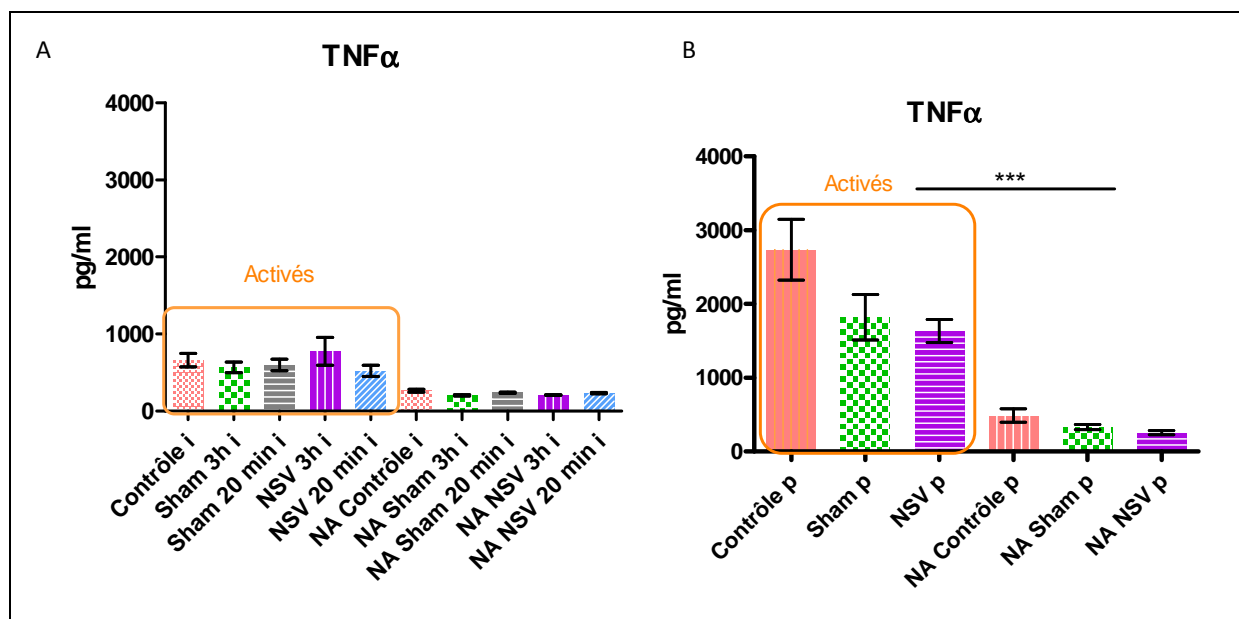
	Contrôle activé pentobarbital		Sham 3h activé pentobarbital		NSV 3h activé pentobarbital		Contrôle NA pentobarbital		Sham 3h NA pentobarbital		NSV 3h NA pentobarbital	
	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	8029.1	1697.5	5322.3	1176.7	6417.5	1230.8	93.0	0.7	95.1	1.7	92.6	0.9
<b>IL-6</b>	110.4	29.9	102.2	34.2	89.7	20.2	78.5	24.2	103.3	18.1	77.8	22.1
<b>IL-1</b>	61.9	2.8	57.6	2.1	55.9	2.2	47.4	1.2	46.1	0.6	44.6	0.8
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	2736.0	436.2	1635.6	349.5	1634.2	164.9	487.5	94.9	333.6	37.4	256.2	29.2
<b>IL-10</b>	593.9	81.6	533.5	78.1	593.9	65.2	1135.1	199.5	1212.0	211.7	1821.6	217.6
<b>IL-4</b>	6.9	13.0	7.4	15.5	4.3	12.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Tableau 10 : valeurs moyennes des concentrations en pg/ml des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture de splénocytes préalablement activés ou non activés (NA).n.d. : non détectable.**

Un nombre plus important de cytokines était quantifiable (différence significative observée entre les cellules activées et non-activées) avec les rats anesthésiés au pentobarbital qu'à l'isoflurane : l'IFN- $\gamma$ , l'IL-4, l'IL-10, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ . Aucun effet significatif de la NSV sur la sécrétion de ces cytokines (tout comme avec l'utilisation de l'isoflurane) n'a été retrouvé.

Il est à noter que la sécrétion d'IL-10 est plus importante pour les splénocytes non-activés que pour les activés. Ce résultat est présent pour l'étude précédente pour les rats anesthésiés à l'isoflurane mais statistiquement non significatif. Le fait que la sécrétion d'IL-10 soit plus importante chez les splénocytes non-activés peut s'expliquer par le fait que l'IL-10 est sécrétée par les lymphocytes mais également par les monocytes (présents à hauteur de 50% dans la rate), les mastocytes et les lymphocytes B. Les lymphocytes ont besoin d'être préalablement activés (CD3 CD28) pour sécréter de l'IL-10. Les monocytes et mastocytes spléniques sont donc probablement les cellules sécrétrices d'IL-10 retrouvée dans le surnageant des cultures de splénocytes non-activés. Le niveau d'IL-10 est plus bas pour les splénocytes activés car l'activation des lymphocytes va également permettre la sécrétion d'autres cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ . Cette dernière est reconnue pour inhiber la sécrétion d'IL-10, ceci pourrait donc expliquer le plus faible niveau d'IL-10 retrouvé pour les splénocytes totaux activés comparés aux non-activés (Chomarat et al. 1993).

D'autre part, des différences importantes de niveau de sécrétion de TNF- $\alpha$  ont pu être mises en évidence en fonction de l'anesthésique utilisé. La sécrétion moyenne de TNF- $\alpha$  des splénocytes activés issus des rats anesthésiés à l'isoflurane était de 600 pg/ml alors qu'elle était de 2000 pg/ml pour les rats anesthésiés au pentobarbital (figure 46). L'utilisation de l'isoflurane inhiberait la sécrétion de TNF- $\alpha$  des splénocytes en culture et activés (CD3 CD28) pendant 48h. Cet effet n'a pas été retrouvé avec le pentobarbital. Ce point est un argument supplémentaire démontrant l'effet anti-inflammatoire qu'exerce l'isoflurane en inhibant la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire.



**Figure 46 : concentrations de TNF- $\alpha$  sécrété par les splénocytes en culture** (activés : CD3 CD28 ou non activés : NA). A : splénocytes issus de rats anesthésiés à l'isoflurane (i : isoflurane). B : splénocytes issus de rats anesthésiés au pentobarbital (p : pentobarbital). La moyenne de sécrétion des splénocytes activés (cadre orange) pour les rats anesthésiés à l'isoflurane est de 600pg/ml et de 2000pg/ml pour les rats anesthésiés au pentobarbital.

Ces différents effets obtenus avec l'utilisation du pentobarbital lors de l'analyse en cytométrie en flux et des dosages CBA des sécrétions des cytokines des splénocytes en culture n'ont pas été retrouvés lors de l'étude avec l'isoflurane (tableau 11). Cette différence pourrait s'expliquer par l'effet anti-inflammatoire induit par l'isoflurane qui permettrait alors de masquer ces effets obtenus lors de l'utilisation du pentobarbital.

	Non-stimulés	Stimulés 3h
<b>Pentobarbital</b>	↓ LT/ contrôle ↓ LT CD4/contrôle ↑ activation lymphocytaire/contrôle → Effet chirurgie ?	↓ LT/contrôle ↓ LT CD4/contrôle ↓ activation lymphocytaire/Sham 3h ↓%NKT/LT/Sham 3h → Effet NSV ?
<b>Isoflurane</b>	Pas de modification → Effet anti-inflammatoire Isoflurane?	↓ LT et autres sous-populations/Sham3h

**Tableau 11 : résumé des effets obtenus lors de l'analyse par cytométrie en flux selon l'anesthésique utilisé.**

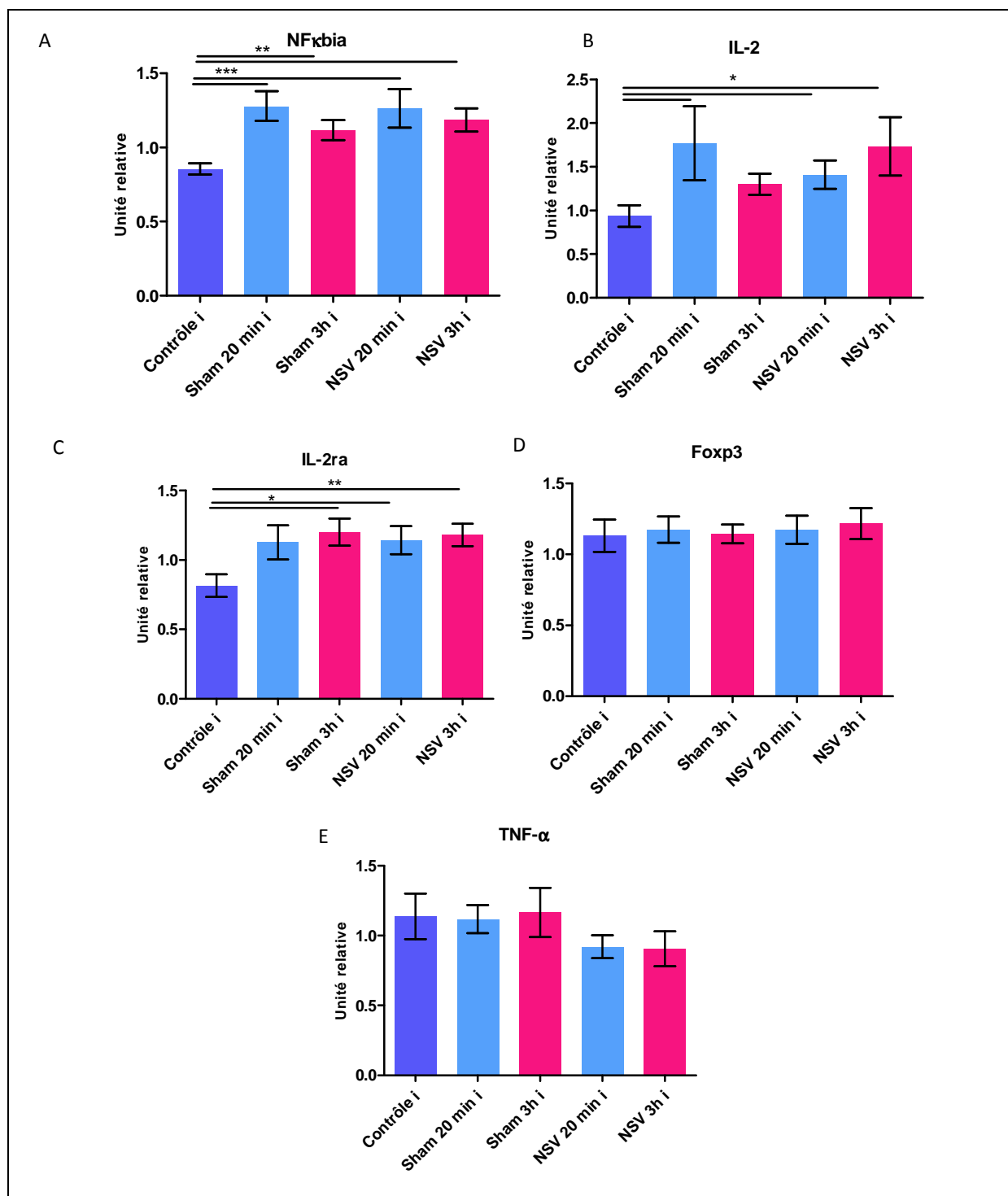
### 4.3 Dosage des ARNm par q RT-PCR

Le dosage des ARNm par q RT-PCR a été réalisé sur les splénocytes après dissociation. Les ARNm étaient détectables pour les gènes d'intérêts suivants : NFκBia, IL-2, IL-2ra, TNF-α et Foxp3. Toutefois, le niveau d'expression de l'IL-17, l'IL-10, l'IL-4 et l'IFN-γ s'est avéré trop faiblement exprimé, ne nous permettant donc pas de les quantifier.

Le dosage des ARNm des gènes cibles est exprimé en unité relative c'est à dire, la valeur de l'ARNm du gène d'intérêt par rapport à la moyenne géométrique des trois gènes de référence (CYCA, ARBP, HPRT).

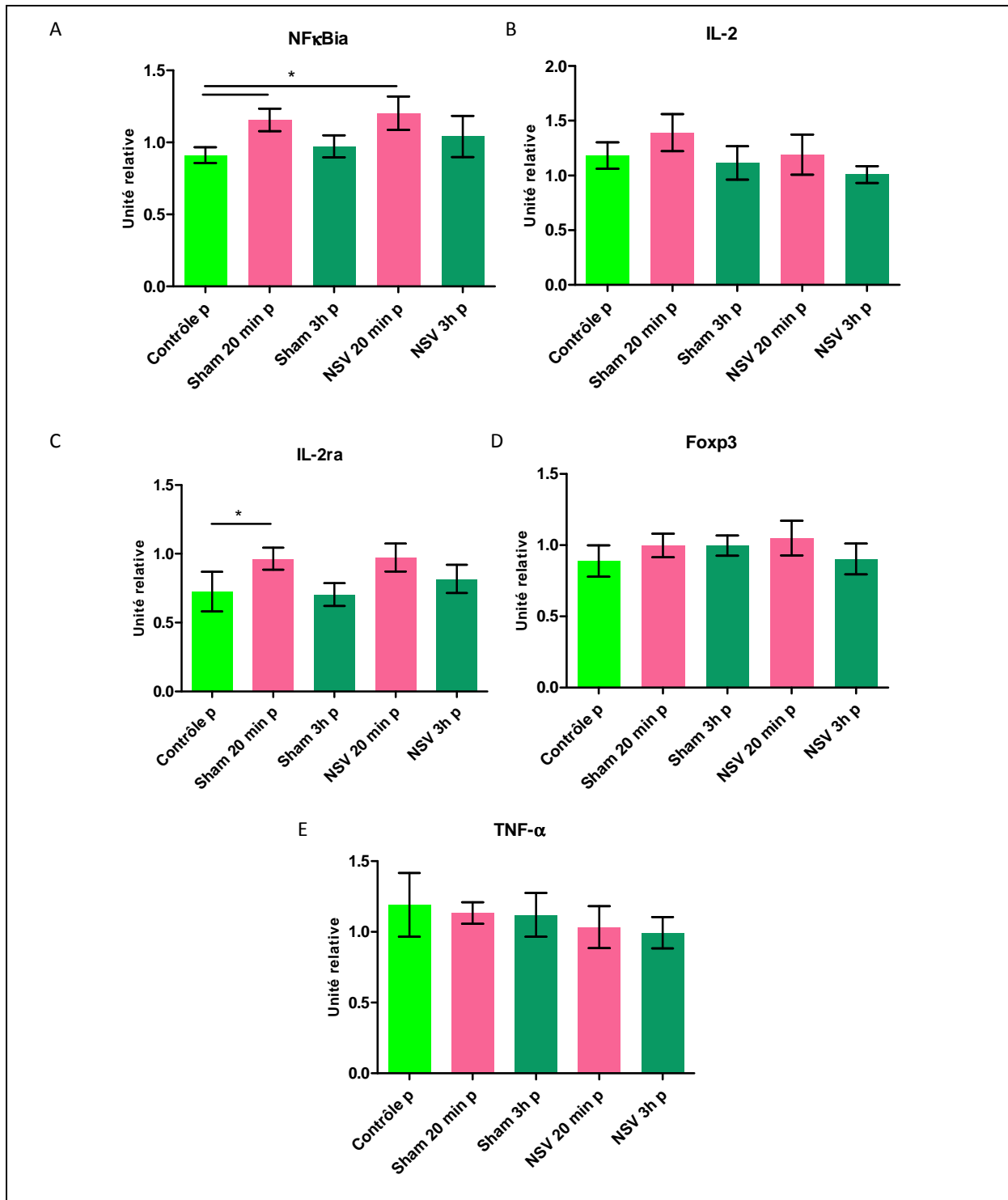
Le dosage des ARNm des gènes d'intérêts ne montrait pas d'effet de la NSV sur l'expression de ces différents facteurs que ce soit pour des rats anesthésiés à l'isoflurane ou au pentobarbital (figure 47).

Par contre, des résultats différents ont été observés selon l'anesthésique utilisé. En effet, pour les rats anesthésiés à l'isoflurane une augmentation significative de tous les groupes par rapport au groupe contrôle pour NFκBia était observée. Cet effet était retrouvé pour l'IL-2 et l'IL-2ra. Il était visible sur les animaux opérés (stimulés ou non) ; ceci pourrait refléter un effet de la chirurgie. Ce résultat n'a pas été retrouvé pour les animaux anesthésiés au pentobarbital (figure 48), en effet aucun changement statistiquement significatif n'a été constaté pour les animaux anesthésiés au pentobarbital sauf pour NFκBia où une augmentation significative était observée pour les groupes Sham 20 min et NSV 20 min par rapport au groupe contrôle.



**Figure 47 : dosage des ARNm dans les splénocytes des rats anesthésiés à l'isoflurane (i : isoflurane). Unité relative : ARNm du gène d'intérêt/moyenne géométrique des gènes de référence (ARBP, CYCA et HPRT). (\*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001).**





**Figure 48 : dosage des ARNm dans les splénocytes des rats anesthésiés au pentobarbital (p : pentobarbital). Unité relative : ARNm du gène d'intérêt/moyenne géométrique des gènes de référence (ARBP, CYCA et HPRT). ( $p < 0,05$ ).**

Il est intéressant de noter un niveau général plus bas pour les ARNm dosés chez les animaux anesthésiés au pentobarbital par rapport à ceux anesthésiés à l'isoflurane. Pour l'ARNm codant pour le gène Foxp3, une baisse significative ( $p < 0,05$ ) pour le groupe NSV 3h pentobarbital par rapport au groupe NSV 3h isoflurane était observée et cette tendance était retrouvée pour tous les autres

groupes. Cette baisse était également significative pour l'ARNm codant pour l'IL-2 ( $p < 0,05$ ) et l'IL-2ra ( $p < 0,05$ ) pour le groupe NSV 3h pentobarbital comparé au groupe NSV 3h isoflurane (figure 49).

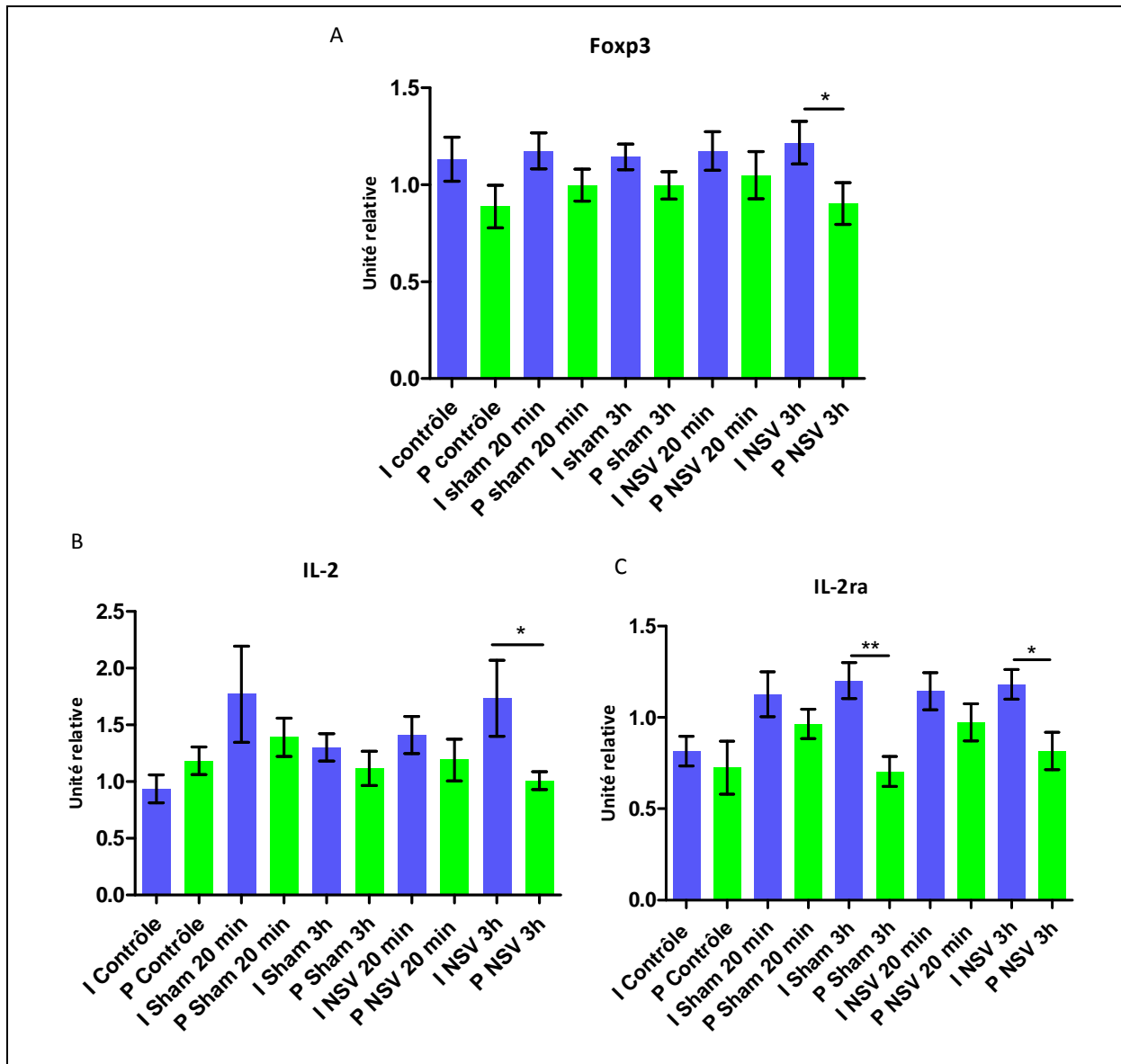


Figure 49 : comparaison des ARNm dosés dans les splénocytes des rats anesthésiés à l'isoflurane et au pentobarbital. Unité relative : ARNm du gène d'intérêt/moyenne géométrique des gènes de référence (ARBP, CYCA et HPRT). I : isoflurane, P : pentobarbital. (\* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ ).

## 5. Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance du choix de l'anesthésique lors d'expérimentations sur l'animal notamment pour les études de phénomènes pro- ou anti-inflammatoires. Le pentobarbital, appartenant à la classe des barbituriques, présente des effets secondaires le rendant moins facile d'utilisation que l'isoflurane notamment de par son puissant effet déresseur cardio-respiratoire. De plus, la dose limite entre anesthésie profonde et dose létale est très proche, ce qui rend son dosage relativement difficile au cours de longues anesthésies comme dans cette étude (4h d'anesthésie) et pouvant induire une forte mortalité ; le temps de récupération est également très long. A l'inverse, l'isoflurane présente de nombreux aspects positifs : facilité d'utilisation, rapidité de l'endormissement et du réveil, absence du stress engendré par l'injection, dosage modifiable très facilement au fur et à mesure de l'intervention selon l'état de l'animal. Toutefois, l'isoflurane possède des propriétés anti-inflammatoires qui sont sources d'interférences lors de la réalisation d'études portant sur l'inflammation (Boost et al. 2009; Flondor et al. 2008; Hofstetter et al. 2007; Hofstetter et al. 2005; Lee et al. 2004 ; Plachinta et al. 2003). En effet, l'étude de Hofstetter et al. 2005, a démontré qu'un prétraitement de seulement 50 secondes d'isoflurane avant une anesthésie au pentobarbital/fentanyl chez un modèle de rats endotoxémiques induit une diminution significative des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) circulantes, ainsi qu'une diminution de la production d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages isolés (Hofstetter et al. 2005). Cette diminution de sécrétion de NO par les macrophages lors de l'utilisation d'isoflurane a été préalablement observée dans l'étude de Tschaikowsky et al. (Tschaikowsky et al. 2000) qui confirme l'effet anti-inflammatoire de l'isoflurane, même lors d'une utilisation très brève. Cet effet a été préalablement mis en évidence par Mitsuhata et al. en 1995 et de Rossi et al. en 2004 (de Rossi et al. 2004; Mitsuhata et al. 1995). Ces deux études ont montré que l'utilisation de l'isoflurane diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) induites par le LPS dans les cellules mononuclées du sang en culture et dans du sang humain ex vivo.

D'après nos résultats, l'utilisation d'isoflurane semble provoquer des interférences avec la NSV. En effet, toutes les sous-populations lymphocytaires diminuaient pour le groupe de rats anesthésiés à l'isoflurane et stimulés 3h alors que ce phénomène n'était pas observé pour les animaux anesthésiés au pentobarbital. De plus, l'isoflurane semble inhiber la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les splénocytes en culture pendant 48h et préalablement activés, et il est constaté que le niveau moyen de TNF- $\alpha$  sécrété par les splénocytes issus des rats anesthésiés au pentobarbital était environ 3 fois plus important que le niveau moyen dosé dans les surnageants de splénocytes issus des rats anesthésiés à l'isoflurane. Ce résultat renforce notre hypothèse selon laquelle les propriétés anti-

inflammatoires que possède l'isoflurane influencent la réponse immunitaire dans notre étude. En outre, les résultats obtenus lors de la quantification des ARNm sont différents selon l'anesthésique utilisé. Tout d'abord une diminution de l'expression d'ARNm a été observée dans les splénocytes provenant des rats anesthésiés au pentobarbital par rapport aux rats anesthésiés à l'isoflurane. Ensuite, il est intéressant de noter que les dosages des ARNm des rats anesthésiés à l'isoflurane montraient plus de variations d'expression que ceux des rats anesthésiés au pentobarbital. Une augmentation de l'expression des ARNm codant pour le NFκB, l'IL-2 et son récepteur l'IL-2ra était observée pour tous les groupes opérés comparés au groupe contrôle ce qui pourrait révéler l'effet d'une inflammation induite par la chirurgie pour l'implantation de l'électrode. Ce résultat est en contradiction avec l'effet observé au niveau cellulaire pour les rats anesthésiés à l'isoflurane pour lesquels aucune différence n'était observée entre le groupe contrôle et les groupe opérés. L'augmentation de l'ARNm codant pour le NFκB indique que les cellules en synthétisent de nouveau suite à sa dégradation. Ceci traduit une activation de la voie de signalisation NFκB préalablement et donc la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Ce résultat est conforté par l'observation de l'augmentation de l'ARNm codant pour l'IL-2 et l'IL-2ra. L'inverse était retrouvé pour les rats anesthésiés au pentobarbital, des variations au niveau des cellules immunitaires spléniques étaient observées ; par contre aucune modification au niveau des ARNm des gènes cibles pour les groupes Sham 20 min et NSV 20 min par rapport au groupe contrôle n'a été retrouvée sauf pour NFκB qui lui augmentait. Cette différence obtenue entre les deux anesthésiques pourrait être expliquée par le fait que l'isoflurane atténuerait l'inflammation causée par la chirurgie, ce qui nous permet d'observer un changement au niveau des ARNm même pour les groupes 3h. A l'inverse, pour les rats anesthésiés au pentobarbital il n'y a pas d'effet anti-inflammatoire induit par l'anesthésique, l'inflammation étant donc plus importante, la réponse de la cellule se réalise plus précocement ce qui est retrouvé pour les rats des groupes 20 minutes et pas pour les groupes 3h.

Il a été démontré que l'expression d'ARNm quantifiée n'était pas directement reliée à la quantité de protéines retrouvées suite à différents phénomènes de régulation transcriptionnelle et/ou traductionnelle selon les gènes d'intérêts (Gygi et al. 1999). Néanmoins, ces résultats permettent d'obtenir des informations différentes, tout d'abord au niveau de l'ARNm : une information sur la réponse de la cellule face à la NSV et à l'utilisation de différents anesthésiques avant les différentes étapes de régulations transcriptionnelles et traductionnelles ; puis au niveau cellulaire : l'effet physiologique et biologique de la NSV couplée à différents anesthésiques.

L'analyse en cytométrie en flux a permis de mettre en évidence que la combinaison de la NSV et l'utilisation de l'isoflurane induit une diminution importante de la présence de toutes les sous-populations lymphocytaires spléniques pour le groupe NSV 3h comparé au groupe Sham 3h. Par

contre, l'utilisation du pentobarbital a permis de mettre en évidence une diminution conséquente du nombre de lymphocytes T et de lymphocytes T CD4 pour tous les groupes opérés par rapport au groupe contrôle. Une augmentation de l'activation lymphocytaire (pourcentage de CD25 parmi la population des LT CD4) a également été observée pour le groupe Sham 3h par rapport au groupe contrôle. Ces résultats peuvent être interprétés grâce à l'hypothèse suivante : la chirurgie permettant la mise en place de l'électrode au niveau cervical du nerf vague gauche induirait une inflammation qui serait à l'origine d'une diminution de cellules immunitaires au niveau de la rate et une augmentation de leur activation, plus particulièrement de lymphocytes T. Pour expliquer la différence entre les données obtenues selon les anesthésiques utilisés, une hypothèse peut être avancée : l'isoflurane, possédant des propriétés anti-inflammatoires, «dissimulerait» les variations au niveau des populations lymphocytaires spléniques induites par la chirurgie permettant la mise en place de l'électrode de stimulation. Au contraire, l'utilisation de pentobarbital, qui ne possède pas de propriétés immunomodulatrices, permettrait la mise en évidence de variations induites par la chirurgie au niveau des cellules immunitaires spléniques.

Le pentobarbital, bien qu'il soit moins facile d'utilisation pour des anesthésies de longue durée, semble être plus adapté que l'isoflurane pour l'étude des phénomènes inflammatoires en expérimentation animale. Ne possédant pas de propriétés immunorégulatrices, il est couramment utilisé en tant qu'anesthésique contrôle dans les études des effets des anesthésiques sur l'inflammation (Kim et al. 2012; Mu et al. 2010). Le pentobarbital a donc été choisi comme anesthésique pour la suite de ce travail.

Cette étude a également permis de répondre aux questions initiales suivantes concernant le mécanisme d'action de la NSV basse fréquence et de ses répercussions sur le système immunitaire : la NSV 5Hz a-t-elle un effet sur la rate et a-t-elle d'autres cibles que les macrophages ? La voie anti-inflammatoire cholinergique est connue pour être activée lors de la NSV basse fréquence permettant d'induire l'effet anti-inflammatoire périphérique en activant la sécrétion d'ACh par les efférences vagales (Bernik et al. 2002b ; Borovikova et al. 2000b ; Tracey 2009). L'ACh se fixe alors sur les récepteurs nicotiques des macrophages et permet d'inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF- $\alpha$  de manière dose dépendante. Toutefois, d'autres cellules immunitaires que les macrophages pourraient intervenir car il a été démontré que les cellules immunitaires (LT, LB, NK) expriment des récepteurs à l'ACh (nicotiques et muscariniques) et possèdent également les enzymes nécessaires à la production et la dégradation d'ACh (Kawashima and Fujii 2003). De plus, l'importance de la rate dans la voie anti-inflammatoire cholinergique a également récemment été mise en évidence. Huston et al. ont montré que la splénectomie inactivait la voie anti-inflammatoire cholinergique lors d'un choc septique chez la souris. Dans cette étude il a

également été démontré que le fait de léser spécifiquement les fibres nerveuses du ganglion coeliaque supprime la diminution de TNF- $\alpha$  induite par la NSV mettant en évidence un lien entre la rate et la voie anti-inflammatoire cholinergique via le NV (Huston et al. 2006). Karimi et al. ont de plus démontré que le rôle du NV dans la régulation de la réponse immunitaire n'était pas cantonné à un rôle sur le macrophage mais qu'il pouvait également agir sur les lymphocytes T CD4 spléniques. En effet, la vagotomie sous-diaphragmatique chez la souris induit une augmentation de la prolifération des LT CD4 spléniques et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après stimulation in vitro (Karimi et al. 2010). Cette étude suggère que le NV pourrait avoir un rôle atténuateur sur les lymphocytes spléniques. L'étude de l'effet de la NSV au niveau splénique et particulièrement sur les sous-populations lymphocytaires nous a donc semblé très intéressante pour vérifier si cet effet sur la rate était retrouvé dans notre modèle expérimental.

Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'effet de la NSV basse fréquence sur la rate chez un modèle de rat «sain» (ne présentant pas d'inflammation digestive) afin d'obtenir des valeurs «contrôles» sur les sous-populations lymphocytaires spléniques sans interférence induite par la présence d'une inflammation. Les résultats de cytométrie en flux obtenus sur les rats anesthésiés au pentobarbital ont mis en évidence un effet de la NSV sur certaines sous-populations lymphocytaires de la rate. La NSV 5 Hz pendant trois heures induisait une diminution significative de l'activation lymphocytaire (%CD25 dans la population des lymphocytes T CD4) par rapport au groupe Sham 3h. Il est intéressant de noter qu'une augmentation significative de l'activation lymphocytaire était présente pour le groupe Sham 3h comparé au groupe contrôle. Ceci pourrait être expliqué par la présence d'une inflammation induite par la chirurgie réalisée lors de la mise en place de l'électrode de stimulation provoquant une augmentation de l'activation des lymphocytes T CD4. La NSV induisait également une diminution significative du pourcentage de NKT parmi les lymphocytes T. Les NKT sont des cellules immunitaires reconnues pour posséder des propriétés immunorégulatrices.

Les données obtenues au cours de cette étude mettent en évidence que les sous-populations lymphocytaires spléniques sont affectées par la NSV basse fréquence pendant 3h, contrairement à la NSV 20min qui ne provoque aucune modification au niveau du nombre de cellules des sous-populations lymphocytaires spléniques. La NSV inhiberait l'activation lymphocytaire ainsi que le potentiel de sécrétion de TNF- $\alpha$  des splénocytes. Ces résultats renforcent l'hypothèse initiale : la NSV a un effet sur la rate et plus particulièrement sur les lymphocytes T CD4 et les NKT. Ce travail a permis d'obtenir des valeurs de «base» chez un modèle de rat «sain». Il semble important de continuer l'étude des effets périphériques de la NSV 5Hz sur la rate chez un modèle de rat présentant une inflammation digestive afin de vérifier que les résultats obtenus lors de cette étude chez le rat «sain» sont retrouvés lors de la phase d'initiation de l'inflammation. Il serait également intéressant

de corrélérer les résultats obtenus au niveau splénique avec des mesures de l'effet anti-inflammatoire induit par la NSV au niveau du tube digestif.

V. PARTIE 3: ETUDE DES EFFETS  
PERIPHERIQUES DE LA NSV SUR UN MODELE  
DE RAT ANESTHESIE PRESENTANT UNE COLITE  
EXPERIMENTALE



# **1. Résumé de l'étude 3 : étude des effets périphériques de la NSV sur un modèle de rat anesthésié atteint d'une colite expérimentale au TNBS**

## **1.1 Objectif de l'étude**

Cette dernière étude a été réalisée afin d'analyser les effets périphériques de la NSV au niveau de la rate ainsi qu'au niveau du tube digestif lors de la phase d'initiation de l'inflammation chez des animaux atteints d'une colite expérimentale au TNBS.

## **1.2 Matériels et méthodes**

L'expérience a été effectuée sur cinq groupes expérimentaux de rats Sprague-Dawley mâles anesthésiés au pentobarbital (injection intrapéritonéale) :

- groupe contrôle (rats anesthésiés et euthanasiés),
- groupe colite – NSV 3h,
- groupe colite – non stimulé 3h,
- groupe salin – NSV 3h,
- groupe salin – non stimulé 3h.

La colite a été induite par une injection intra-colique de 250µl d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) (30mg/kg, 50% éthanol). Les rats des groupes salins ont reçu une injection intra-colique de 250µl de sérum physiologique.

La rate était prélevée après sacrifice (Dolethal, 200mg/kg intra-cardiaque) afin d'étudier les sous-populations lymphocytaires spléniques en cytométrie en flux. Les côlons distaux et transverses ont également été prélevés afin d'étudier l'effet anti-inflammatoire de la NSV par dosage ELISA et q RT-PCR.

## **1.3 Résultats**

Les résultats de cytométrie en flux n'ont pas montré d'effet de la NSV pour les rats des groupes colite ou salin. Par contre, des effets de l'anesthésie et/ou de la chirurgie ainsi que de la colite ont été observés.

Le dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes totaux ou les lymphocytes T CD4 en culture a permis de mettre en évidence un effet de la NSV 3h induisant une augmentation significative de la sécrétion d'IL-10.

La quantification de la myéloperoxydase (MPO) par technique ELISA a montré que l'injection de TNBS provoquait une augmentation importante du taux de MPO dans le côlon distal et dans le côlon transverse. Dans le côlon transverse, au-dessus de la lésion, la NSV a eu pour effet de ramener

l'inflammation en-dessous du seuil dit de haute inflammation pour 50% des rats qui étaient au-dessus de ce seuil.

La quantification des cytokines dans le tube digestif par technique ELISA n'a pas montré d'effet de la NSV. Toutefois, un effet de l'anesthésie et/ou de la chirurgie a été retrouvé ainsi qu'un effet de la colite.

La quantification des ARNm par q RT-PCR dans le côlon transverse a mis en évidence l'effet anti-inflammatoire de la NSV : une diminution significative de l'expression de TNF- $\alpha$  et de SOCS3 pour le groupe colite-NSV3h par rapport au groupe colite-non stimulé a été observée.

#### **1.4 Conclusion**

Ces données ont mis en évidence un rôle de la NSV sur la fonctionnalité des lymphocytes T CD4 spléniques : la NSV provoque une sécrétion plus importante de cytokine anti-inflammatoire (IL-10). La NSV permettrait d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse anti-inflammatoire en phase d'initiation d'inflammation digestive.

De plus, l'effet anti-inflammatoire de la NSV retrouvé au niveau du tube digestif est observé au-dessus de la zone lésée (côlon transverse).

## **2. Objectif de l'étude**

Cette dernière étude a été réalisée afin d'analyser les effets de la NSV basse fréquence sur les populations lymphocytaires spléniques lors de la phase d'initiation d'une inflammation digestive. Des analyses au niveau du tube digestif ont également été réalisées afin d'apprécier l'effet anti-inflammatoire de la NSV lors de l'initiation de l'inflammation. Cette étude permet d'approfondir les données obtenues précédemment lors de l'étude chez le rat sain. Cette expérience était effectuée chez un modèle de rat présentant une colite expérimentale induite par une injection de TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique).

## **3. Matériels et méthodes**

### **3.1 Animaux**

L'expérimentation a été réalisée sur des rats mâles Spragues-Dawley de 260 à 280 g (Janvier, Le Genest St Isle, France).

Avant toute manipulation, les animaux se sont acclimatés à leur environnement pendant au minimum 7 jours. L'ensemble des expériences a été effectué à des créneaux horaires identiques afin de limiter les variations circadiennes. Les animaux étaient hébergés dans les mêmes conditions que pour l'étude précédente.

### **3.2 Colite au TNBS**

Le modèle de colite expérimentale (Miceli and Jacobson 2003; Morris et al. 1989) induit par l'injection intra-colique d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) (Fluka, St Quentin Fallavier, France) a été choisi pour cette étude. En effet, ce modèle permet une induction rapide de l'inflammation (ce critère est important puisque les rats sont stimulés de manière aiguë pendant 3 heures), le modèle présente des homologues au niveau lésionnelle avec la maladie de Crohn et il est bien maîtrisé dans le laboratoire (Meregnani et al. 2011; Porcher et al. 2004 ; Sinniger et al. 2005). Nous avons utilisé les mêmes conditions expérimentales d'inflammation utilisées par J. Meregnani et al. soit une dose de 250µl de TNBS, 30mg/kg diluée dans 50% d'éthanol (Meregnani et al. 2011).

L'instillation a été réalisée sur des rats anesthésiés au pentobarbital juste avant le début de la première stimulation. Une canule remontant jusqu'à l'angle colique gauche (16G, 7,5cm de longueur,

Harvard Apparatus, Les Ulis, France) a été introduite dans le côlon par voie intra-rectale afin de réaliser l'instillation (250µl). Les rats ont ensuite été mis en position de décubitus ventral déclive (abdomen surélevé) pour éviter un reflux passif du produit instillé qui pourrait minorer la colite. Les rats des groupes Salin/non-stimulé et Salin/NSV ont reçu une injection de 250µl de sérum physiologique.

### **3.3 Etude cinétique de la réponse cytokinique de la colite au TNBS**

Afin de choisir un temps optimal d'expérimentation, une étude cinétique de la réponse cytokinique lors d'une colite au TNBS a été réalisée préalablement à l'expérimentation sur les effets périphériques de la NSV sur un modèle de rat présentant une colite au TNBS. L'étude cinétique de la colite a permis d'apprécier la réponse cytokinique tissulaire au niveau du côlon distal à différents intervalles de temps après injection de TNBS.

#### **3.3.1 Groupes d'animaux**

Cette étude a été effectuée sur 48 rats, répartis dans 8 groupes différents (6 animaux par groupe), correspondants au temps de l'euthanasie après initiation de la colite :

- contrôle (3 rats prélevés à 30 minutes et 3 rats prélevés à 3h après injection de sérum physiologique),
- euthanasie 30 minutes après instillation de TNBS,
- euthanasie 1 heure et 30 minutes après instillation de TNBS,
- euthanasie 3 heures après instillation de TNBS,
- euthanasie 24 heures après instillation de TNBS,
- euthanasie 48 heures après instillation de TNBS,
- euthanasie 72 heures après instillation de TNBS,
- euthanasie 96 heures après instillation de TNBS.

La croissance pondérale des animaux était suivie quotidiennement car la colite est connue pour entraîner une perte de poids chez les animaux (Meregnani et al. 2011).

#### **3.3.2 Anesthésie**

Les animaux étaient anesthésiés à l'isoflurane, anesthésie gazeuse (système Minerve®, France). La phase d'induction (dans la cage à induction) était réalisée à 3,5% d'isoflurane (3L/min d'oxygène). Lorsque l'animal était endormi (fréquence respiratoire à 60/min) il était déplacé sur la

table opératoire et maintenu sous anesthésie (2,5% d'isoflurane, 1L/min d'oxygène). Les animaux ont reçu une injection de TNBS ou de sérum physiologique (pour les contrôles) intra-colique à l'aide d'une canule, comme décrit précédemment. Les rats étaient ensuite positionnés en décubitus ventral déclive (abdomen surélevé), puis placés dans des cages séparées et des boxes ventilés et thermorégulés selon le temps de prélèvement.

### 3.3.3 Euthanasie et prélèvements

Pour procéder aux prélèvements, les animaux étaient anesthésiés à l'isoflurane, puis euthanasiés par injection intracardiaque massive de pentobarbital (Dolethal®, 200mg/kg). Une laparotomie a été pratiquée et une portion de deux centimètres de côlon distal a été prélevée (de 1 cm au-dessus à 1 cm en dessous du point d'injection de la canule) afin de réaliser le dosage des cytokines : IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ . Les côlons distaux prélevés ont été congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C pour les dosages ultérieurs des cytokines.

Le chronogramme suivant présente le déroulement de l'expérience :

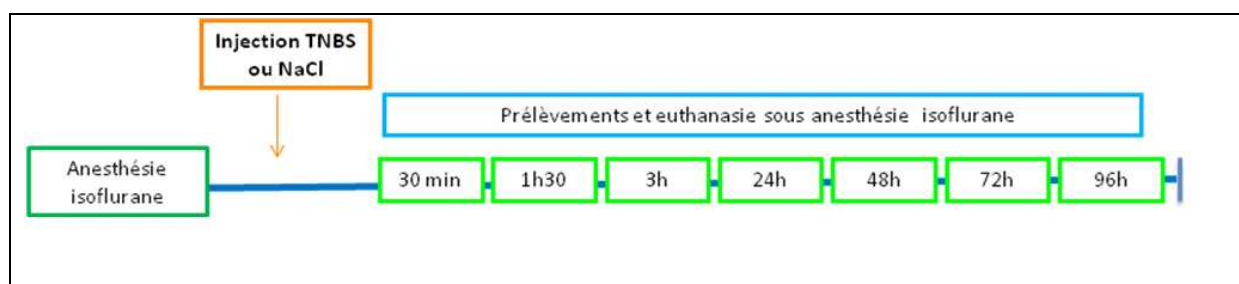


Figure 50 : chronogramme de l'étude cinétique de la colite au TNBS.

### 3.3.4 Quantification par technique ELISA de l'expression de cytokines

Les cytokines IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$  ont été dosées dans les prélèvements de côlons distaux avec les kits Quantikine Rat Immunoassay®, R&D Systems, Lille, France. La purification des protéines a été effectuée sur les prélèvements préalablement homogénéisés à l'aide du système FastPrep® (FastPrep-24 Instrument Device and Lysing matrix D from MP Biomedicals, Qbiogen, Illkirch, France). Dans une solution de PBS-EDTA (0,05mM-5mM, pH : 7,3, 4°C) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete Roche EDTA-free, Roche Diagnostics, Meylan, France). Les homogénats obtenus ont été centrifugés deux fois 15min (13000 tr/min, 4°C) et les lysats ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'au dosage ELISA.

### 3.4 Anesthésie des animaux pour l'étude des effets périphériques de la NSV sur un modèle de rat présentant une colite

Les rats ont été anesthésiés au pentobarbital injecté par voie intrapéritonéale (125µl/100g) de la même manière que préalablement décrite dans l'étude des effets périphériques de la NSV sur un modèle de rat sain. Les animaux étaient anesthésiés pendant 4 heures. Le chronogramme suivant présente le déroulement de l'expérience :

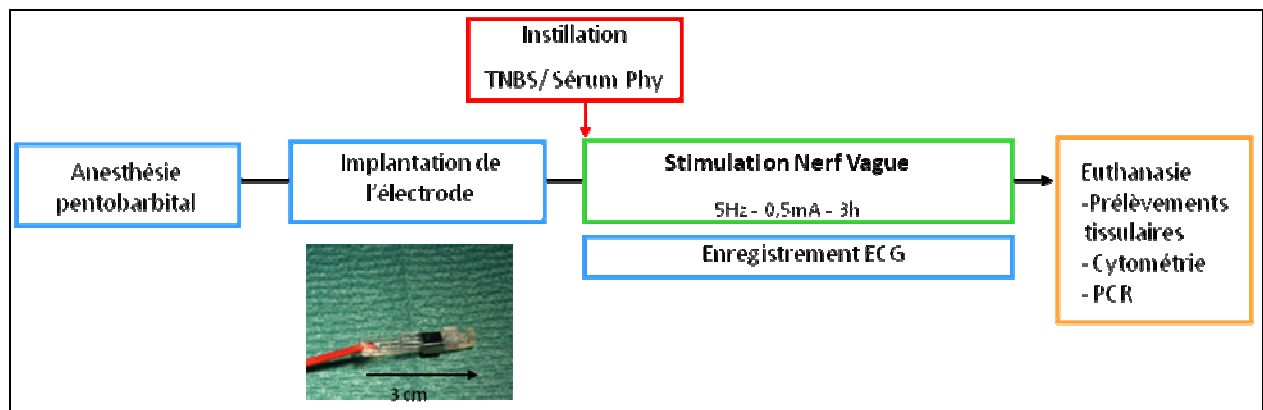


Figure 51 : chronogramme de l'expérimentation animale.

### 3.5 Chirurgie

La phase chirurgicale était la même que pour l'étude précédente (cf. p. 100).

### 3.6 Stimulation vagale

La stimulation a été réalisée de la même manière que pour l'étude précédente (cf. p. 101). La stimulation débutait juste après l'instillation de la colite et était effectuée durant 3h chez l'animal anesthésié. Deux phases témoin de 30 min encadraient la phase de stimulation de 3h.

### 3.7 Groupes d'animaux

Cinq groupes de 10 animaux ont été utilisés pour cette expérimentation :

- groupe contrôle : pas de chirurgie, pas de stimulation vagale, anesthésie et euthanasie uniquement,

- groupe Salin/NSV : injection intra-colique de sérum physiologique et stimulation vagale,
- groupe Salin/non-stimulé : injection intra-colique de sérum physiologique, pas de stimulation vagale,
- groupe Colite/NSV : injection intra-colique de TNBS et stimulation vagale,
- groupe Colite/non-stimulé : injection intra-colique de TNBS, pas de stimulation vagale.

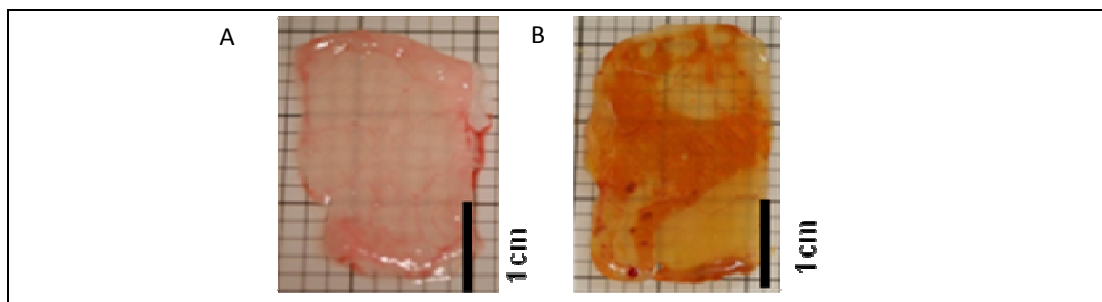
### 3.8 Euthanasie et prélèvements

Trente minutes après la fin de la stimulation vagale, les rats ont reçu une injection intracardiaque massive de pentobarbital (Dolethal®, 200mg/kg). Une laparotomie a été pratiquée et la rate a été prélevée afin de réaliser l'analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques par cytométrie en flux. Différents prélèvements digestifs ont également été réalisés :

- portion de 2 cm du côlon distal (1 cm au-dessus du point d'injection de la canule à 1 cm en dessous de ce point),
- portion de 2 cm du côlon transverse (4 cm au-dessus du point d'injection de la canule).

Après ouverture longitudinale, chaque pièce opératoire a été photographiée (figure 52) puis partagée longitudinalement en cinq parties pour les différentes analyses :

- histologie et immunohistologie (en cours),
- dosage des cytokines tissulaires par la méthode ELISA,
- semi-quantification protéique par technique western blot (en cours),
- quantification des ARNm par technique qRT-PCR,
- dosage de la myéloperoxydase (MPO).



**Figure 52 : photographies de prélèvements de côlons distaux.** A : côlon distal prélevé sur un rat contrôlé, B : côlon distal prélevé 3 h après l'injection de TNBS.

### **3.9 Analyse par cytométrie en flux**

#### **3.9.1 Préparation des cellules**

Cette étape a été réalisée de la même manière que ceux précédemment pour l'expérience des effets périphériques de la NSV sur rats sains. (*cf p. 103*)

#### **3.9.2 Immunomarquage des cellules**

Les immunomarquages ont été les mêmes que ceux précédemment utilisés pour l'expérience des effets périphériques de la NSV sur rats sains. (*cf p. 103*)

#### **3.9.3 Analyse des cellules**

L'analyse s'est déroulée de la même manière que pour l'étude 2 (effets périphériques de la NSV sur rats sains). (*cf p. 104*)

#### **3.9.4 Culture cellulaire**

Elle a été réalisée de façon identique à l'étude 2 précédemment décrite. (*cf p. 106*)

#### **3.9.5 Tri magnétique des lymphocytes T CD4**

Afin d'étudier la sécrétion de cytokines spécifique des lymphocytes T CD4+, une étape de tri cellulaire a été réalisée avec le kit Magnetic cell sorting MACS CD4 Microbeads (Miltenyi Biotec, France). Ce kit repose sur l'utilisation d'anticorps couplés à des microbilles magnétiques qui se fixent à la surface des cellules d'intérêt, les lymphocytes CD4+. Un haut gradient de champ magnétique permet de retenir les cellules marquées par les anticorps et ainsi de les séparer des cellules négatives. Une partie des splénocytes préalablement dissociés au début de l'expérimentation (un million) est placée en contact avec ces microbilles anti-CD4 après avoir été centrifugée et resuspendue dans un tampon de PBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA. Après l'incubation avec ces microbilles et un lavage permettant d'éliminer l'excédent d'anticorps, la suspension cellulaire est placée sur une colonne LS (LS Columns, Miltenyi Biotec, France), elle-même placée sur un aimant SuperMACS Separator (Miltenyi Biotec). Les cellules non marquées vont être éluées tandis que les cellules marquées magnétiquement sont retenues dans la colonne LS. Ensuite, la colonne est retirée de l'aimant et placée sur un tube, un piston permet alors d'éluer la fraction CD4 positive.



### **3.9.6 Dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture**

Ce dosage a été effectué selon le même protocole que pour l'expérimentation précédente en utilisant le kit Cytometric Bead Array (CBA) Rat Soluble Protein Flex Sets (BD Biosciences, France) (*cf. p.106*). Les cytokines dosées étaient : l'IL-4, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$ , l'IL-10 et l'IL-6. Le dosage a été réalisé sur les surnageants des splénocytes totaux mis en culture (activés ou non) et également sur les surnageants des lymphocytes T CD4 préalablement triés et mis en culture de la même manière que les splénocytes totaux (activés et non activés).

### **3.10 Quantification de l'expression de la myéloperoxydase**

Le dosage de la myéloperoxydase (MPO) a été réalisé sur les prélèvements de tissus digestifs (côlons distal et transverse). Ce dosage est classique dans les modèles d'inflammation (Ghia et al. 2007 ; Meregnani et al. 2011; Morris et al. 1989 ; Tateishi et al. 1997). La MPO est une enzyme peroxydase présente dans les granules des polynucléaires neutrophiles et possède un rôle bactéricide. Le dosage de la MPO, basé sur une technique d'immunomarquage, est communément utilisé pour mesurer l'intensité de l'inflammation.

Les prélèvements de tissus digestifs ont été congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Ils ont ensuite été homogénéisés selon la même technique utilisée pour le dosage des cytokines (*cf. p. 136*). Les lysats étaient conservés à -80°C jusqu'au moment du dosage par technique ELISA de la MPO. Ce dosage a été réalisé avec le kit HK105 (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands).

### **3.11 Quantification de l'expression de cytokines dans le tube digestif**

Les cytokines suivantes ont été dosées par technique ELISA dans les prélèvements de tube digestif (côlons transverse et distal): TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , IL-10 avec les kits spécifiques pour chaque cytokine, R&D Systems (Lille, France). Les prélèvements de tube digestif ont été congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. L'extraction protéique a été réalisée de la même manière que pour le dosage de MPO vu précédemment.

### **3.12 Dosage des ARNm par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)**

Le dosage des ARNm a été réalisé de la même manière que précédemment décrite pour l'étude des effets périphériques de la NSV sur un modèle de rat sain (*cf. p. 107*). Toutefois, dans cette

expérimentation, les prélèvements de côlons transverses ont également été dosés en plus des splénocytes.

### **3.12.1 Pré-broyage des échantillons**

Pour les prélèvements de tissus digestifs des étapes de prébroyage puis de broyage ont été effectuées préalablement à l'extraction. Le prébroyage a été réalisé sur les échantillons décongelés et préalablement pesés. Ils ont été placés dans des tubes contenant 1ml de tampon RLT (Qiagen). Les échantillons ont alors été traités au Polytron, puis congelés à -20°C.

### **3.12.2 Broyage des échantillons**

L'étape de broyage a été réalisée sur les échantillons décongelés, les pré-broyats ont été transférés dans un tube Eppendorf, deux billes étaient ajoutées et les échantillons ont alors été broyés au broyeur à billes Retsch MM301 2 fois 3 minutes à 30 Hz.

Une fois l'étape de broyage terminée, le volume de broyat correspondant à 12 mg de tissu a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf et le volume final ajusté à 420µl avec du tampon RLT. Le broyat restant a été congelé à -20°C. Les tubes étaient centrifugés 10 minutes à 1000 g à température ambiante. 350 µl de surnageant a été prélevé et transféré dans un tube Eppendorf qui servira pour l'extraction des ARN totaux.

### **3.12.3 Extraction des ARN totaux**

L'extraction des ARN a été réalisée de la même manière que précédemment pour l'étude 2, c'est-à-dire sur l'automate Qiacube (Qiagen) en utilisant le kit RNeasy mini kit Animal Cells (Qiagen) avec traitement à la DNase.

### **3.12.4 Vérification de la qualité et de la concentration des éluats**

Comme dans l'étude précédente les éluats d'ARN totaux ont été dosés (2 µl) à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop® ND1000 (NanoDrop Technologies Inc., USA) pour déterminer la concentration et la pureté des ARN élués de chaque échantillon. Les échantillons ayant un niveau d'ARN trop bas ont été extraits une nouvelle fois après une nouvelle étape de broyages à billes. Les ARN ont été congelés à -80°C en attendant l'étape de transcription inverse.

### **3.12.5 Transcription inverse**

La transcription inverse des ARN en ADNc a été réalisée avec le kit Core Eurogentec. La transcription inverse a été faite à partir de 300 ng d'ARN dans un volume final de 15 µl, avec 50 µM d'amorce oligo (dT), un mélange de dNTP à 2,5 mM, un inhibiteur de RNase 20 U/µl.

### **3.12.6 PCR quantitative en temps réel sur LightCycler**

La PCR a été réalisée de la même manière que dans l'étude précédente avec le kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science) sur un automate LightCycler (LightCycler Instrument, Roche Applied Science).

### **3.12.7 Gènes cibles étudiés**

Les gènes étudiés jouent un rôle important dans l'inflammation et la quantification de leur ARNm renseigne sur l'état de la cellule. Dans les splénocytes la quantification d'ARNm codant pour des cellules immunitaires a été réalisée afin d'effectuer des corrélations entre les différents ARNm et d'étudier les relations possibles entre ces gènes. Les amorces utilisées sont répertoriées dans les tableaux suivants selon les structures dans lesquelles les ARNm ont été quantifiés (côlons transverses : tableau 12 et splénocytes : tableau 13).

- ARNm de cytokines : TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ,
- ARNm de protéines modulatrices de voie intracellulaire de signalisation : NF $\kappa$ Bia (inhibiteur du facteur de transcription NF $\kappa$ B) et SOCS3 (suppressor of cytokine signalling 3) connu pour interagir avec la protéine JAK2,
- ARNm de protéine d'adhérence cellulaire : ICAM1,
- ARNm de cellules immunitaires : Klr1a (killer cell lectin-like receptor subfamily B 1A) marqueur des cellules NK, CD3 (cluster of differentiation 3) marqueur des lymphocytes T, CD11b (cluster of differentiation 11b) marqueur des macrophages et des cellules dendritiques.

Gènes		Amorces	T° H	Réf. GenBank	NC
<b>ARBP</b>	Sens	F1: 5'-CCTGCACACTCGTTCTCTAGAG-3'	57°C	NM_022402	50
	Antisens	R1: 5'-CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG-3'			
<b>ARBP</b>	Sens	F3 : 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAACATA-3'	55°C	NM_022402	50
	Antisens	R3 : 5'-CATGCGGATCTGCTGCATCT-3'			
<b>CYCA</b>	Sens	F3: 5'-GGCAAATGCTGGACCAAACAC-3'	56°C	NM_017101	50
	Antisens	R3: 5'-CTTCCAAAGACCACATGCTTG-3'			
<b>HPRT</b>	Sens	F1: 5'-CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC-3'	60°C	NM_012583	50
	Antisens	R1: 5'-GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC-3'			
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Sens	F4 : 5'-AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC-3'	58°C	NM_012675	50
	Antisens	R4 : 5'-TCTGCTTGGTGGTTTGTCTACGAC-3'			
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Sens	F1 : 5'-CACCTCTCAAGCAGAGCACAG-3'	58°C	NM_031512	50
	Antisens	R1 : 5'-GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC-3'			
<b>SOCS3</b>	Sens	F2 :5'-CCTCCAGCATCTTTGTCGGAAGAC-3'	59°C	NM_053565	50
	Antisens	R2 :5'-TACTGGTCCAGGAAGTCCCGAATG-3'			

**Tableau 12 : amorces et conditions de PCR utilisées dans les prélèvements de côlons transverses.** En rouge : les gènes rapporteurs ; TH : température d'hybridation ; NC : nombre de cycles ; ARBP : acidic ribosomal phosphoprotein ; CycA : cyclophylin A ; HPRT : hypoxantine guanine phosphoribosiltransferase ; TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor; IL-1 $\beta$ : interleukine 1- $\beta$ ; SOCS-3 : suppressor of cytokine signaling 3.

Gènes		Amorces	T° H	Réf. GenBank	NC
<b>ARBP</b>	Sens	F1: 5'-CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG-3'	57°C	NM_022402	50
	Antisens	R1: 5'-CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG-3'			
<b>ARBP</b>	Sens	F3 : 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAATA-3'	55°C	NM_022402	50
	Antisens	R3 : 5'-CATGCGGATCTGCTGCATCT-3'			
<b>CYCA</b>	Sens	F3: 5'-GGCAAATGCTGGACCAAACAC-3'	54°C	NM_017101	50
	Antisens	R3: 5'-CTTCCCAAAGACCACATGCTTG-3'			
<b>HPRT</b>	Sens	F1: 5'-CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC-3'	58°C	NM_012583	50
	Antisens	R1: 5'-GCAGGTCAGCAAAGAAGCTTATAGCC-3'			
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Sens	F4 : 5'-AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC-3'	58°C	NM_012675	50
	Antisens	R4 : 5'-TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'			
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Sens	F1: 5'-AAGTGTATCGAATCGCACCTG-3'	60°C	NM_138880	50
	Antisens	R1: 5'-CAGCTTTGTGCTGGATCTGTGG-3'			
<b>NFkBia</b>	Sens	F2 : 5'-AGCTGACCCTGAAAATCTTCAG-3'	57°C	NM_001105720	50
	Antisens	R2 : 5'-CCTCAAACACACAGTCATCGTAG-3'			
<b>Klrb1A</b>	Sens	F1: 5'-AGCCATGCCGAGTGTATTTC-3'	54°C	NM_001010964	50
	Antisens	R1: 5'-CGGTGTGAAAGCCAGTCTTTTG-3'			
<b>CD3</b>	Sens	F2 : 5'-GCCTACAGTGAGATTGGCATGAAAG-3'	58°C	NM_170789	50
	Antisens	R2 : 5'-GCAGTGCTGAGACCCTGGTAAAG-3'			
<b>CD11b</b>	Sens	F1: 5'-TGTCTGTCGCACTGAGCAGAAATCC-3'	59°C	NM_012711	50
	Antisens	R1: 5'-TGCAGACTGCAACAGAGCAGTTCAG-3'			

**Tableau 13 : amorces et conditions de PCR utilisées dans les splénocytes.** En rouge : les gènes rapporteurs ; TH : température d'hybridation ; NC : nombre de cycles ; ARBP : acidic ribosomal phosphoprotein ; CycA : cyclophilin A ; HPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase ; TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor; IFN- $\gamma$  :interféron  $\gamma$  ; Nfkbia: nuclear factor of  $\kappa$  light chain gene enhancer in B-cells inhibitor  $\alpha$ ;Klrb1A: killer cell lectin-like receptor subfamily B 1A; CD3: cluster of differentiation 3; CD11b : cluster of differentiation 11b.

### 3.13 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le programme GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, Californie, USA). Les résultats de cytométrie en flux, de dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture, ainsi que de q RT-PCR dans les splénocytes ont été analysés avec un test non-paramétrique Mann-Whitney. Les résultats des dosages de MPO ont été analysés avec un test non-paramétrique de Fisher. Les résultats de q RT-PCR dans le côlon transverse ont été analysés par un test de normalité Shapiro puis un test ANOVA une voie. Finalement, les résultats de l'étude des corrélations ont été analysés avec le test de Spearman. Les données sont considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ . Les résultats sont présentés de la manière suivante : moyenne  $\pm$  erreur standard.

## 4. Résultats

### 4.1 Etude cinétique des effets du TNBS sur la sécrétion de cytokines au niveau du côlon distal

#### 4.1.2 Variation pondérale des animaux

Une perte de poids importante est un symptôme primordial dans les inflammations digestives. Afin de suivre l'état des rats présentant une colite au TNBS, ces derniers ont été pesés de J0 jusqu'à J4. L'injection de TNBS (J0) induit une perte de poids le lendemain (J1) d'environ -5%, et persiste à J2 (-4,6%). La perte se stabilise à J3 et J4 avec une diminution d'environ -1,5% (figure 53).

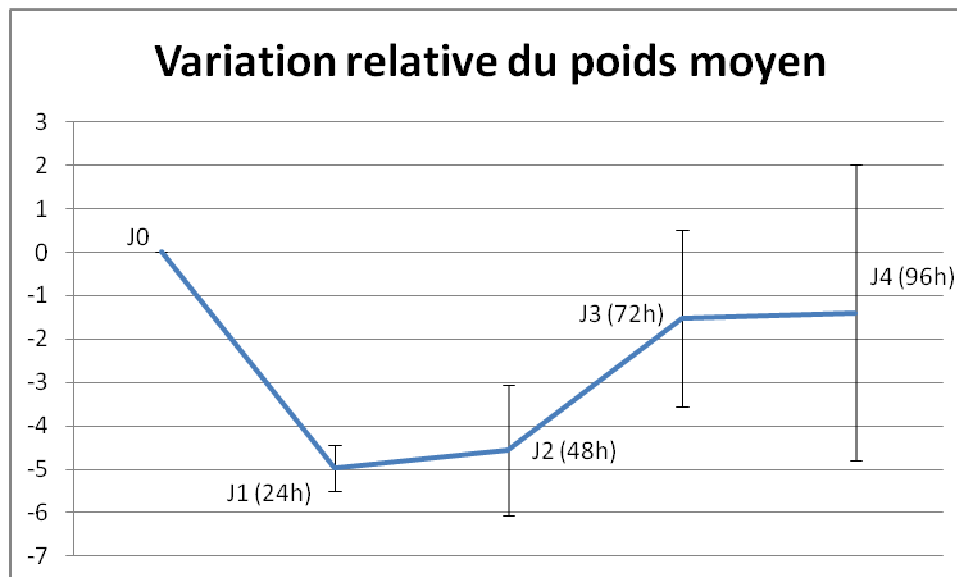


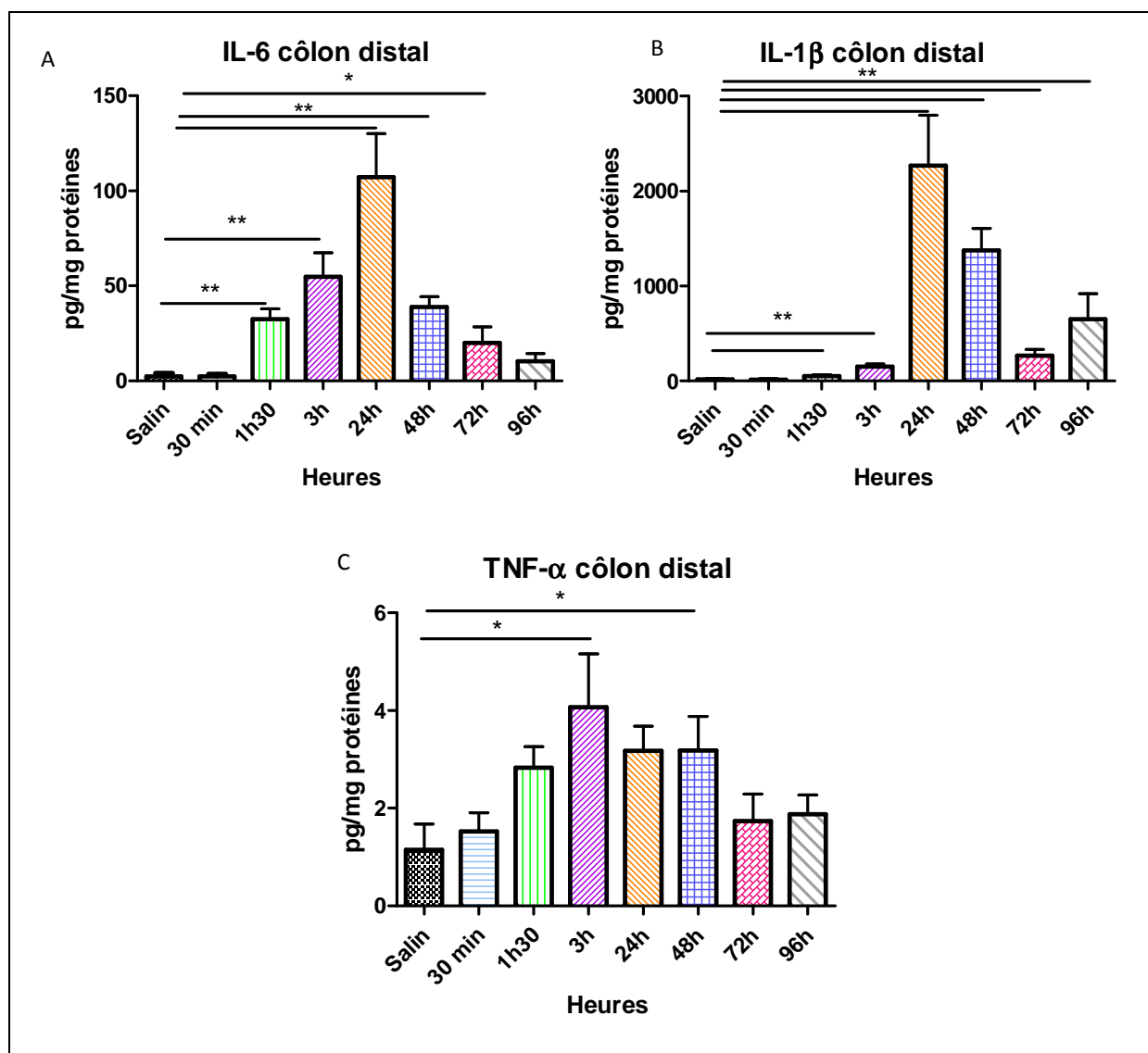
Figure 53 : courbe de la variation relative du poids moyen des rats atteints de colite entre J0 et J4.

#### 4.1.3 Quantification de l'expression de cytokines tissulaires dans le côlon distal

Afin de réaliser une étude cinétique sur l'expression de cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) dans le côlon distal après injection de TNBS, un dosage par technique ELISA a été réalisé sur des rats anesthésiés à l'isoflurane (6 animaux par groupe).

La figure 54 A et B montre que l'expression de l'IL-6 et de l'IL-1 $\beta$  est significativement plus élevée à partir de 1h30 après l'injection de TNBS par rapport au groupe salin ayant reçu une administration de sérum physiologique (moyenne de l'IL-6 pour le groupe contrôle :  $2,5 \pm 1,8$  pg/mg de protéines contre  $32,4 \pm 6$  pg/mg protéines pour le groupe TNBS à 1h30 avec  $p < 0,01$ . Moyenne de l'IL-1 $\beta$  pour le groupe contrôle :  $17,8 \pm 4$  pg/mg de protéines contre  $53,1 \pm 6,7$  pg/mg de protéines pour le groupe TNBS à 1h30 avec  $p < 0,01$ ). L'expression de ces cytokines continue d'augmenter pour

atteindre un pic à 24h, puis diminue progressivement jusqu'à 96h sans revenir au niveau basal. Le TNF- $\alpha$ , augmente significativement et atteint son maximum à 3h après l'instillation de TNBS (moyenne du groupe contrôle :  $1,1 \pm 0,6$  pg/mg de protéines contre  $4,1 \pm 1,2$  pg/mg de protéines pour le groupe TNBS à 3h avec  $p < 0,05$ ) (figure 54 C). Ensuite, son expression diminue dès 24h, reste stable jusqu'à 48h et diminue de nouveau à 72h et reste stable jusqu'à 96h.



**Figure 54 : étude cinétique des niveaux moyens de sécrétion des cytokines tissulaires IL-6 (A), IL-1 $\beta$  (B), et TNF- $\alpha$  (C) dosées dans le côlon distal de rats du groupe salin (injection de sérum physiologique) ou de rats ayant reçu une injection de TNBS et prélevés à différents intervalles de temps après injection. (n=6, \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ ).**

Au vu de ces résultats et compte tenu des impératifs de stimulation sur des rats anesthésiés, le temps 3h après administration du TNBS a été retenu comme un bon compromis entre la durée maximale d'anesthésie possible et l'apparition des premiers phénomènes inflammatoires. Ce paramètre d'expérimentation a donc été choisi pour euthanasier et faire les prélèvements sur les

rats pour les études ultérieures sur des modèles aigus. Ainsi le modèle d'expérimentation se place dans la phase d'initiation de la réaction inflammatoire où les niveaux de sécrétion de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 sont d'ores et déjà significativement élevés. Pour cela, les animaux de l'étude suivante ont été anesthésiés au pentobarbital, puis connaissent une période de stabilisation de 30 minutes, suivie de l'instillation de TNBS ou de sérum physiologique correspondant au début de la NSV (ou non pour les Sham) de 3h, et finalement une période témoin de 30 minutes avant d'être euthanasiés. Les prélèvements ont donc lieu 3h30 après injection de TNBS ou de sérum physiologique.

## **4.2 Analyse des effets de la NSV chez le rat atteint de colite expérimentale et anesthésié au pentobarbital**

### ***4.2.1 Analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques par cytométrie en flux***

Les sous-populations lymphocytaires spléniques ont été analysées de la même façon que lors de l'étude 2 préalable sur les rats non-inflammés. Les valeurs moyennes des différentes populations étudiées sont répertoriées sous forme de pourcentage par rapport à une population parente puis en nombre de cellules dans le tableau suivant (tableau 14).



	Contrôle		Salin-NSV		Salin-non stimulé		Colite-NSV		Colite-non stimulé	
	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM
% lymphocytes totaux/ cellules totales	68.2	1.6	69.7	1.4	71.3	1.6	64.1	1.6	65.6	0.7
% lymphocytes T/ lymphocytes	32.3	1.7	27.4	1.2	27.7	2.1	29.8	1.6	29.4	1.3
% lymphocytes T CD4/ CD3	75.1	1.3	70.5	2.8	73.4	1.7	74.2	1.6	75.5	1.3
% CD25/ CD4	10.6	0.4	12.6	0.7	12.3	0.7	12.0	0.7	11.8	0.8
% lymphocytes T CD8/ CD3	16.9	1.1	21.5	2.1	17.9	1.8	18.7	1.6	17.3	1.3
balance CD4/CD8	4.6	0.4	3.6	0.5	4.6	0.6	4.3	0.5	4.6	0.5
double positif CD4 CD8/ CD3	4.5	0.5	4.5	0.7	4.2	0.4	4.1	0.6	3.8	0.2
% lymphocytes B	40.7	3.0	46.4	3.0	41.6	2.4	44.9	2.0	42.3	2.4
% NK / lymphocytes	2.4	0.3	2.5	0.3	2.7	0.3	2.2	0.4	2.6	0.4
% NKT / lymphocytes T	10.2	0.6	12.7	0.8	12.0	0.6	10.0	0.8	10.1	0.8
% TCRαβ/ CD3	93.3	0.4	93.1	0.6	93.0	0.5	93.0	0.5	93.3	0.6
% TCRγδ/ CD3	6.2	0.4	6.4	0.5	6.5	0.5	6.5	0.4	6.2	0.6
% TCRαβ/ NKT	70.0	1.2	72.8	2.2	73.1	2.7	70.9	1.9	71.2	2.0
% TCRγδ/ NKT	29.0	1.2	26.1	2.2	26.1	2.6	28.1	1.9	27.7	1.9
cellularité totale	902.2	46.5	774.6	88.2	762.2	63.1	745.4	71.8	666.2	67.3
nombre de lymphocytes totaux	619.0	41.5	538.4	59.0	547.8	52.9	477.3	48.7	436.9	44.5
nombre de lymphocytes T	200.7	18.8	145.7	15.1	156.3	26.9	143.9	18.9	127.0	12.1
nombre de lymphocytes T CD4	149.7	13.1	104.6	14.0	114.9	20.4	107.3	15.7	95.3	8.4
nombre de lymphocytes T CD4 CD25+	15.6	1.2	13.0	1.8	13.5	1.7	12.2	1.0	11.2	1.2
nombre de lymphocytes T CD8	34.6	4.5	29.7	2.1	27.9	5.1	26.7	3.8	22.5	3.2
nombre de lymphocytes B	249.9	23.4	245.0	26.1	227.2	23.9	212.6	23.1	189.5	27.4
nombre de NK	15.5	2.9	13.4	2.0	15.1	2.0	10.2	2.0	11.3	1.8
nombre de NKT	22.9	1.2	24.5	3.5	23.2	2.6	16.3	1.4	16.2	1.9
nombre de LT avec TCRαβ	1258.5	79.7	1015.1	96.6	1074.1	97.6	964.7	100.0	863.4	73.6
nombre de LT avec TCRγδ	12.6	0.8	10.2	1.0	10.7	1.0	9.6	1.0	8.6	0.7
nombre de NKT avec TCRαβ	16.0	0.9	17.9	2.7	17.2	2.4	11.5	1.1	11.6	1.5
nombre de NKT avec TCRγδ	6.7	0.5	6.2	1.0	5.8	0.6	4.6	0.6	4.4	0.5

**Tableau 14 : valeurs moyennes des différentes sous-populations lymphocytaires obtenues par cytométrie en flux pour les rats présentant ou non une colite et anesthésiés au pentobarbital.** Données présentées sous forme de pourcentage par rapport à une population cellulaire donnée, puis en valeur absolue (nombre de cellules x1000 par rate dissociée). SEM : erreur standard à la moyenne.

#### 4.2.1.1 Effet de la NSV sur les sous-populations lymphocytaires spléniques

Aucun effet de la NSV n'a été observé au niveau des sous-populations lymphocytaires spléniques. Les effets de la NSV observés lors de l'étude précédente sur les rats sains au niveau de l'activation lymphocytaire (diminution du pourcentage de lymphocytes CD25+ dans la population CD4+) ainsi que sur le pourcentage de NKT par rapport aux lymphocytes T n'ont pas été retrouvés pour les rats présentant une colite. Ces effets n'ont pas non plus été retrouvés pour les rats des groupes Salin-non stimulé et Salin-NSV (comme pour l'étude précédente sur des rats ne présentant pas de colite). Une hypothèse permettant d'expliquer cette différence de résultats est que les rats non colites (salins) de cette étude ont reçu une injection intra-colique de sérum physiologique contrairement aux rats sains de l'étude 2 précédente. Le fait d'introduire une canule dans le rectum et d'injecter le sérum physiologique peut être à l'origine d'une légère inflammation du côlon distal et expliquer cette différence de résultats. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que l'expression de la MPO au niveau colorectal des rats ayant reçu du sérum physiologique était supérieure à celle du groupe de rats

contrôles (voir paragraphe 4.3). Les rats non colites de cette étude ne sont donc pas comparables aux rats non-colites étudiés lors de l'étude des effets périphériques sur animaux sains.

#### 4.2.1.2 Effet de l'anesthésie et/ou de la chirurgie sur les sous-populations lymphocytaires spléniques

Une diminution significative du nombre de lymphocytes T (diminution d'environ 29% pour tous les groupes de rats opérés (Salin-NSV, Salin-non stimulé, Colite-NSV ou Colite-non stimulé) par rapport au groupe contrôle) ainsi que du nombre de lymphocytes T CD4 (diminution d'environ 29% pour tous les groupes de rats opérés comparé au groupe de rats contrôle) a été observé. Ceci traduit un effet lié à la manipulation (chirurgie et/ou anesthésie) (figure 55).

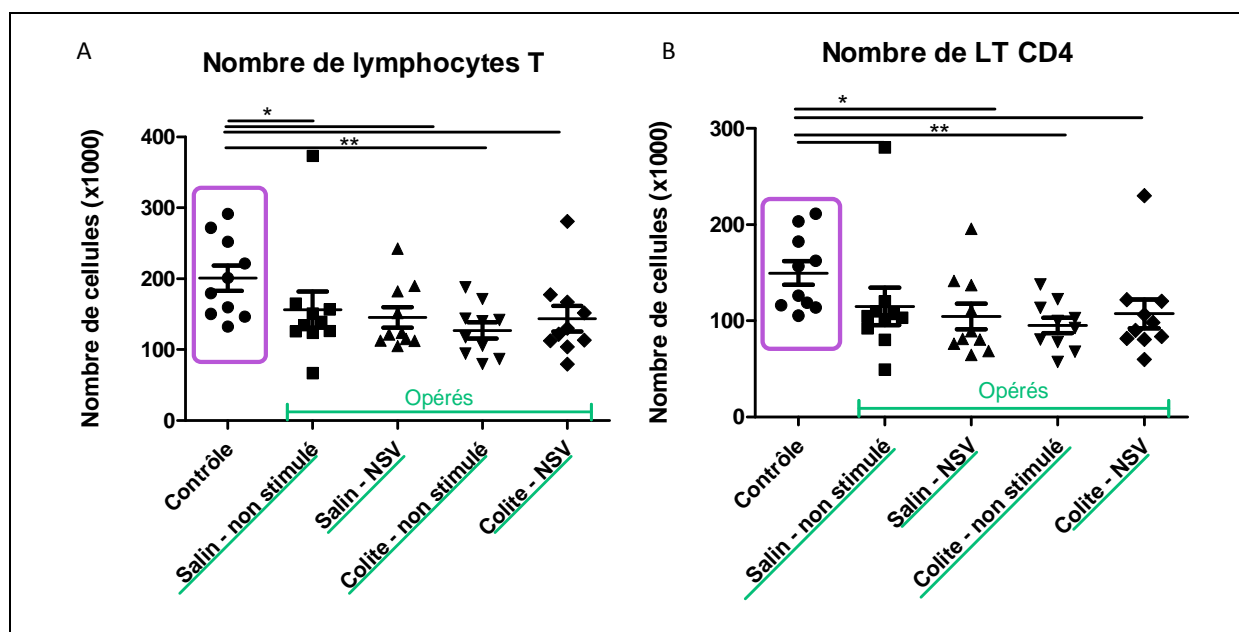
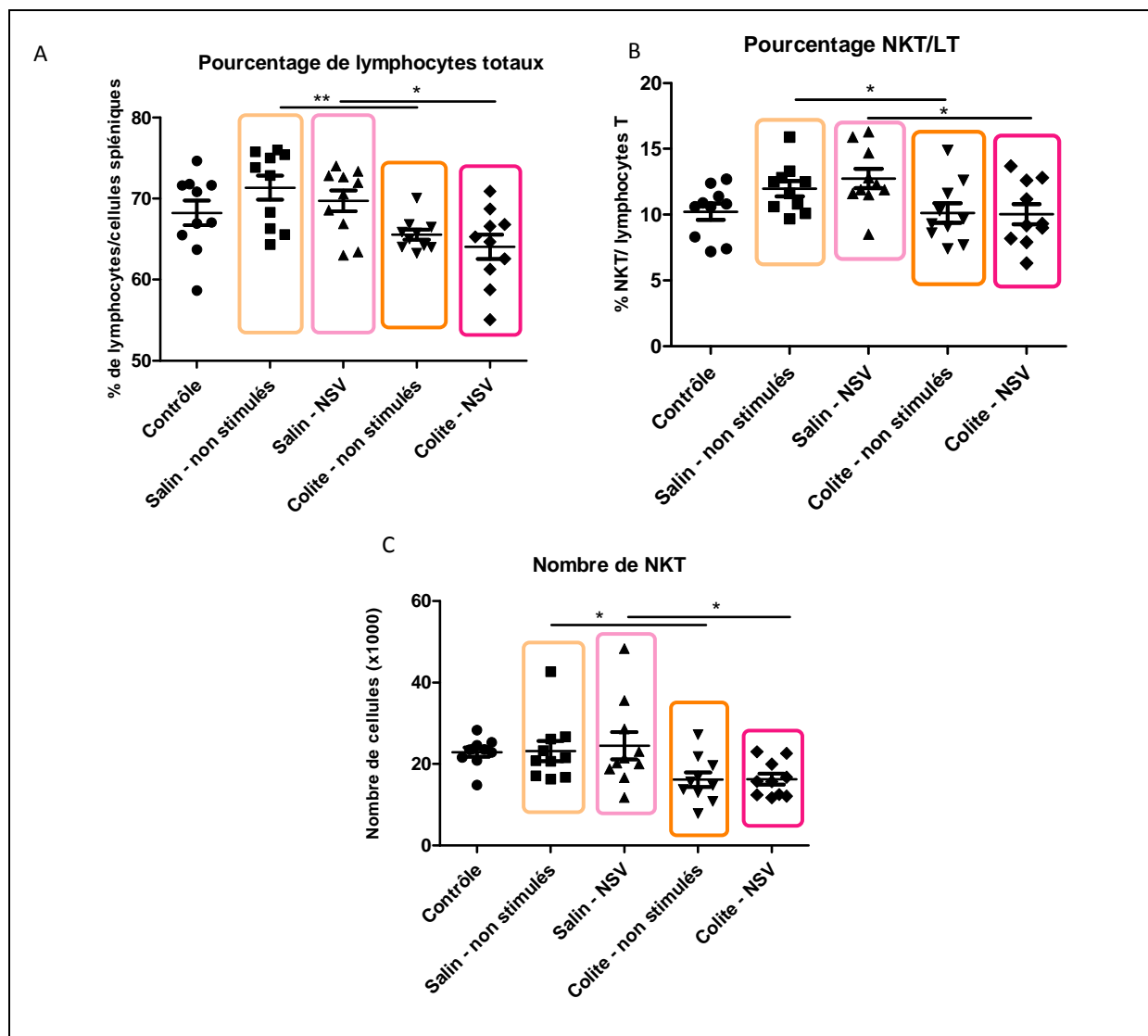


Figure 55 : effet de l'anesthésie et/ou de la chirurgie sur les lymphocytes T spléniques. Nombre de lymphocytes T (A) et nombre de lymphocyte T CD4 (B) spléniques après dissociation de la rate pour les différents groupes expérimentaux anesthésiés au pentobarbital. (n=10 ; \* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01).

#### 4.2.1.3 Effets de la colite sur les sous-populations lymphocytaires spléniques

Une diminution du pourcentage de lymphocytes totaux par rapport aux cellules totales pour les groupes colites comparés aux groupes salins (diminution significative d'environ 8% pour le groupe Colite-non stimulé par rapport au groupe Salin-non stimulé, p<0,01 ; diminution significative d'environ 8% pour le groupe Colite-NSV par rapport au groupe Salin-NSV, p<0,05) a été observée. Cette diminution a également été observée pour le pourcentage de NKT par rapport aux lymphocytes T (diminution significative d'environ 16% pour le groupe Colite-non stimulé par rapport au groupe Salin-non stimulé et 21% pour le groupe Colite-NSV comparé au groupe Salin-NSV, p<0,05) et au

niveau du nombre de NKT (diminution significative d'environ 30% pour le groupe Colite-non stimulé par rapport au groupe Salin-non stimulé,  $p < 0,05$  ; diminution significative d'environ 33% pour le groupe Colite-NSV par rapport au groupe Salin-NSV,  $p < 0,05$ ). Ces données reflètent un effet lié à la colite (figure 56).



**Figure 56 : effet de la colite sur les lymphocytes et les NKT spléniques.** Pourcentage de lymphocytes totaux (A), pourcentage de NKT par rapport aux lymphocytes T (B) et nombre de NKT (C). Cadres oranges : groupes non stimulés ; cadre rose : groupes NSV. (n=10 ; \* :  $p < 0,05$  et \*\* :  $p < 0,01$ ).

#### 4.2.2 Dosage des cytokines sécrétées par les splénocytes en culture prélevés sur des rats inflammés ou non et anesthésiés au pentobarbital

Afin d'approfondir cette étude, nous avons analysé la fonctionnalité des splénocytes en réalisant des dosages CBA des cytokines sécrétées (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-10) par les

splénocytes en culture comme dans l'étude précédente. Les moyennes des concentrations des cytokines dosées sont récapitulées dans les tableaux suivants.

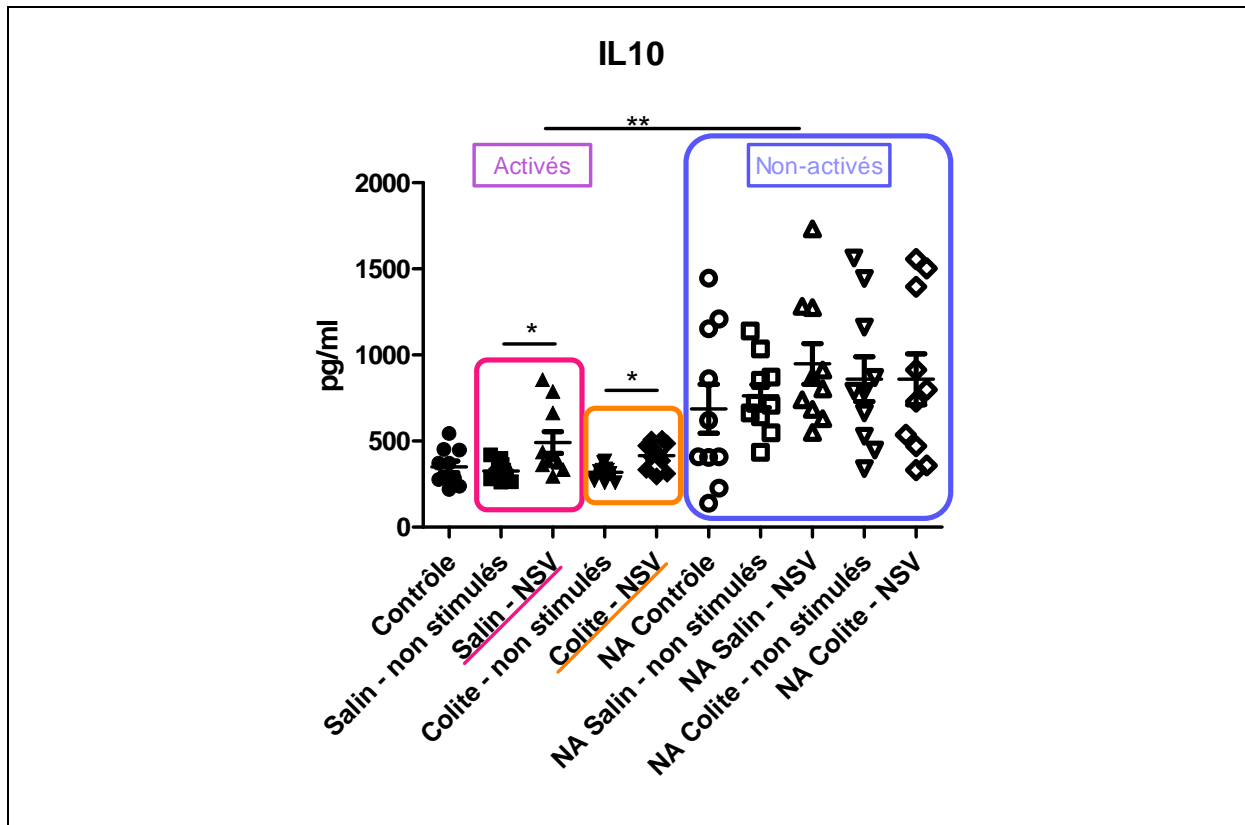
	Contrôle activé		Salin-NSV activé		Salin-non stimulé activé		Colite-NSV activé		Colite-non stimulé activé	
	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM
<b>IFN-γ</b>	859,6	288,2	3259,9	1136,2	1323,2	270,3	1969,6	810,9	794,0	332,6
<b>IL-6</b>	153,6	15,3	179,4	27,1	213,4	35,9	166,7	21,0	158,3	10,8
<b>IL-1</b>	182,0	0,8	185,6	1,4	185,8	2,3	189,8	1,8	184,5	1,4
<b>TNF-α</b>	1901,4	219,6	2169,5	277,8	2720,2	512,0	2357,0	289,8	1947,1	240,8
<b>IL-10</b>	350,7	35,2	492,7	67,0	325,8	18,3	415,8	27,1	318,8	14,9
<b>IL-4</b>	53,4	2,0	57,6	4,9	54,0	1,7	55,1	1,5	52,2	1,7

	Contrôle NA		Salin-NSV NA		Salin-non stimulé NA		Colite-NSV NA		Colite-non stimulé NA	
	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM
<b>IFN-γ</b>	18,3	0,9	20,5	0,6	20,6	0,6	20,4	0,5	18,2	0,6
<b>IL-6</b>	137,6	13,2	171,9	26,0	177,7	18,4	143,7	16,7	135,8	17,5
<b>IL-1</b>	177,7	0,5	178,2	0,3	178,0	0,2	178,8	0,2	177,7	0,5
<b>TNF-α</b>	312,3	57,9	287,9	26,3	387,7	82,1	480,0	103,3	344,5	50,4
<b>IL-10</b>	688,3	151,0	948,4	123,4	761,8	71,7	859,6	156,7	859,9	137,1
<b>IL-4</b>	46,4	0,4	46,3	0,1	46,5	0,2	46,4	0,3	46,4	0,2

**Tableau 15 : valeurs moyennes des concentrations en pg/ml des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture de splénocytes préalablement activés ou non activés (NA).**

Toutes les cytokines étudiées n'étaient pas quantifiables, seules l'IFN-γ, l'IL-10, le TNF-α et l'IL-4 l'étaient (différence significative observée entre les concentrations dosées dans les surnageants des cellules activées et non-activées). Aucun effet significatif dans les différentes conditions expérimentales n'a été observé, sauf pour l'IL-10. En effet la NSV provoquait une augmentation significative de la sécrétion d'IL-10 pour les splénocytes activés pour les groupes colite-NSV ou salin-NSV comparés aux groupes non stimulés (Sham) colite ou salin respectivement (moyenne du groupe colite-non stimulé : 318,8 ± 14,9 pg/ml contre : 415,8 ± 27,1 pg/ml pour le groupe colite-NSV, avec  $p < 0,05$  ; moyenne du groupe Salin-non stimulé : 325,84 ± 18,3 pg/ml contre 492,7 ± 67 pg/ml pour le groupe Salin-NSV, avec  $p < 0,05$ ) (figure 57).



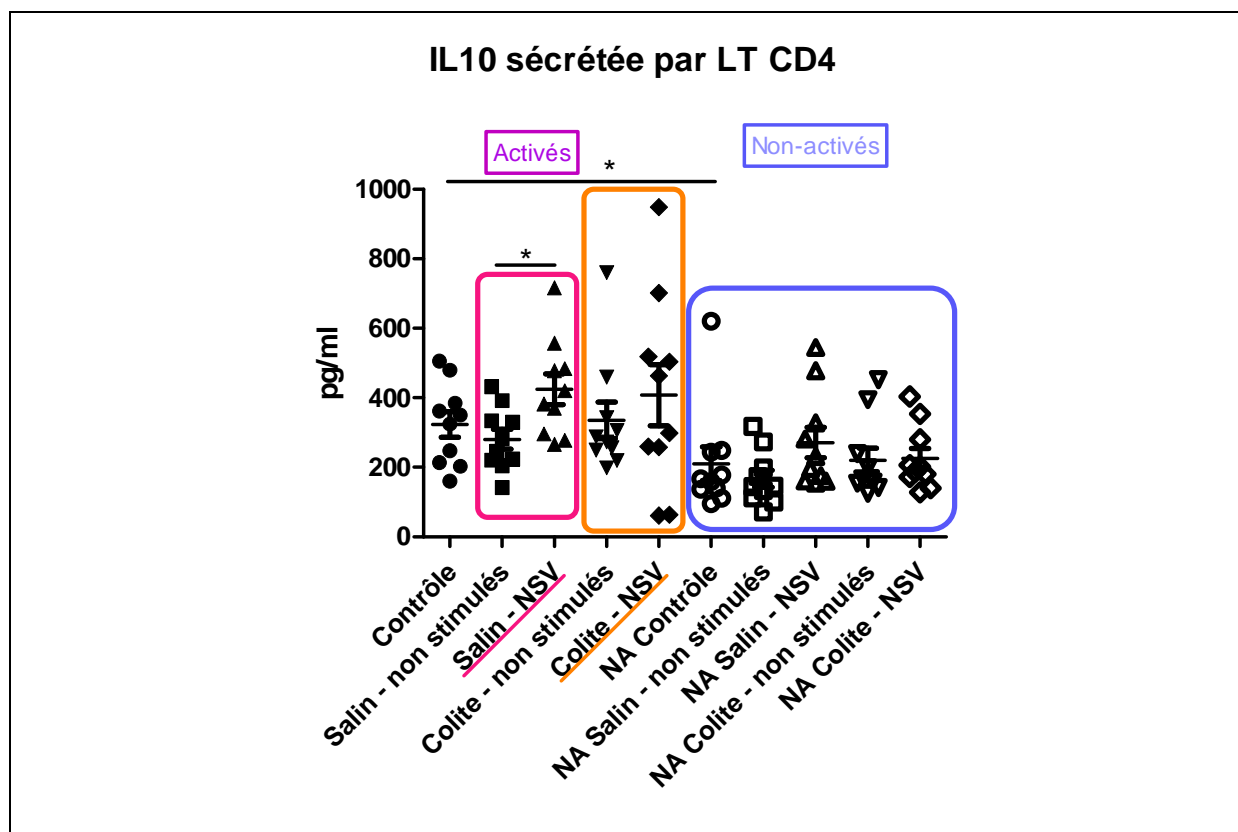
**Figure 57 : concentration en IL-10 dosée dans le surnageant de culture de splénoocytes** (activés à gauche et non activés : NA à droite (cadre bleu)) après dissociation de la rate prélevée sur des rats atteints de colite (ou non) et anesthésiés au pentobarbital. (n=10 ; \* : p<0,05 ; \*\* : P<0,01).

Une étape de tri cellulaire magnétique a été réalisée afin de purifier les lymphocytes T CD4 (LT CD4). Les LT CD4 ont été mis en culture (en présence ou absence d'anticorps anti CD3 et CD28 permettant l'activation des lymphocytes). Les cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-10) ont été dosées dans les surnageants de ces cultures avec les kits CBA comme précédemment. Les moyennes des concentrations des cytokines dosées sont récapitulées dans les tableaux suivants.

	Contrôle CD4 activé		Salin-NSV CD4 activé		Salin-non stimulé CD4 activé		Colite-NSV CD4 activé		Colite-non stimulé CD4 activé	
	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM
<b>IFN-γ</b>	335.6	145.1	247.2	76.8	216.6	80.3	382.9	146.4	502.0	228.6
<b>IL-6</b>	208.6	20.2	238.8	60.1	251.3	29.9	315.6	84.2	216.0	17.1
<b>IL-1</b>	184.3	4.2	187.3	2.8	185.3	3.3	192.7	5.4	186.9	3.5
<b>TNF-α</b>	2149.7	258.3	1742.7	320.6	1963.4	365.1	1756.1	509.2	2597.6	274.8
<b>IL-10</b>	323.3	38.8	424.7	46.7	280.7	30.2	407.7	92.8	335.4	55.4
<b>IL-4</b>	25.9	3.7	28.6	3.5	25.4	2.2	28.3	3.4	26.0	1.9
	Contrôle CD4 NA		Salin-NSV CD4 NA		Salin-non stimulé CD4 NA		Colite-NSV CD4 NA		Colite-non stimulé CD4 NA	
	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM	moyenne	± SEM
<b>IFN-γ</b>	93.2	0.9	95.7	1.2	92.0	2.7	91.7	1.2	94.9	1.2
<b>IL-6</b>	123.2	19.3	123.8	16.0	114.9	10.8	140.9	14.8	101.4	10.3
<b>IL-1</b>	172.1	0.5	172.1	0.5	171.4	0.4	172.8	0.6	172.6	0.4
<b>TNF-α</b>	248.2	37.0	221.3	32.9	183.0	22.2	371.6	61.5	313.7	57.9
<b>IL-10</b>	210.1	50.9	271.3	46.4	167.1	25.8	225.4	30.5	220.1	37.5
<b>IL-4</b>	15.5	0.1	15.7	0.3	15.4	0.3	15.8	0.4	16.0	0.3

**Tableau 16 : valeurs moyennes des concentrations en pg/ml des différentes cytokines dosées dans les surnageants de culture de splénocytes préalablement activés ou non activés (NA).**

Seule l'IL-4 était non quantifiable. Aucune variation significative de sécrétion d'IL-1, d'IL-6, de TNF-α ou d'IFN-γ n'était observée pour les différentes conditions expérimentales. Par contre l'effet de la NSV observé sur l'augmentation de sécrétion de l'IL-10 dans les splénocytes totaux activés était retrouvé pour les LT CD4. Les LT CD4 issus des deux groupes d'animaux NSV (colite ou non-colite) sécrétaient plus d'IL-10 par rapport aux deux groupes d'animaux non stimulés (moyenne du groupe Colite-non stimulé : 335,4 ± 55,4 pg/ml contre : 407,7 ± 92,8 pg/ml pour le groupe Colite-NSV ; moyenne du groupe Salin-non stimulé : 280,7 ± 30,2 pg/ml contre : 424,7 ± 46,7 pg/ml pour le groupe Salin-NSV, avec p<0,05) (figure 58). La NSV induit une sécrétion plus importante d'IL-10 comparé aux rats des groupes non stimulés colite ou salin pour les splénocytes activés (bien qu'elle ne soit significative que pour le groupe salin).



**Figure 58 :** concentration en IL-10 dosée dans le surnageant de culture de lymphocytes T CD4 spléniques préalablement triés (activés CD3 CD28 à gauche et non activés : NA à droite (cadre bleu)). (n=10 ; \* : p<0,05).

La concentration en IL-10 était plus élevée pour les splénocytes totaux mis en culture et non activés (moyenne :  $823,6 \pm 55,6$  pg/ml protéines) comparés aux splénocytes totaux activés (moyenne :  $380,7 \pm 18,1$  pg/ml protéines). Pour les lymphocytes T CD4 purifiés et mis en culture, l'expression d'IL-10 était plus élevée pour les activés (moyenne :  $354,38 \pm 24,7$  pg/ml protéines) que les non-activés (moyenne :  $218,79 \pm 16,8$  pg/ml). Les splénocytes totaux non-activés sont capables de sécréter de l'IL-10 (comme constaté dans l'étude précédente sur les animaux sains) alors que les LT CD4 ont besoin d'être activés pour en sécréter. Cela suggère que la sécrétion d'IL-10 observée pour les splénocytes non activés est due à une population autre que les LT CD4. En effet, l'IL-10 peut être sécrétée par les monocytes (même non activés), les mastocytes et les lymphocytes B. Il a également été démontré que la production d'IL-10 est inhibée par la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Chomarat et al. 1993). Ce qui pourrait expliquer que moins d'IL-10 est retrouvé pour les cellules activées qui vont sécréter de l'IFN- $\gamma$  qui va donc inhiber la production d'IL-10. La concentration en IL-10 pour les splénocytes totaux activés et LT CD4 activés était comparable. Ceci suggère que l'IL-10 dosée pour les splénocytes totaux activés est principalement sécrétée par les LT CD4 activés.

Dans cette étude, l'effet de la NSV n'a pas été retrouvé au niveau de la cellularité splénique mais au niveau de la fonctionnalité des cellules pour les rats atteints de colite expérimentale. La NSV oriente les cellules spléniques dont les lymphocytes T CD4 vers un profil anti-inflammatoire.

### 4.3 Quantification de l'expression de la myéloperoxidase (MPO)

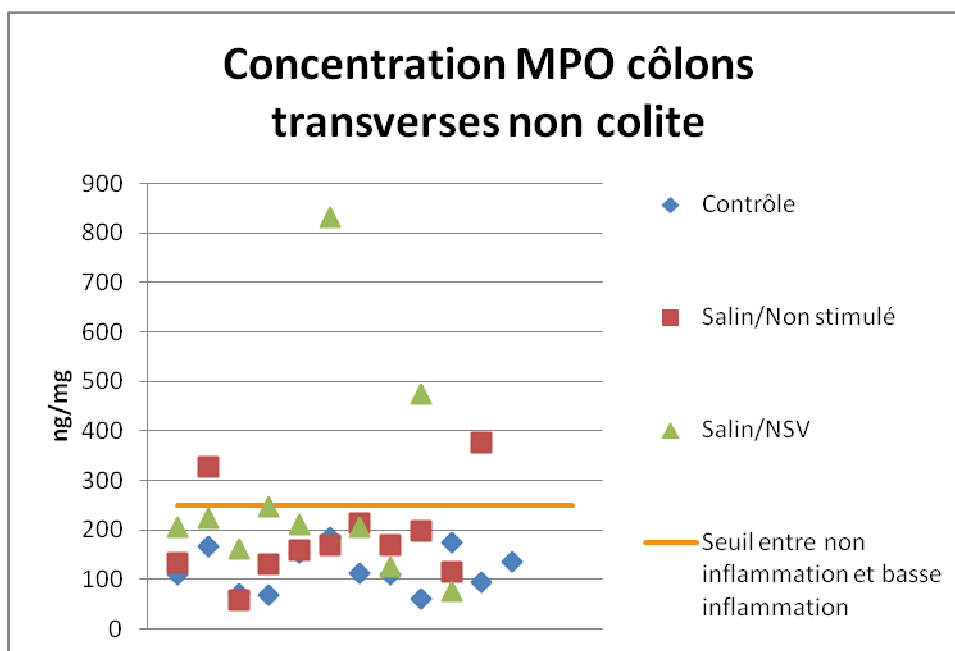
Le dosage de la MPO, marqueur de l'inflammation, a été réalisé par technique ELISA sur les côlons distaux (au niveau de la lésion) et transverses (au-dessus de la lésion) des rats des différentes conditions expérimentales. Une très forte variabilité inter-individuelle a été observée, il nous a donc paru plus intéressant et pertinent d'étudier l'expression de la MPO selon la répartition de chaque individu par rapport à des niveaux d'inflammation prédéfinis plutôt que par le biais de la comparaison des moyennes des groupes. De plus, les valeurs aberrantes ont été éliminées. Afin d'interpréter ces résultats, deux seuils ont été établis : un seuil représentant la limite entre l'absence d'inflammation et basse inflammation et un autre entre basse inflammation et haute inflammation pour chacune des structures (côlon transverse et côlon distal). Ces seuils ont été calculés de la manière suivante :

- seuil entre non inflammation et basse inflammation : moyenne de la concentration en MPO du groupe contrôle à laquelle on ajoute 3 fois l'écart-type. Avec ce calcul le risque d'erreur lors de la détermination de valeurs pathologiques anormalement hautes est inférieur à 0,01% (Deby-Dupont et al. 1998).
- seuil entre basse inflammation et haute inflammation : la valeur de ce seuil est arbitraire et a été déterminée comme étant égale à la moyenne de la concentration en MPO du groupe contrôle multipliée par cinq.

Pour le côlon transverse le seuil de basse inflammation est de 249 ng/mg de protéines et le seuil entre basse et haute inflammation de 603 ng/mg de protéines. Pour le côlon distal le premier seuil est de 525 ng/mg de protéines, et le deuxième de : 1152 ng/mg de protéines. Nous avons ensuite étudié la répartition des différents animaux par rapport à ces seuils selon les groupes expérimentaux.

Au niveau du côlon transverse les rats des groupes contrôle et salin-non stimulé ou salin-NSV avaient des concentrations en MPO relativement proches (moyenne du groupe contrôle :  $120,6 \pm 12,9$  ng/mg de protéines, moyenne du groupe salin-non stimulé :  $186,5 \pm 29,3$  ng/mg de protéines, moyenne du groupe salin-NSV :  $276,6 \pm 73,8$  ng/mg de protéines). Deux rats de chaque groupe salin non-stimulé (carré rouge) et salin-NSV (triangle vert) étaient au-dessus de cette limite. Tous les rats du groupe contrôle étaient en dessous de ce seuil (figure 59).

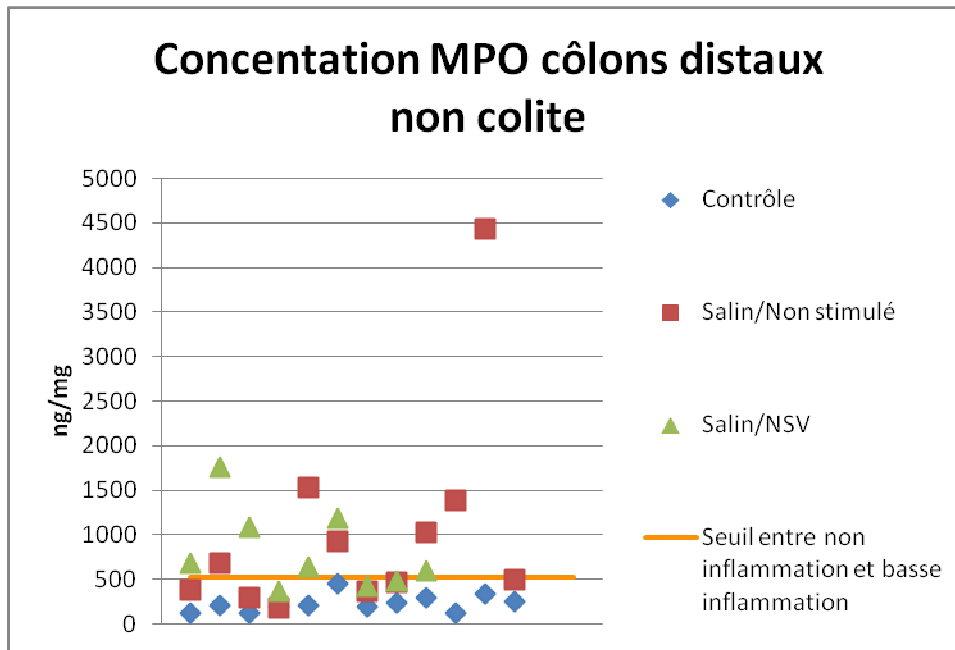




**Figure 59 : concentration en MPO des côlons transverses pour les groupes expérimentaux non-colites (contrôle, salin-non stimulé et salin-NSV). La barre orange représente le seuil entre non inflammation et basse inflammation, ce seuil est fixé à 249 ng/mg de protéines.**

Au niveau du côlon distal une augmentation significative de la concentration de la MPO était observée pour les groupes salin-non stimulé ou salin-NSV par rapport au groupe contrôle (moyenne du groupe contrôle :  $230,5 \pm 29,6$  ng/mg de protéines, moyenne du groupe salin-non stimulé :  $1015,1 \pm 349,7$  ng/mg de protéines, moyenne du groupe salin-NSV :  $801,3 \pm 162,4$  ng/mg de protéines). Tous les rats du groupe contrôle étaient en dessous du seuil de basse inflammation, par contre six rats du groupe salin-non stimulé (carré rouge) et du groupe salin-NSV (triangle vert) étaient au-dessus de cette limite (augmentation de la MPO significative entre le groupe contrôle et le groupe salin-non stimulé ( $p < 0,05$ ) ; et entre le groupe contrôle et le groupe salin-NSV ( $p < 0,01$ )) (figure 60). La concentration en MPO dans les côlons distaux pour les groupes de rats non-colites était plus élevée que dans les côlons transverses ; en effet, l'expression de la MPO était significativement supérieure aux valeurs du groupe contrôle dans le côlon distal. Une majorité de rats des groupes salin-non stimulé et salin-NSV se trouvaient au-dessus du seuil de non inflammation, ce qui signifie que le côlon distal présente une inflammation alors que ces animaux n'ont pas été en contact avec du TNBS.

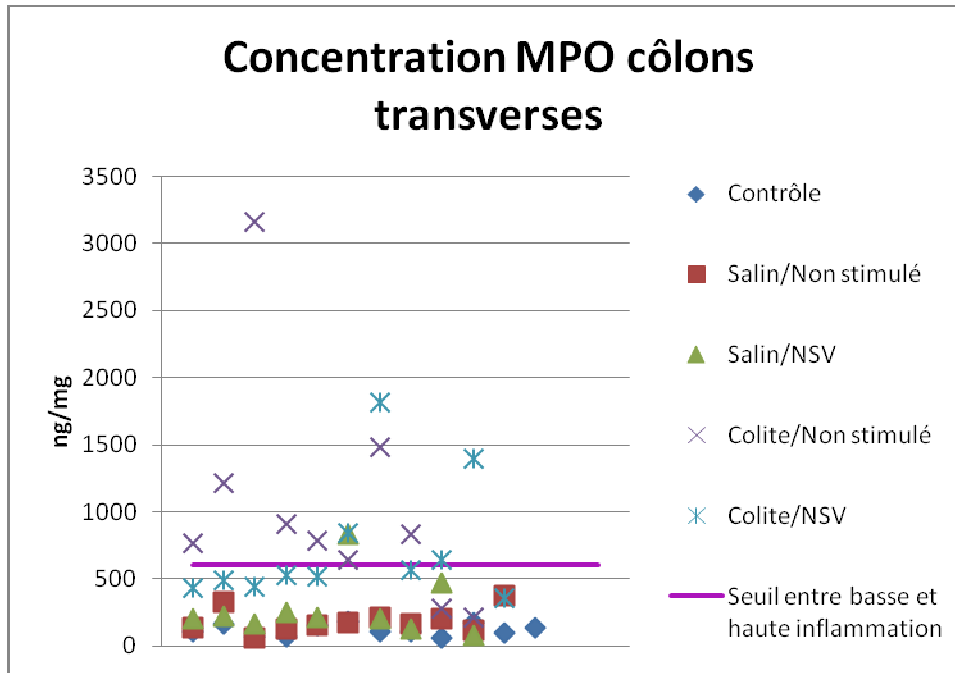
Ce résultat pourrait s'expliquer par une inflammation locale provoquée par l'insertion de la canule et l'injection de sérum physiologique qui se fait au niveau du côlon distal.



**Figure 60 : concentration en MPO des côlons distaux pour les groupes expérimentaux non colites** (contrôle, salin-non stimulé et salin-NSV). La ligne orange représente le seuil entre non inflammation et basse inflammation, elle est fixée à : 525 ng/mg de protéines.

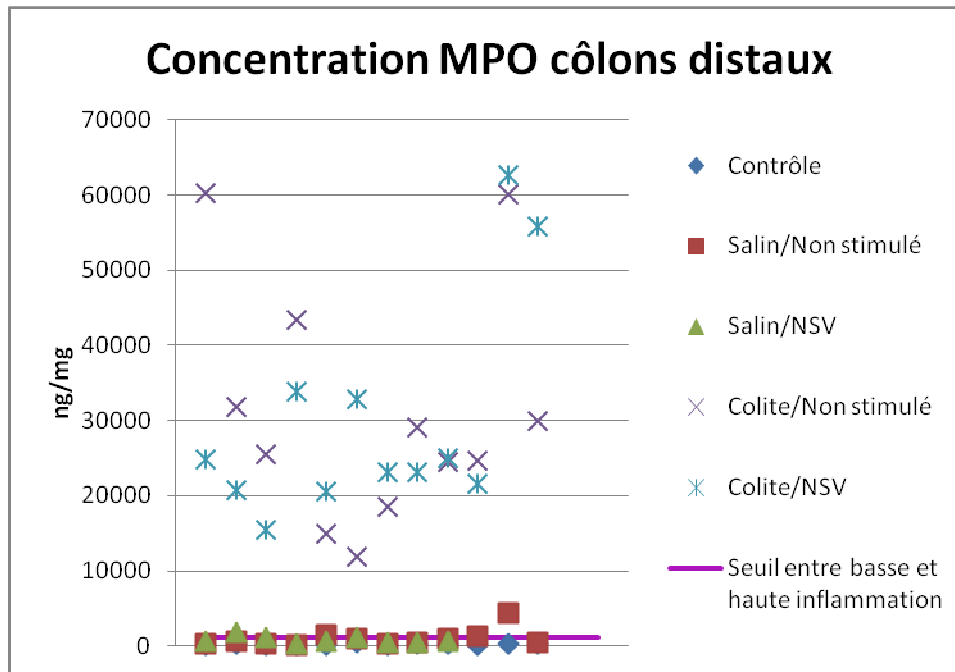
Les valeurs de MPO étaient beaucoup plus élevées pour les groupes colites dans le côlon transverse (au-dessus de la lésion) et distal (dans la lésion) comparé aux groupes salins, mais de manière beaucoup plus importante dans la lésion (côlon distal, moyenne du groupe colite-non stimulé :  $31187 \pm 4763,8$  ng/mg de protéines, groupe colite-NSV :  $29950,9 \pm 4410,7$  ng/mg de protéines ; pour le côlon transverse : moyenne du groupe colite-non stimulé :  $1029,2 \pm 280,3$  ng/mg de protéines, groupe colite-NSV :  $730,9 \pm 145,4$  ng/mg de protéines. L'instillation de TNBS a provoqué une forte augmentation significative de la MPO dans la lésion et également au-dessus de la lésion.

Au niveau du côlon transverse, tous les animaux des groupes non-colite (salin), sauf un du groupe salin-NSV, étaient en dessous du seuil de haute inflammation. Pour les groupes colites, huit rats du groupe colite-non stimulé étaient au-dessus de ce seuil, c'est-à-dire qu'ils présentaient une forte inflammation du côlon transverse, contre seulement quatre rats du groupe colite-NSV. La NSV induit une diminution de la MPO au-dessus de la lésion. Elle a permis de ramener l'inflammation au-dessous du seuil de haute inflammation pour 50% des rats qui présentaient un côlon transverse fortement inflammé, toutefois cette diminution n'était pas statistiquement significative (figure 61).



**Figure 61 : concentration en MPO des côlons transverses de tous les groupes expérimentaux.** La ligne violette représente le seuil entre basse inflammation et haute inflammation, elle est fixée à 630 ng/mg de protéines. Huit rats du groupe colite-non stimulés (croix violette) sont au-dessus de ce seuil de haute inflammation contre quatre pour le groupe colite-NSV (croix bleue).

Les résultats sont différents dans la lésion (côlon distal) : trois rats du groupe salin-non stimulé et deux du groupe salin-NSV se retrouvaient très légèrement au-dessus du seuil de haute inflammation. Tous les animaux des groupes colites (NSV ou non stimulé) étaient largement au-dessus de cette limite démontrant une forte inflammation au niveau du côlon distal. La NSV n'a pas induit de différence significative au niveau du côlon distal de ces animaux (figure 62).



**Figure 62 : concentration en MPO des côlons distaux de tous les groupes expérimentaux.** La ligne violette représente le seuil entre basse inflammation et haute inflammation, il est fixé à 1152 ng/mg de protéines. Tous les animaux des groupes colites (croix violette et croix bleue) se situent largement au-dessus de ce seuil.

La NSV n'a induit aucune différence de concentration de MPO dans le côlon distal, par contre elle a induit une forte tendance à la diminution de la MPO au-dessus de la lésion (côlon transverse) pour le groupe colite-NSV comparé au groupe colite-non stimulé, toutefois cette diminution n'était pas significative (test de Fisher). Un nombre plus important d'animaux serait nécessaire afin de valider statistiquement cette tendance (test statistique Chi square).

#### 4.4 Quantification de l'expression de cytokines tissulaires dans le tube digestif

Les cytokines indicatrices de l'état de l'inflammation : TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6 ont été dosées par technique ELISA dans la lésion (côlon distal) et au-dessus de la lésion (côlon transverse) dans tous les groupes expérimentaux.

Aucune variation significative n'a été observée pour le TGF- $\beta$  et l'IL-6 entre les différents groupes expérimentaux.

#### **4.4.1 Dosage du TNF- $\alpha$**

##### **4.4.1.1 Effet de la NSV**

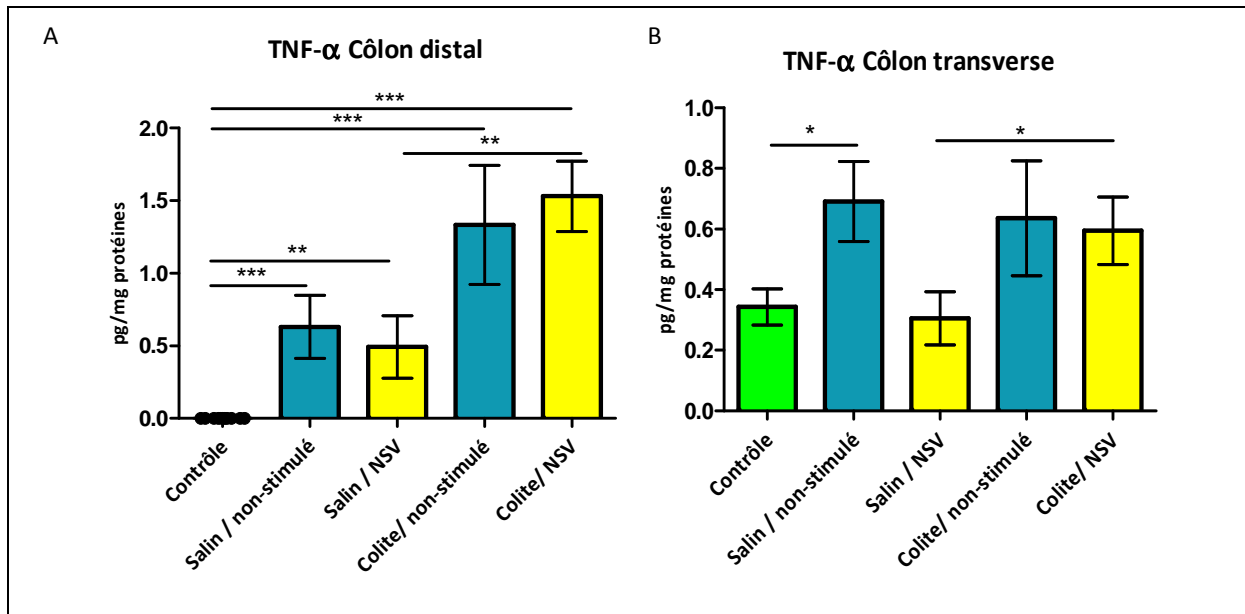
Au niveau du côlon transverse, une diminution non significative pour le groupe salin-NSV était observée par rapport au groupe salin-non stimulé, mais aucun effet significatif de la NSV n'a été retrouvé ni au niveau de la lésion ni au-dessus de la lésion.

##### **4.4.1.2 Effet de la manipulation**

Au niveau du côlon distal, une augmentation significative de l'expression de TNF- $\alpha$  pour les deux groupes salin (moyenne pour le groupe salin-non stimulé :  $0,6 \pm 0,2$  pg/mg de protéines,  $p < 0,001$  ou moyenne pour le groupe salin-NSV :  $0,5 \pm 0,2$  pg/mg de protéines,  $p < 0,01$ ) a été mise en évidence comparé au groupe contrôle (moyenne pour le groupe contrôle :  $0$  pg/mg de protéines), renforçant le résultat obtenu lors du dosage de la MPO. En effet nous avons observé une expression élevée de la MPO pour les groupes salin (stimulé ou non) comparé au groupe contrôle dans le côlon distal ce qui témoigne de la présence d'une inflammation. Dans le côlon transverse, une augmentation significative a également été observée pour le groupe salin-non stimulé comparé au groupe contrôle (moyenne pour le groupe salin-non stimulé :  $0,7 \pm 0,1$  pg/mg de protéines  $p < 0,05$  et moyenne du groupe contrôle :  $0,3 \pm 0,1$  pg/mg de protéines).

##### **4.4.1.3 Effet de la colite**

Une augmentation de l'expression de TNF- $\alpha$  dans le côlon distal pour les deux groupes colite par rapport au deux groupes salins (significatif pour le groupe colite-NSV comparé au groupe salin-NSV, moyenne pour le groupe colite-NSV :  $1,5 \pm 0,3$  pg/mg de protéines contre  $0,5$  pg/mg de protéines pour le groupe salin-NSV ;  $p < 0,01$ ) a été observée ainsi que dans le côlon transverse pour le groupe colite-NSV (moyenne :  $0,6 \pm 0,1$  pg/mg de protéines) comparé au groupe salin-NSV (moyenne :  $0,3 \pm 0,1$  pg/mg de protéines) ( $p < 0,01$ ) (figure 63). Ces variations reflètent un effet de la colite.



**Figure 63 : moyennes de l'expression TNF- $\alpha$  dans le tube digestif. Côlon distal (A) et côlon transverse (B) pour tous les groupes expérimentaux. (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ).**

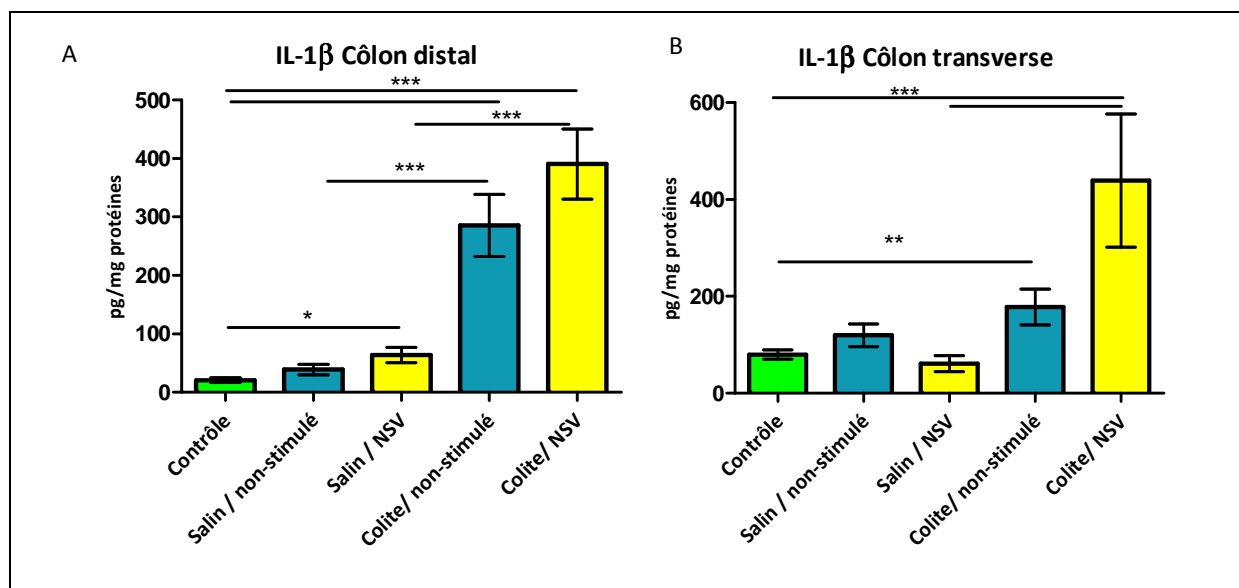
#### 4.4.2 Dosage de l'IL-1 $\beta$

##### 4.4.2.1 Effet de la NSV

Le dosage d'IL-1 $\beta$  n'a révélé aucun effet significatif de la NSV ni dans la lésion ni au-dessus de la lésion.

##### 4.4.2.2 Effet de la colite

Dans le côlon distal une augmentation significative d'IL-1 $\beta$  pour le groupe colite-NSV (moyenne :  $390,6 \pm 62,8$  pg/mg de protéines) et colite-non stimulé (moyenne :  $285,4 \pm 55,9$  pg/mg de protéines) par rapport au groupe salin-NSV (moyenne :  $63,8 \pm 14$  pg/mg de protéines) ( $p < 0,001$ ) et salin-non stimulé (moyenne :  $38,8 \pm 9,5$  pg/mg de protéines) ( $p < 0,001$ ) respectivement a été observé. Dans le côlon transverse, cette augmentation était également présente pour le groupe colite-NSV (moyenne :  $439,1 \pm 143,3$  pg/mg de protéines) par rapport au groupe salin-NSV (moyenne :  $60,7 \pm 17,3$  pg/mg de protéines) ( $p < 0,001$ ) (figure 64). Ces résultats reflètent un effet de la colite.



**Figure 64 : moyennes de l'expression de l'IL-1β dans le tube digestif. Côlon distal (A) et côlon transverse (B) pour tous les groupes expérimentaux. (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ).**

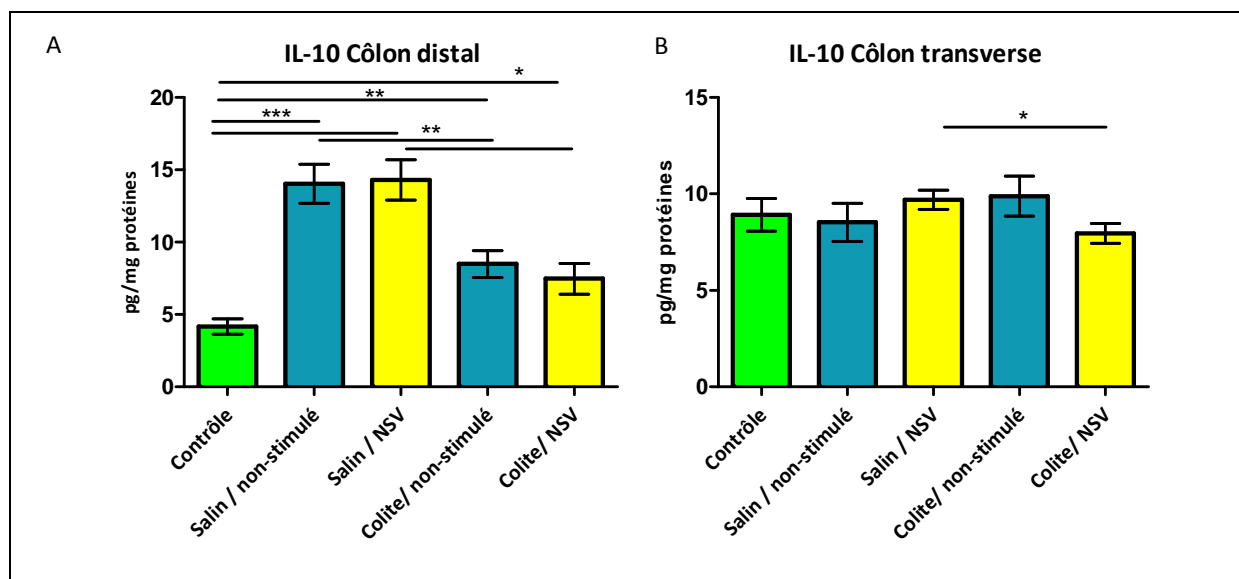
#### 4.4.3 Dosage de l'IL-10

##### 4.4.3.1 Effet de la NSV

A nouveau, la NSV n'a pas provoqué d'effet significatif de l'expression de l'IL-10 dans la lésion ni au-dessus de la lésion.

##### 4.4.3.2 Effet de la colite

L'effet de la colite était retrouvé pour l'IL-10 au niveau du côlon distal avec une diminution significative pour les deux groupes colite-non stimulé (moyenne :  $8,5 \pm 1$  pg/mg de protéines) et colite-NSV (moyenne :  $7,5 \pm 1,1$  pg/mg de protéines) par rapport aux deux groupes salin-non stimulé (moyenne :  $14 \pm 1,4$  pg/mg de protéines) ( $p < 0,01$ ) et salin-NSV (moyenne :  $14,3 \pm 1,5$  pg/mg de protéines) ( $p < 0,01$ ). Cet effet était également observé au niveau du côlon transverse pour le groupe colite-NSV (moyenne :  $8 \pm 0,5$  pg/mg de protéines) par rapport au groupe salin-NSV (moyenne :  $9,7 \pm 0,5$  pg/mg de protéines) ( $p < 0,05$ ) (figure 65).



**Figure 65 : moyennes de l'expression de l'IL-10 dans le tube digestif.** Côlon distal (A) et côlon transverse (B) pour tous les groupes expérimentaux. (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ).

Il est intéressant de noter qu'au niveau de la lésion (côlon distal), une augmentation significative était retrouvée pour tous les groupes expérimentaux par rapport au groupe contrôle pour les trois cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , et IL-10) ce qui montre que la chirurgie ainsi que l'injection de sérum physiologique ont un effet au niveau du tube digestif même pour les animaux non-colites.

#### 4.5 Quantification des ARNm par qRT-PCR

Le dosage des ARNm par q RT-PCR a été réalisé sur les prélèvements de côlons transverses et les splénocytes obtenus après dissociation de la rate.

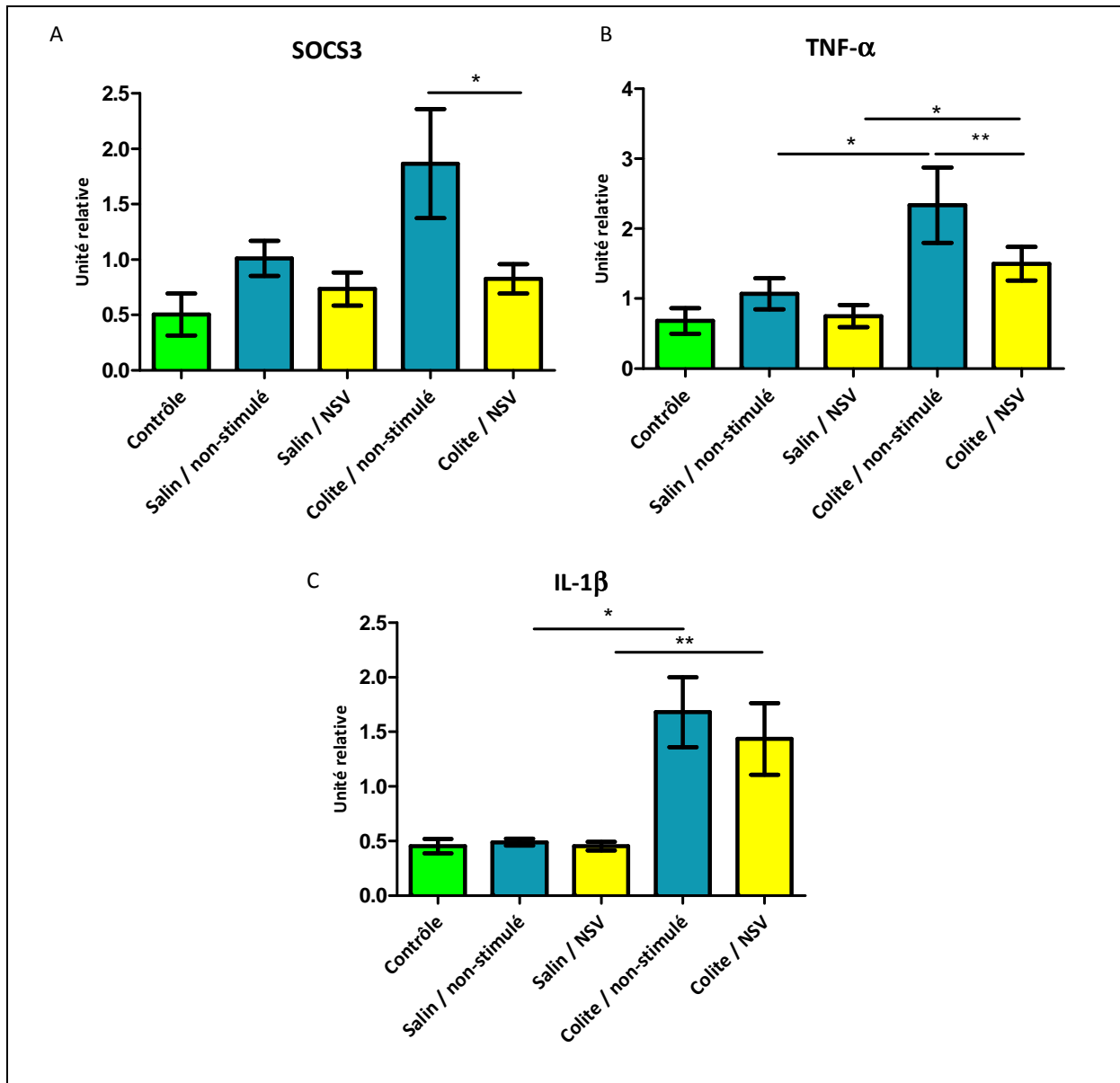
##### 4.5.1 Quantification des ARNm dans le côlon transverse

Les ARNm des gènes d'intérêts suivants étaient détectables dans les prélèvements de côlon transverse : SOCS3, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . De la même manière que précédemment, la quantification des gènes cibles est exprimée en unité relative : la valeur de l'ARNm du gène d'intérêt par rapport à la moyenne géométrique des trois gènes de référence (CYCA, ARBP, HPRT).

Une diminution significative était observée pour l'expression de SOCS3 et TNF- $\alpha$  pour le groupe colite-NSV par rapport au groupe colite-non stimulé révélant un effet anti-inflammatoire de la NSV. En effet la diminution de l'ARNm de SOCS3 met en évidence que la voie de transduction du signal n'est pas activée et donc que l'inflammation est moins importante que pour le groupe colite-non stimulé. Cet effet anti-inflammatoire n'a pas été observé pour le groupe salin-NSV comparé au groupe salin-non stimulé.



La présence de la colite est révélée par l'augmentation significative de l'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  pour les groupes colites NSV et non-stimulé par rapport au groupes salin NSV et non-stimulé respectivement. Ce résultat a été également retrouvé pour l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  (figure 66).



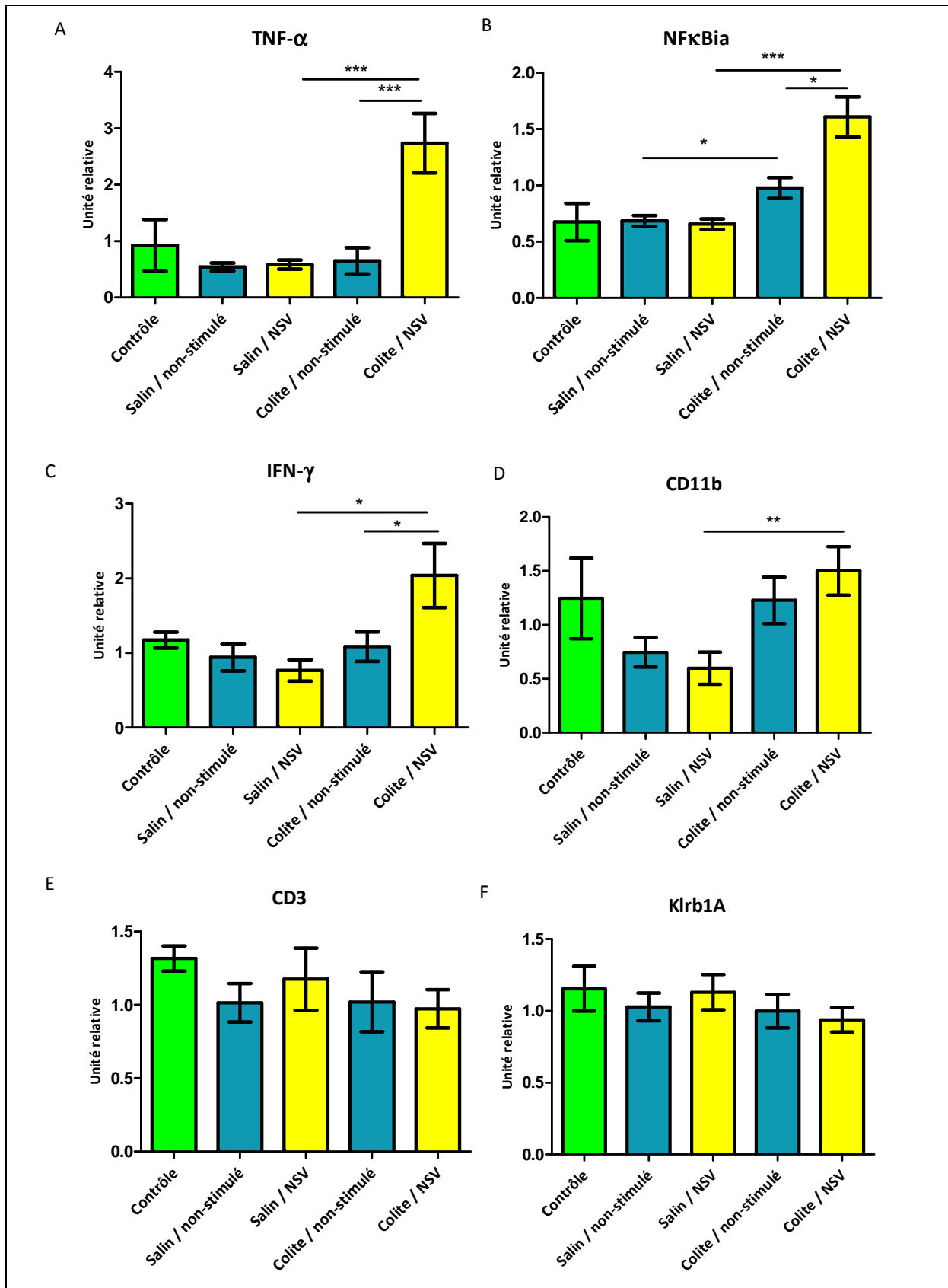
**Figure 66 : dosage des ARNm dans les prélèvements des côlons transverses.** ARNm de SOCS3 (A), de TNF- $\alpha$  (B) et d'IL-1 $\beta$  (C). Unité relative : ARNm du gène d'intérêt/ moyenne géométrique des gènes de référence (ARBP, CYCA et HPRT). (\* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01).

#### **4.5.2 Quantification des ARNm dans les splénocytes**

Les ARNm des gènes d'intérêts suivants étaient étudiés et détectables dans les splénocytes : TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B $\alpha$ , INF- $\gamma$ , CD11b, CD3 et Klr $\beta$ 1A.

La NSV a induit une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B $\alpha$  et d'INF- $\gamma$  pour le groupe colite-NSV comparé au groupe colite non-stimulé. Cet effet n'a pas été retrouvé pour le groupe salin-NSV comparé au groupe salin-non stimulé.

La présence de la colite a également induit une augmentation de TNF- $\alpha$ , d'INF- $\gamma$  et de CD11b pour le groupe colite-NSV par rapport au groupe salin-NSV et également de NF $\kappa$ B $\alpha$  pour les deux groupes colites NSV et non stimulé comparés aux groupes salins NSV et non stimulé respectivement. Aucune variation significative n'a été observée pour l'expression des ARNm de CD3 et Klr $\beta$ 1A (figure 67).



**Figure 67 : dosage des ARNm dans les splénocytes.** Unité relative : ARNm du gène d'intérêt/moyenne géométrique des gènes de référence (ARBP, CYCA et HPRT). (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ ).

### 4.5.3 Corrélations

Afin d'approfondir l'étude, des corrélations ont été réalisées pour les groupes colite-NSV et colite non-stimulé entre les ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et les ARNm codant pour les cellules immunitaires connues pour sécréter du TNF- $\alpha$  (macrophages, lymphocytes T et NK) ainsi qu'avec l'inhibiteur du facteur de transcription NF $\kappa$ B. Ceci permet de mettre en évidence l'existence ou non de relations entre ces gènes d'intérêts.

Dans un premier temps, la corrélation entre l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'inhibiteur de NF $\kappa$ B a été étudiée. Pour le groupe colite-non stimulé, la corrélation est faible (coefficient rho de Spearman ( $r_s$ ) = 0,2857) et non significative, alors que pour le groupe colite-NSV la corrélation est plus importante ( $r_s$ =0,9038) et statistiquement significative ( $p$ <0,01). Ce résultat met en évidence un effet de la NSV qui induit une augmentation de la synthèse d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  dépendant de la voie de signalisation de NF $\kappa$ B ce qui n'est pas retrouvé pour le groupe colite-non stimulé (figure 68).

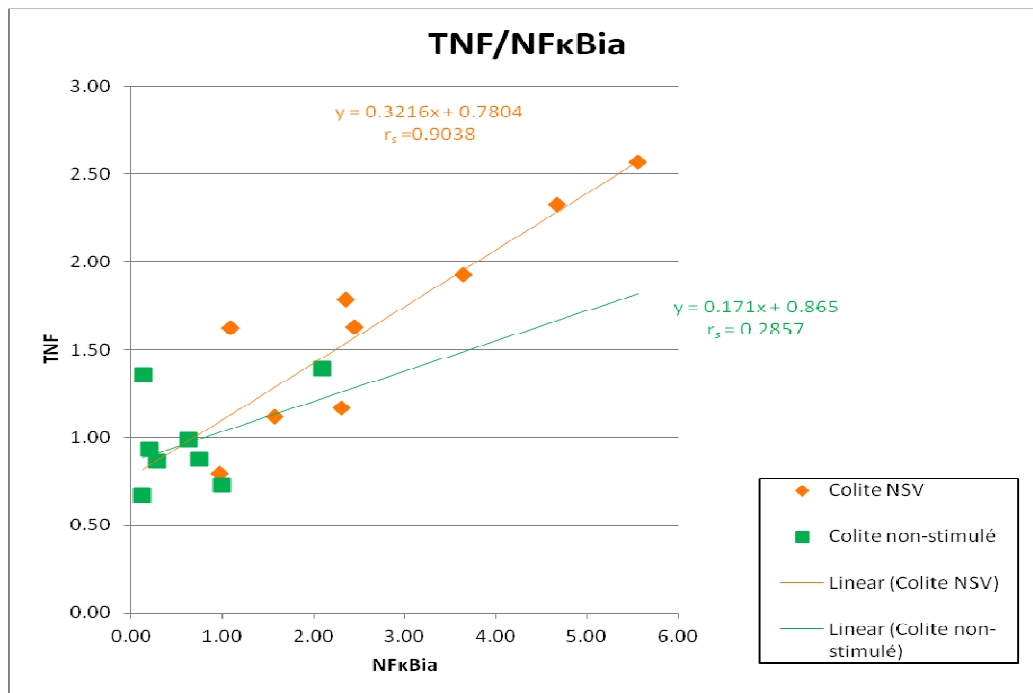
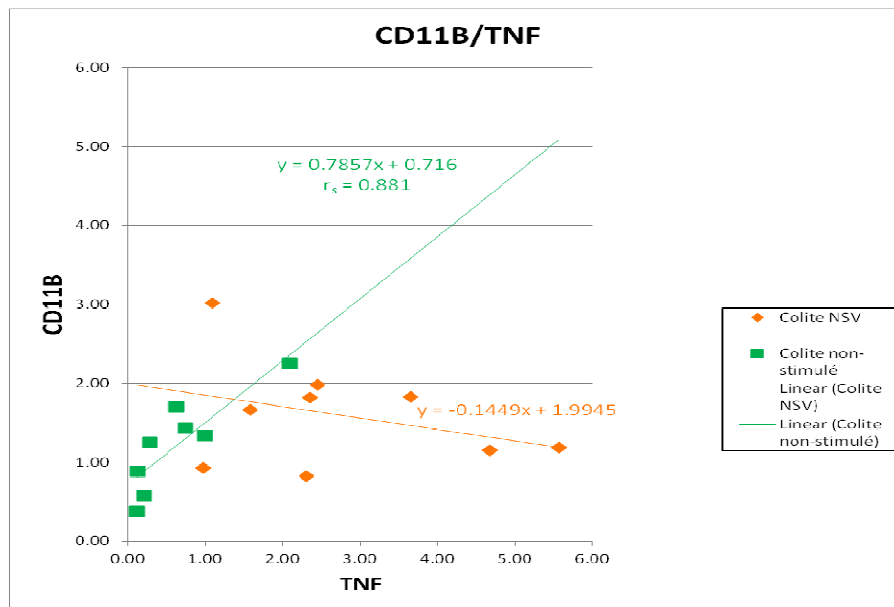


Figure 68 : corrélation entre l'expression des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et des ARNm codant pour NF $\kappa$ Bia dans les splénocytes.

Afin d'étudier s'il existe une relation entre les ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et les ARNm codant pour un marqueur de macrophages (CD11b), le diagramme de corrélation a été réalisé. Pour le groupe colite-non stimulé, la corrélation était importante ( $r_s$ =0,881) et statistiquement significative ( $p$ <0,01). Aucune corrélation n'a été retrouvée pour le groupe colite-NSV. Ce résultat montre que le

niveau de synthèse de TNF- $\alpha$  pour le groupe colite-non stimulé est corrélé à la présence de macrophages ce qui n'est pas le cas pour le groupe colite-NSV (figure 69).



**Figure 69 : corrélation entre l'expression des ARNm codant pour le CD11b et des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  dans les splénocytes.**

Pour étudier si les ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  peuvent être en relation avec d'autres cellules immunitaires capables de sécréter cette cytokine, le diagramme de corrélation entre les ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et pour un marqueur de lymphocytes T (CD3) a été réalisé. Pour le groupe colite-non stimulé les deux variables étaient corrélées ( $r_s=0,7619$ ) et statistiquement significatives ( $p<0,05$ ). Par contre, aucune corrélation n'a été retrouvée pour le groupe colite-NSV. Ce résultat montre que la synthèse d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  est également corrélée à la présence de lymphocytes T, ce qui n'a pas été retrouvé pour le groupe colite-NSV (figure 70).

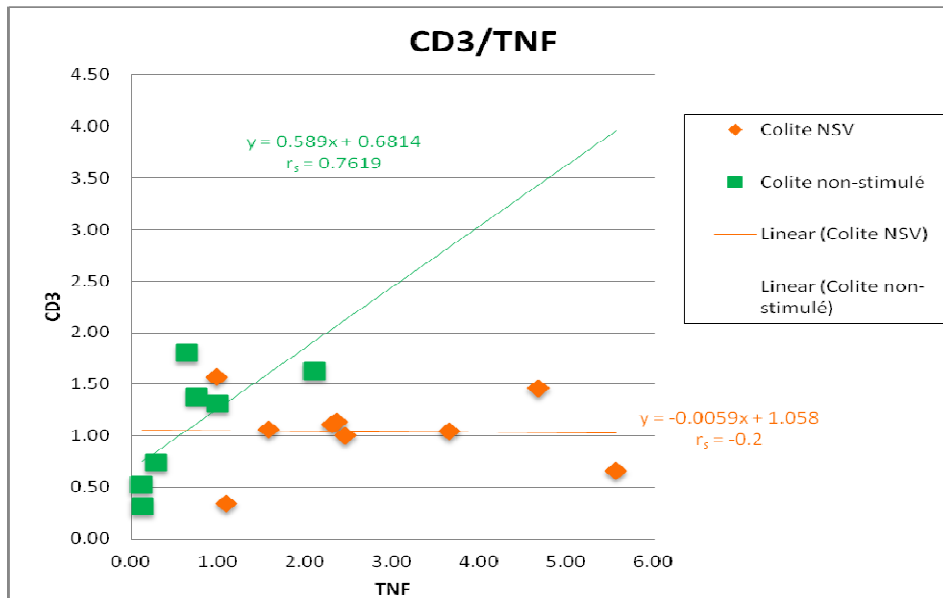


Figure 70 : corrélation entre l'expression des ARNm codant pour le CD3 et des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  dans les splénocytes.

Finalement, la corrélation entre les ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et les ARNm de Klr1A codant pour un marqueur de cellules NK a été réalisée. Aucune corrélation n'a été retrouvée ni pour le groupe colite non-stimulé ni pour le groupe colite NSV. La synthèse d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  n'est donc pas corrélée à la présence de cellules NK dans les deux conditions (figure 71).

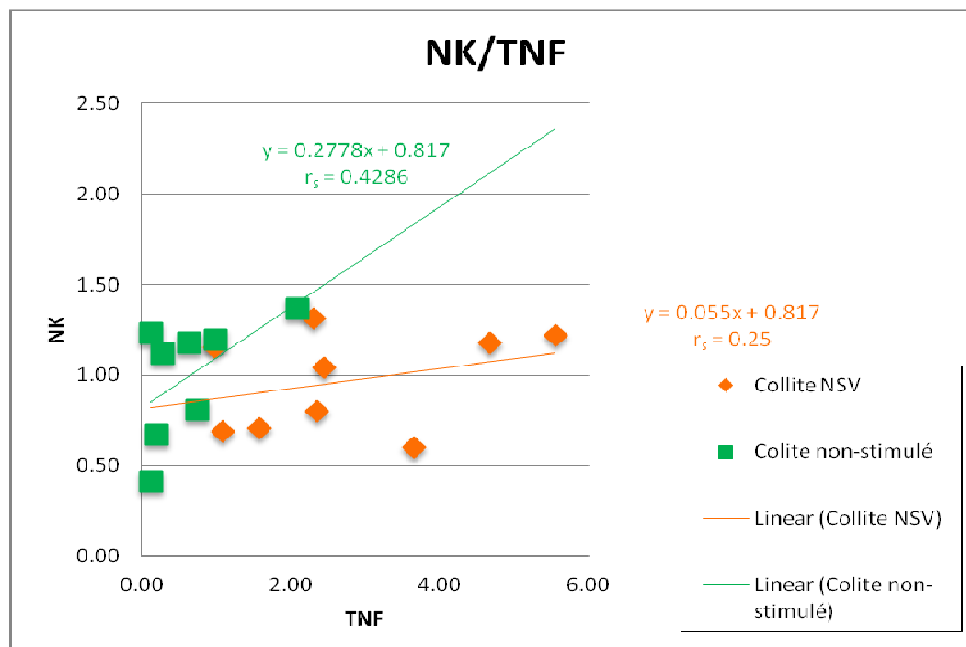


Figure 71 : corrélation entre l'expression des ARNm codant pour Klr1A et des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  dans les splénocytes.

## 5. Discussion

Les données de cette étude ont permis d'évaluer les effets de la NSV basse fréquence (5 Hz) lors de la phase d'initiation de l'inflammation digestive chez le rat anesthésié. Dès l'injection de TNBS terminée, la NSV a été réalisée pendant 3 heures suivie de l'euthanasie des animaux afin d'étudier son impact sur la réponse immunitaire au niveau de la rate ainsi que sur le tube digestif.

Les paramètres de temps de l'expérience ont été choisis d'après les résultats obtenus lors de l'étude cinétique de la colite au TNBS. Les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$ ) étaient significativement plus élevées dès 3 heures après injection de TNBS par rapport au groupe salin. La NSV 3h avait également été préalablement testée par le laboratoire et avait montré son efficacité sur l'inflammation digestive chez un modèle de rat vigile non anesthésié présentant une colite et stimulé de manière chronique pendant 3 heures pendant 5 jours consécutifs (Meregnani et al. 2011).

Le modèle utilisant le TNBS permet l'induction rapide de l'inflammation digestive, ce qui est important dans cette étude étant donné que l'expérience est réalisée sur des animaux anesthésiés. Pendant l'étude cinétique de la colite au TNBS, l'état général, dont le poids des animaux du groupe colite, a été suivi pendant cinq jours et a permis de mettre en évidence une perte de poids importante dès le lendemain de l'injection. Les rats présentaient également des signes de «mal-être» tels que le poil hérissé et non nettoyé, une position prostrée et des diarrhées. La présence de zones inflammatoires importantes au niveau du côlon distal est observée lors des prélèvements. L'inflammation digestive est donc bien présente dès 3 heures après l'injection de TNBS.

Cette étude permet de répondre à la question initialement posée : la NSV basse fréquence a-t-elle un effet sur la rate et plus précisément sur des sous-populations lymphocytaires spécifiques lors de l'initiation de l'inflammation digestive ? En effet, la rate, organe lymphoïde secondaire, joue un rôle important dans la réponse immunitaire précoce aux lésions et aux pathogènes. La rate est une source majeure de TNF- $\alpha$  retrouvé dans le sang et il a été démontré que la splénectomie induisait une diminution significative de TNF- $\alpha$  circulant ce qui permet une meilleure survie lors de l'occurrence d'un choc septique (Huston et al. 2006 ; Huston et al. 2008). De plus, des études ont récemment montré que la NVS ne permettait plus d'inhiber la sécrétion de TNF- $\alpha$  chez des souris splénectomisées, révélant un lien entre la voie anti-inflammatoire cholinergique classiquement connue et une voie moins étudiée qui est la voie splénique permettant de réguler les réponses immunitaires (Rosas-Ballina et al. 2008 ; Rosas-Ballina and Tracey 2009). Le NV aurait donc une action sur la rate et plus particulièrement sur les cellules immunitaires spléniques : l'étude de Huston et al. a montré que la NSV diminue l'activation des neutrophiles (Huston et al. 2009) ainsi que leur recrutement sur les sites d'inflammation (Saeed et al. 2005). Toutefois, pour que la NSV induise cet

effet, la présence de la rate est nécessaire. Il apparaît donc que la rate réagit sous le contrôle du NV dans la modulation de la réponse immunitaire induite par une inflammation.

Les résultats obtenus lors de cette étude confirment cet effet. De manière surprenante, les résultats de cytométrie en flux obtenus pendant l'étude 2 sur les rats «sains» anesthésiés au pentobarbital n'ont pas été retrouvés lors de l'étude 3. En effet, notre hypothèse initiale était que l'inhibition de l'activation lymphocytaire au niveau splénique induite par la NSV observée sur les LT CD4 dans l'étude 2 sur rats sains serait observable chez un modèle de rat présentant une inflammation digestive au moment de l'initiation de l'inflammation. Ce résultat n'est pas retrouvé au niveau des groupes colites ni au niveau des groupes salins. La différence de résultats entre les deux études au niveau des groupes salins et des rats «sains» est étonnante mais pourrait s'expliquer par le fait que les rats salins ont reçu une injection de sérum physiologique intra-colique alors que les rats sains de l'étude 2 n'ont pas eu d'injection intra-colique. Cette manipulation induirait une inflammation locale. En effet, une augmentation significative de la MPO a été dosée dans les côlons distaux des groupes de rats salins (stimulés ou non stimulés) par rapport au groupe contrôle. Ceci révèle la présence d'une inflammation alors que ces animaux n'ont pas été en contact avec le TNBS. Cette inflammation n'a pas été retrouvée au niveau du côlon transverse pour les groupes salins, c'est-à-dire au-dessus du lieu d'injection. Ce résultat renforce l'hypothèse selon laquelle le fait d'introduire la canule et d'injecter du sérum physiologique pourrait induire une inflammation locale. Cette inflammation reste toutefois modérée car la majorité des rats des groupes salins sont en-dessous du seuil de haute inflammation.

Une controverse persiste concernant l'innervation de la rate par le NV. Certaines études démontrent une innervation directe de la rate par celui-ci (Buijs et al. 2008; Chen et al. 1996) alors que des études récentes semblent pencher pour une innervation indirecte via le ganglion coélique. Selon elles, le NV activerait le système noradrénergique sympathique du nerf splénique au niveau du ganglion coélique via les récepteurs  $\alpha_7$ nAChR pour moduler l'inflammation. La fixation de l'ACh, sécrétée par les efférences vagales, sur les récepteurs  $\alpha_7$ nAChR du nerf splénique au niveau du ganglion coélique induirait la sécrétion de norépinephrine dans la rate (Vida et al. 2011). Il a été démontré que la norépinephrine via les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des macrophages dans la rate (Chou et al. 1996 ; Kees et al. 2003). Une autre étude met en évidence l'effet de la norépinephrine sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques des lymphocytes T spléniques qui sécrèteraient alors de l'ACh se fixant sur les récepteurs  $\alpha_7$ nAChR des macrophages (Rosas-Ballina et al. 2011). Ces résultats sont en faveur d'un lien entre le système parasympathique (NV) et le système sympathique (nerf splénique) pour réguler l'inflammation digestive. Cependant, une étude récente démontre *a contrario* qu'aucune connexion neuronale



n'existe entre le NV et le nerf splénique. Les auteurs concluent que l'effet anti-inflammatoire du NV n'exerce pas son action sur la rate par une action synaptique au niveau des nerfs spléniques mais probablement par un mécanisme parallèle qu'il reste à élucider (Bratton et al. 2012).

Dans nos conditions expérimentales, un effet de la NSV sur les splénocytes et plus particulièrement sur les lymphocytes T CD4 spléniques est observé au niveau de leur fonctionnalité. De ce fait, même si l'innervation de la rate par le NV reste mal connue, la NSV basse fréquence joue un rôle sur celle-ci dans des conditions sans inflammation digestive et en phase d'initiation de l'inflammation. Contrairement à l'étude 2, l'effet de la NSV a été identifié au niveau de la fonctionnalité des sous-populations lymphocytaires spléniques et non pas au niveau du nombre de cellules. En effet, la NSV induit une augmentation significative du potentiel de sécrétion d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) des splénocytes en culture et activés pendant 48h pour les groupes NSV 3h colite et salin comparés aux groupes non stimulés. Ce résultat a été retrouvé pour la population de lymphocytes T CD4 en culture et activés pendant 48h. L'augmentation pour les LT CD4 était similaire à celle des splénocytes totaux, cette augmentation peut alors s'expliquer par une sécrétion majoritaire d'IL-10 par les LT CD4. La NSV aurait donc un rôle sur la fonctionnalité des splénocytes lors de la phase d'initiation de l'inflammation digestive et plus particulièrement sur les LT CD4. Cette sous-population lymphocytaire splénique a préalablement été désignée pour être modulée par l'action du NV chez un modèle de souris dans des conditions physiologiques. En effet, Karimi et al. démontrent que le NV exerce une fonction inhibitrice au niveau de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et de la prolifération des LT CD4 dans des conditions physiologiques (Karimi et al. 2010). De façon intéressante notre étude permet également de mettre en valeur un effet sur la fonctionnalité des LT CD4 en les orientant vers une réponse anti-inflammatoire lors de la stimulation du NV dans des conditions d'inflammation digestive. Cependant, cet effet observé à l'échelle cellulaire n'est pas retrouvé dans les résultats de quantification des ARNm dans les splénocytes obtenus après dissociation de la rate (sans mise en culture et activation). Effectivement, l'expression des ARNm codant pour le NF $\kappa$ B $\alpha$ , le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  augmente significativement pour le groupe colite-NSV par rapport au groupe colite-non stimulé. Cette augmentation est également retrouvée pour les ARNm codant pour le CD11b. L'étude de la corrélation entre les ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et le CD11b a montré que ces deux variables ne sont pas corrélées pour le groupe colite-NSV alors qu'elles le sont pour le groupe colite-non stimulé. La NSV semble provoquer une réponse pro-inflammatoire au niveau des splénocytes non cultivés du groupe colite-NSV par rapport au groupe colite-non stimulé. En outre, aucun effet de la NSV n'est observé pour le groupe salin-NSV. Cette augmentation d'expression d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et le NF $\kappa$ B $\alpha$  est surprenante ; toutefois, l'expression d'ARNm n'est pas toujours corrélée au niveau de l'expression des protéines et

donc à l'effet physiologique comme cela a pu être observé lors de l'étude 2. Il serait intéressant de quantifier ces ARNm dans les splénocytes cultivés et activés pendant 48h afin de pouvoir comparer ces résultats avec les résultats de dosage de sécrétion des cytokines déjà obtenus dans cette étude et ainsi de voir si les quantifications à ces deux niveaux évoluent dans le même sens.

L'étude des corrélations entre les différents ARNm des splénocytes montre un effet potentiel de la NSV sur l'expression du TNF- $\alpha$  ; effectivement, une corrélation existe entre les ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et ceux codant pour le NF $\kappa$ B pour le groupe colite-NSV et pas pour le groupe colite-non stimulé. Ce résultat pourrait être expliqué par une hypothèse selon laquelle la NSV induirait des changements de voie de signalisation : une voie NF $\kappa$ B dépendante pour les splénocytes stimulés et une indépendante pour les non-stimulés. Néanmoins, les autres corrélations montrent que la synthèse d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  n'est pas corrélée à la présence des différents types cellulaires (CD11b, CD3 et NK) pour le groupe colite NSV. Toutefois, pour le groupe colite non-stimulé une corrélation existe entre la synthèse d'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et les ARNm codant pour le CD 11b et pour le CD3. Ces résultats peuvent être discutés quant à la spécificité des marqueurs utilisés. En effet, ceux-ci ne semblent pas être les plus pertinents pour cette étude, pouvant ne pas être spécifiques des cellules activées mais également être exprimés par les précurseurs de ces cellules immunitaires. Pour être confirmés, ces résultats nécessitent une étude plus poussée au niveau de la pertinence des marqueurs à utiliser, ce qui permettrait d'évaluer ces corrélations.

D'autre part, l'effet de la colite a été retrouvé au niveau des lymphocytes et des cellules NKT spléniques. Effectivement, une diminution significative est observée pour les deux groupes colites par rapport aux deux groupes salins quant au pourcentage de lymphocytes totaux par rapport aux cellules totales et du nombre de NKT. La diminution du nombre de NKT est particulièrement intéressante car ce sont des cellules reconnues pour avoir des propriétés immunorégulatrices et notamment au niveau digestif. Ils sont impliqués dans la réponse anti-infectieuse, anti-tumorale, dans l'effet de tolérance dans les greffes, mais également dans le contrôle des maladies auto-immunes (Kronenberg 2005 ; Van Kaer 2007 ; Van Kaer et al. 2011). En outre il a été démontré qu'une fois activés ils peuvent orienter la réponse immunitaire vers un profil Th1 ou Th2 (Matsuda et al. 2008). Des études chez la souris ont mis en évidence le rôle protecteur des NKT lors d'une inflammation digestive. Cette protection était induite par un changement de profil cytokinique Th1 vers un profil Th2 (Saubermann et al. 2000 ; Shibolet et al. 2004). Il est envisagé par notre équipe de réaliser une expérience de localisation des NKT au niveau du côlon transverse et distal des animaux de notre étude afin d'observer si la diminution des NKT spléniques pourrait s'expliquer par leur migration de la rate vers les sites de lésions inflammatoires afin de moduler l'inflammation locale.

Les données des différentes analyses réalisées sur le tube digestif mettent en évidence un effet anti-inflammatoire de la NSV. Il n'a pas été retrouvé au niveau de la lésion (dans le côlon distal) mais au-dessus de la lésion (dans le côlon transverse) comme cela a été observé préalablement dans notre laboratoire (Meregnani et al. 2011). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les lésions inflammatoires présentes dans les côlons distaux des animaux sont déjà très importantes dès trois heures après l'injection de TNBS, alors que dans le côlon transverse aucune lésion inflammatoire n'est observée, bien qu'une légère inflammation induite par le TNBS soit présente. Ceci est démontré par une augmentation significative de l'expression de MPO des groupes colites par rapport aux groupes salins, et une légère augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon transverse. Le dosage de la MPO dans le côlon transverse a montré que la NSV a pour effet de ramener l'inflammation au-dessous du seuil de haute inflammation pour 50% des rats qui se trouvaient au-dessus de ce seuil. Ce résultat n'est pas statistiquement significatif mais représente une tendance, et est renforcé par les dosages des ARNm de TNF- $\alpha$  et SOCS3. Effectivement, une diminution significative a été notée pour le groupe colite-NSV 3h comparé au groupe colite-non stimulé. Cette diminution de l'ARNm de TNF- $\alpha$  n'est pas retrouvée au niveau protéique dans le côlon transverse.

L'effet anti-inflammatoire observé au niveau digestif est modéré, ce qui pourrait s'expliquer par un temps de NSV trop court par rapport à l'inflammation présente. Toutefois, ces résultats apportent des informations sur l'effet anti-inflammatoire de la NSV effectuée pendant la phase d'initiation de l'inflammation. Pour avoir un effet plus important, une stimulation du nerf vague préalable à l'injection de TNBS pourrait être rajoutée pour initialiser la réponse anti-inflammatoire avant le début de l'inflammation et ainsi potentiellement obtenir un effet plus important contre cette inflammation. L'effet anti-inflammatoire le plus important a été obtenu au-dessus des zones inflammées, ce résultat pourrait être important à prendre en compte lors d'un essai clinique pour le traitement de la maladie de Crohn. En effet, la NSV pourrait être plus adaptée comme traitement d'entretien de la rémission de la maladie plutôt que lors de poussées inflammatoires sévères.

## VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

De nos jours, la NSV haute fréquence est utilisée pour le traitement de certaines formes d'épilepsie et de dépression réfractaires aux médicaments (Groves and Brown 2005; Handforth et al. 1998). Peu d'effets secondaires ont été répertoriés : une raucité de la voix, de la toux, ou des picotements peuvent avoir lieu mais de manière temporaire, néanmoins son mécanisme d'action reste mal connu (Bao et al. 2011). Concernant la NSV basse fréquence, il a été démontré qu'elle induisait un effet anti-inflammatoire qui a pu être testé avec succès sur de nombreux modèles d'inflammation différents tels que le choc septique, les lésions causées par l'ischémie-reperfusion, le choc hémorragique et l'inflammation digestive (Bernik et al. 2002a ; Borovikova et al. 2000b ; Ghia et al. 2006; Guarini et al. 2003 ; Wang et al. 2003). Cet effet anti-inflammatoire s'explique par l'activation de la voie anti-inflammatoire cholinergique (Borovikova et al. 2000b). En effet lors de la NSV, les efférences vagales sécrètent de l'ACh qui va alors se lier aux récepteurs  $\alpha 7$  nicotiques, ou éventuellement aux récepteurs nicotiques  $\alpha 4$ - $\beta 2$ , exprimés à la surface des macrophages (van der Zanden et al. 2009). La fixation de l'ACh inhibe la translocation du facteur de transcription NF $\kappa$ B dans le noyau et diminue ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, ou l'IL-1. Toutefois d'autres voies cellulaires pourraient être empruntées pour compléter cette voie déjà établie dans l'effet anti-inflammatoire de la NSV basse fréquence. Ce travail a donc porté sur l'étude des mécanismes d'action de la NSV et plus particulièrement sur l'implication du SNC, du système immunitaire et des différentes voies potentiellement impliquées dans l'effet anti-inflammatoire de la NSV.

La NSV haute fréquence (20-30Hz) utilisée dans le cadre de traitement de l'épilepsie ou de la dépression est reconnue pour avoir un effet central via les afférences vagales. Cependant, la NSV basse fréquence (5Hz) était plutôt reconnue comme activant préférentiellement les efférences vagales et non les afférences (Bernik et al. 2002a; Borovikova et al. 2000b; Tracey 2007). La première étude de ce travail a donc porté sur les répercussions de la NSV basse fréquence sur le SNC. Notre hypothèse initiale était que la NSV basse fréquence devait en plus d'activer les efférences vagales, également en activer les afférences. Cette étude par IRMf nous a permis de conforter cette hypothèse ; en effet, la NSV 5Hz active les afférences vagales et celles-ci sont capables de moduler des structures cérébrales particulièrement celles appartenant au système de régulation central du système autonome. Une composante neuronale est donc bien présente lors de la NSV basse fréquence. Ce résultat est intéressant car il pourrait indiquer qu'en plus de l'effet anti-inflammatoire produit par les efférences vagales, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien pourrait être également mis à contribution afin de renforcer l'effet anti-inflammatoire au niveau périphérique. Cette étude est la première réalisée par IRMf sur le petit animal portant sur les effets de la NSV aiguë. Les données obtenues montrent que l'effet de la NSV pourrait être induit par la modulation,

via les afférences vagales, de structures sous-corticales comme le NTS, le locus coeruleus, le noyau parabrachial ou encore le cervelet en plus de l'action des afférences vagales.

Une fois que la composante neuronale centrale a pu être mise en évidence, nous avons cherché à étudier l'implication du système immunitaire. Notre intérêt s'est porté particulièrement sur le rôle de la rate car elle a récemment été désignée comme un organe clé pour le bon fonctionnement de la voie anti-inflammatoire cholinergique. Une étude a démontré que l'ablation de la rate inhibe le rôle anti-inflammatoire de la NSV chez un modèle de choc septique chez la souris (Huston et al. 2006). Une autre étude (Karimi et al. 2010) a mis en évidence que la NSV avait un effet sur les lymphocytes T CD4 spléniques chez un modèle de souris dans des conditions physiologiques. Nous avons alors montré que la NSV avait une action sur la rate et plus particulièrement sur une sous-population lymphocytaire splénique chez un modèle de rat sain dans un premier temps puis chez un modèle de rat atteint de colite expérimentale.

L'étude chez le modèle de rat sain nous a permis de montrer l'importance du choix de l'anesthésique lors d'études réalisées sur l'inflammation. En effet, nos données ont mis en évidence que l'anesthésique gazeux couramment utilisé, l'isoflurane, interfère avec la NSV. L'isoflurane est un anesthésique présentant des propriétés anti-inflammatoires (Boost et al. 2009; Flondor et al. 2008; Hofstetter et al. 2005; Lee et al. 2004). Son utilisation dans notre étude portant sur l'effet de la NSV sur les différentes sous-populations lymphocytaires spléniques induisait une diminution du nombre de cellules de toutes ces populations cellulaires pour le groupe de rats stimulés pendant 3h. Ce résultat était en contradiction avec notre hypothèse de départ selon laquelle la NSV aurait un effet sur une sous-population lymphocytaire splénique, probablement les lymphocytes T CD4. Afin de s'affranchir des possibles interférences entre l'isoflurane et la NSV, l'étude a été reconduite en utilisant un autre anesthésique, le pentobarbital, répertorié comme n'affectant pas l'inflammation. Les nouvelles données obtenues avec cet anesthésique sont différentes de celles obtenues lors de l'utilisation de l'isoflurane. En effet, une diminution significative de l'activation lymphocytaire des lymphocytes T CD4 (%CD25 dans la population des lymphocytes T CD4) est retrouvée pour le groupe NSV 3h comparé au groupe Sham 3h ainsi qu'une diminution du pourcentage des NKT rapporté aux lymphocytes T. D'autres variations ont été mises en évidence avec l'utilisation du pentobarbital, telle qu'une diminution significative du nombre de lymphocytes T et de lymphocytes T CD4 pour tous les groupes opérés comparés au groupe contrôle (non opéré). Ces variations pourraient être expliquées par l'inflammation induite par la chirurgie réalisée afin de mettre en place l'électrode de stimulation au niveau de la portion cervicale du nerf vague gauche. L'isoflurane, de par ses propriétés anti-inflammatoires, pourrait camoufler les variations observées avec l'utilisation du pentobarbital. Ce

dernier nous semble plus adapté à l'étude de phénomènes inflammatoires. Ces résultats soulignent l'importance du choix de l'anesthésique lors d'expériences in vivo dans le domaine de l'inflammation.

Cette étude a également permis de répondre à la question initialement posée : la NSV 5Hz a-t-elle un effet sur la rate et a-t-elle d'autres cibles que les macrophages? La NSV 20 min ne provoque aucune modification au niveau des sous-populations lymphocytaires spléniques. Cependant, les données obtenues mettent en évidence que la NSV 3h inhibe l'activation des lymphocytes T CD4 et joue éventuellement un rôle sur les cellules NKT possédant des propriétés immunorégulatrices. Ces résultats obtenus chez un modèle de rat sain, c'est-à-dire ne présentant pas d'inflammation périphérique, nous ont permis d'étudier l'implication de la rate dans des conditions physiologiques. Ils mettent également en évidence que la NSV doit être réalisée sur une période suffisamment longue pour obtenir un effet.

Finalement, nous nous sommes intéressés à l'effet de la NSV sur la rate en présence d'inflammation digestive et plus précisément lors de la phase d'initiation de l'inflammation. Parallèlement nous avons étudié si l'effet anti-inflammatoire de la NSV pouvait être retrouvé au niveau digestif après seulement 3h de NSV. Pour cela la dernière étude a été réalisée chez un modèle de rat atteint d'une colite expérimentale induite par une injection intra-colique de TNBS. Ce modèle provoque rapidement des lésions digestives présentant des similitudes avec les lésions observées lors de la maladie de Crohn. Les résultats obtenus ont montré que la NSV a bien un effet au niveau splénique lors de l'initiation de l'inflammation digestive mais pas au niveau de l'activation lymphocytaire comme observé lors de l'étude chez le modèle de rat sain. L'effet de la NSV dans ce cas porte sur la fonctionnalité des splénocytes en augmentant leur potentiel de sécrétion d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire). Nous avons pu voir que cet effet était retrouvé pour les lymphocytes T CD4. La NSV orienterait les splénocytes et plus particulièrement les lymphocytes T CD4 vers une réponse anti-inflammatoire. Parallèlement, l'effet anti-inflammatoire au niveau du tube digestif a pu être apprécié au niveau du côlon transverse, c'est-à-dire au-dessus des lésions (côlon distal). Cet effet avait été préalablement décrit dans notre laboratoire (Meregnani et al. 2011). L'effet anti-inflammatoire au niveau du côlon transverse reste tout de même très modéré. Une période de NSV supplémentaire précédant l'injection de TNBS pourrait éventuellement induire un effet anti-inflammatoire plus important au niveau du tube digestif.

Nous avons pu observer une diminution significative du nombre de NKT spléniques pour les groupes colites par rapport aux groupes salins. Une expérience par microscopie confocale sur la localisation de NKT est envisagée par l'équipe afin d'étudier si ces cellules migrent de la rate pour atteindre les sites de lésions au niveau du côlon afin de moduler l'inflammation locale. Il serait intéressant de réaliser la même expérience à un moment plus tardif de l'inflammation digestive sur

des animaux stimulés de manière chronique pour voir si une NSV de plus longue durée jouerait un rôle sur ces cellules immunorégulatrices.

Une étude supplémentaire de quantification d'ARNm des splénocytes cultivés et activés pendant 48h serait intéressante à réaliser afin de pouvoir comparer ces résultats avec ceux déjà obtenus sur le dosage des cytokines sécrétées par ces cellules. En effet, la quantification des ARNm des splénocytes non cultivés semble montrer un effet de la NSV pro-inflammatoire dans ces splénocytes. Toutefois, le dosage de cytokines sécrétées par les splénocytes cultivés et activés pendant 48h montre une augmentation de sécrétion d'IL-10 pour les groupes NSV. Cependant, comme nous l'avons observé à plusieurs reprises, la quantité d'ARNm n'est pas forcément corrélée à la quantité de protéines retrouvées et donc pas nécessairement à l'effet physiologique. Il est ainsi important d'obtenir ces deux informations à partir de cellules soumises aux mêmes conditions expérimentales pour confirmer ce résultat.

De plus amples études pourraient être réalisées portant sur l'effet de la NSV sur la rate et le tube digestif à une période plus tardive de l'inflammation digestive, notamment chez un modèle de rat implanté de manière chronique permettant de s'affranchir des effets secondaires des anesthésiques et de la chirurgie.

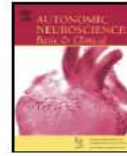
La NSV pourrait également être testée sur un modèle de colite différent du modèle au TNBS (modèle de la MC) utilisé dans ce travail. Elle pourrait être étudiée sur un modèle de colite au DSS qui est le pendant de la rectocolite hémorragique chez l'Homme (Okayasu et al. 1990). Cet agent est administré aux animaux dans l'eau de boisson et induit une inflammation diffuse (touche l'ensemble du TD) et des lésions moins profondes que le TNBS (atteinte de la muqueuse et de la sous-muqueuse).

Ces résultats ont une implication thérapeutique car la NSV basse fréquence fait actuellement partie d'un essai clinique comme traitement de la poussée de la maladie de Crohn chez l'Homme réalisée par notre équipe dans le cadre d'un Appel à Projet (AAP) de recherche clinique translationnelle INSERM-DGOS 2011.

Les données obtenues dans ce travail, mettent en évidence une partie du mécanisme d'action de la NSV basse fréquence avec une implication du SNC et du système immunitaire notamment au niveau des lymphocytes T CD4 spléniques. La NSV semble plus adaptée dans le traitement de la maladie de Crohn en phase de rémission dans le but de prolonger cette rémission plutôt qu'en phase de poussées inflammatoires sévères. Elle serait intéressante pour les poussées inflammatoires modérées et en prévention de rechute.



## VII. ANNEXE (articles publiés)



## Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease

J. Meregnani<sup>a,1</sup>, D. Clarençon<sup>a,b,1</sup>, M. Vivier<sup>b</sup>, A. Peinnequin<sup>a,b</sup>, C. Mouret<sup>b</sup>, V. Sinniger<sup>a</sup>, C. Picq<sup>a,b</sup>, A. Job<sup>b</sup>, F. Canini<sup>a,b</sup>, M. Jacquier-Sarlin<sup>a</sup>, Bruno Bonaz<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Stress et Interactions Neuro-Digestives (SIND, EA3744), Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), INSERM U836 UJF-CEA-CHU, Université Joseph Fourier, Site Santé La Tronche, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9, France

<sup>b</sup> Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Antenne de La Tronche, BP87, 38702 La Tronche Cedex, France

<sup>c</sup> Clinique Universitaire d'Hépatogastroentérologie, CHU de Grenoble, BP217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 June 2010

Received in revised form 7 October 2010

Accepted 15 October 2010

#### Keywords:

Vagus nerve stimulation

Trinitrobenzenesulfonic acid

Colitis

Inflammation

Inflammatory bowel diseases

### ABSTRACT

Vagus nerve stimulation of afferents is used as an adjunctive treatment for drug-resistant epilepsy and depression. In addition, anti-inflammatory properties of vagus nerve stimulation have been reported in various experimental models of inflammation but not in colitis. These effects are thought to be mediated via peripheral release of acetylcholine from the vagus and subsequent activation of macrophages. Our aim was to evaluate in rats the anti-inflammatory effects of chronic vagus nerve stimulation on colonic inflammation. Colitis was induced by intracolonic instillation of trinitrobenzene sulfonic acid. Vagus nerve stimulation (left cervical) was performed in freely moving animals 3 h per day for five consecutive days. Assessment of colonic inflammation was obtained using physiological (e.g. body weight, temperature and locomotor activity) parameters, macroscopical (area of lesions), histological, and biological parameters (e.g. myeloperoxidase activity, cytokine and cytokine-related mRNAs), both at the level of the damaged colon and the colon immediately above. A global multivariate index of colitis was then generated for a better characterization of colonic inflammation. Vagus nerve stimulation reduced the degree of body weight loss and inflammatory markers as observed above the lesion by histological score and myeloperoxidase quantification. This anti-inflammatory effect was also demonstrated by the improvement of the multivariate index of colitis. These data argue for an anti-inflammatory role of vagus nerve stimulation chronically performed in freely moving rats with colitis and provide potential therapeutic applications for patients with inflammatory bowel diseases.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The vagus nerve contains sensory and motor components that control organ functions as varied as heart rate and digestion (Foley and DuBois, 1937). Vagus nerve stimulation (VNS) of afferent fibers is an approved treatment for epilepsy and depression, but the precise mechanism of action of VNS on the central nervous system is still unknown (Groves and Brown, 2005). In addition to controlling physiological functions through efferent fibers, a new cholinergic anti-inflammatory pathway has been described by Tracey (2002), providing a way for the brain to regulate the cytokine response in specific organs, such as the gut.

Inflammatory bowel diseases (IBD) include two main types of chronic inflammation affecting the gastrointestinal tract, ulcerative colitis and Crohn's disease. The treatment of IBD is only suspensive and represented by aminosalicylates, steroids, immunosuppressors, and biological therapies, e.g. anti-tumor necrosis factor (TNF) agents (Baumgart and Sandborn, 2007). A growing body of evidence suggests the existence of autonomic dysfunctions in IBD patients (Taylor and Keely, 2007), whatever the severity of symptoms and even during remission. Using heart rate variability as a marker of the sympatho-vagal balance, we have recently demonstrated that cardiac neural control is altered according to the disease depending on the psychological adjustment of the patients to their disease (Pellissier et al., 2010).

Neuroimmunomodulation in IBD remains a challenging theory through the influence of the brain-gut axis on intestinal inflammation and its perpetuation (Anton and Shanahan, 1998; Paschos et al., 2009). Circulating pro-inflammatory cytokines, interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and TNF, released from the intestinal mucosa are able to communicate with the brain through neural and humoral pathways (Dantzer et al., 2000). The neural pathway involves vagus nerve

\* Corresponding author. Stress et Interactions Neuro-Digestives (SIND, EA3744), Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), INSERM U836 UJF-CEA-CHU, Université Joseph Fourier, Site Santé La Tronche, BP170, 38042 Grenoble Cedex 09, France. Tel: +33 4 76 76 55 97; fax: +33 4 76 76 52 97.

E-mail address: [BBonaz@chu-grenoble.fr](mailto:BBonaz@chu-grenoble.fr) (B. Bonaz).

<sup>1</sup> The first two authors contributed equally to this work.



afferents locally stimulated by cytokines to activate the hypothalamic pituitary adrenal axis (Dantzer et al., 2000). 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 vagus nerve, interacts with  $\alpha$ -7 nicotinic ACh receptor ( $\alpha$ 7nAChR) of human macrophages to inhibit the release of pro-inflammatory cytokines such as TNF (Pavlov et al., 2003; Tracey, 2009; van der Zanden et al., 2009b). Smoking (i.e. nicotine) is a risk factor for IBD, aggravating Crohn's disease while having beneficial effects on ulcerative colitis (Tobin et al., 1987).

The anti-inflammatory role of the cholinergic pathway has been demonstrated in models of high-fat enteral nutrition on hemorrhagic shock-induced TNF release (Luyer et al., 2005), pancreatitis (van Westerloo et al., 2006), dextran sulfate sodium colitis (Ghia et al., 2006), trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) colitis (Bai et al., 2007) and postoperative ileus (The et al., 2007). This effect is produced either pharmacologically, using selective  $\alpha$ 7nAChR agonists (de Jonge and Ulloa, 2007; The et al., 2007; van Westerloo et al., 2006), central injections of anti-inflammatory agent CNI-1493 (Borovikova et al., 2000), peripheral or central cholinesterase inhibitors (Miceli and Jacobson, 2003; Pavlov et al., 2009), by vagotomy (Ghia et al., 2006) or through acute VNS (de Jonge et al., 2005), but the effect of VNS has never been studied in experimental colitis. In addition, most of these studies were performed in anesthetized animals.

VNS has been approved in humans by the Food and Drug Administration (FDA), a U.S. government agency, as a therapy for treatment-resistant epilepsy or depression (Milby et al., 2008) through high-frequency stimulation (20–30 Hz) of vagal afferents (Milby et al., 2008) while the use of low-frequency stimulation (1–10 Hz) (Bernik et al., 2002b; Borovikova et al., 2000; de Jonge et al., 2005) in animal models is thought to activate vagal efferents i.e. the cholinergic anti-inflammatory pathway through  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors (de Jonge and Ulloa, 2007).

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 performed VNS in freely moving animals chronically implanted with an electrode on the left cervical vagus nerve, using stimulation parameters known to activate vagal efferents, and studied the effect of VNS on TNBS colitis using classical markers of inflammation and a multivariate index of colitis.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

Adult male Sprague–Dawley rats (Janvier, Le Genest St Isle, France) were individually housed in controlled conditions: temperature,  $22 \pm 1$  °C and 12:12 h light–dark cycle (lights on at 08:00 and lights off at 20:00). Rats were allowed to acclimate to these conditions for at least 7 days before inclusion in experiments. Animals were weighed before induction of colitis and at the end of the VNS experiment. Procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive and guidelines of the local ethical animal research committee.

### 2.2. Surgical procedures

Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (125 mg/kg intramuscularly, i.m.) and acepromazine (0.15 mg/kg i.m.). A telemetric device (Physiotel TA10TAF40; Data Sciences International, MN, USA) was implanted into the abdominal cavity to record body temperature and locomotor activity (Chevrier et al., 2006). Then, the left cervical vagus nerve was identified and an electrode (Cyberonics, Lyon, France) was gently wrapped around the vagus nerve and carotid (Handforth and Krahl, 2001) 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).

### 2.3. Induction of colitis

Colitis induction was based on the classical model of TNBS colitis, developed by Morris et al. (1989). Twelve days after surgery, rats deprived of food for at least 12 h were anesthetized (50 mg/kg ketamine and 0.05 mg/kg acepromazine i.m.). A 7.5-cm 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). To ensure the retention of TNBS within the colon, rats were maintained in the head-down position following intracolonic administration. Controls received saline.

### 2.4. Vagus nerve stimulation

VNS was performed in freely moving animals 3 h per day (9:00 am to 12:00 am) for 5 days, with stimulation parameters (1 mA, 5 Hz, pulse width of 500  $\mu$ s; 10 s ON, 90 s OFF; continuous cycle) adapted from previous studies (Bernik et al., 2002b; Naritoku et al., 1995). Stimulation frequency is in the range of normal nerve traffic in the vagus nerve (Fogel et al., 1996). The first day, VNS started 1 h before intracolonic instillation. Control rats implanted according to the same procedure were not stimulated.

### 2.5. 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).

### 2.6. Assessment of colonic inflammation

Five days after instillation, rats were deeply anesthetized (ketamine 150 mg/kg and acepromazine 0.15 mg/kg, i.m.) and transcardially perfused with saline. The distal colon (8 cm from the anus) was isolated, opened longitudinally and photographed for quantification of colonic damage by determining three areas (normal, moderate and severe inflammation) using colorimetric evaluation (Visilog 6 software, NOESIS, Crolles, France). Colonic samples were then separated into two parts: the damaged colon with macroscopically necrotic lesions and the part immediately above the lesion (without macroscopic lesion), i.e. a 1-cm-long piece proximal to the most anterior aspect of the macroscopically observed damage. Samples of lesion tissue and immediately adjacent tissue were cut longitudinally in equal parts for histological analysis, myeloperoxidase (MPO) assay, and mRNA quantification.

### 2.7. Histological analysis

Colonic sections (5  $\mu$ m) were stained with H&E and blindly evaluated (Vetopath Laboratory, Sofia-Antipolis, France). Histological parameters considered for semi-quantitative grading of colonic inflammatory lesions were: epithelial damage (erosions, ulcers, necrosis), inflammatory changes (infiltration of mono and polymorphonuclear cells, vascular changes) and distribution of lesions (focal, diffuse, transmural). A score distinguishing five major grades was generated: 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), and grade IV (severe acute inflammation with transmural necrosis) (Geboes et al., 1999).

### 2.8. Myeloperoxidase quantification

Colonic samples were homogenised in PBS-EDTA (5 mM) buffer (pH 7.3) using FastPrep-24 Instrument Device system (Lysing matrix D, FastPrep, Qbiogen, Illkirch, France) and quantified for MPO concentration by ELISA kit (HK210, Hycult Biotechnology, Uden, the Netherlands). MPO concentration of samples was expressed as ng/mg protein.

### 2.9. Quantification of cytokine (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6) and cytokine-related (ICAM1, NF $\kappa$ B, SOCS3, TBX21) mRNAs

#### 2.9.1. 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 UI).

#### 2.9.2. 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 phosphoribosyltransferase (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 (Schmittgen and Livak, 2008) with efficiency correction (Pfaffl, 2001) using the geometric average of three internally validated control genes [Cyclophilin A (CycA), ARBP, HPRT] (Vandesompele et al., 2002). Therefore, ARBP, CycA, and HPRT were used for normalization.

#### 2.9.3. Primer design

Primer design, optimization and specificity checking were done as described previously (Peinnequin et al., 2004). 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: NM\_012675. IL-6 (GenBank NM\_012589) primers present LNA-substitutions (N<sup>L</sup>) as described previously (Malgoire et al., 2007).

### 2.10. Multivariate index of colitis

All statistical analyses were performed using Statistica software (Statsoft-France, Maison-Alfort, France).

MPO, body weight, and histological score of colitis are basic parameters currently studied for the characterization of colitis but many other parameters are thought to be markers of colitis severity and of inflammation process: means of body temperature and locomotor activity during the two dark periods, geometric means of damaged areas, major cytokines and cytokines associated mRNAs quantified in the two areas (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, ICAM1, NF $\kappa$ B, SOCS3, TBX21). To characterize the inflammatory profile by a unique index, we performed a discriminant analysis including all these parameters. Discriminant analysis is a multivariate analysis that allows a better

characterization of the inflammatory profile in providing a weighted (canonical coefficients) linear combination of parameters.

Discriminant analysis was first performed on noVNS/saline (controls) and noVNS/TNBS groups in order to identify the parameters that best discriminated between experimental colitis and controls. 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 a general weighted score for colitis inflammation for each rat. Discriminant score was obtained by multiplying the coefficient by the value of measured parameters. The higher the absolute value of the coefficient was, the better was its association to colitis. The inflammatory index was then used to test the effects of VNS between noVNS/TNBS and VNS/TNBS groups.

### 2.11. Statistical analysis

We used ANOVA for repeated measures for analysis of telemetric data and, when appropriate, a Bonferroni post hoc test was performed for two by two comparisons.

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

## 3. Results

### 3.1. Effects of VNS on circadian body temperature after colitis induction

Baseline circadian temperatures were similar for the 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 12 h after instillation in both control and VNS/saline groups (Fig. 1). In contrast, rats with colitis presented a disruption in normal thermoregulation which started during the first night after TNBS instillation. During this period, noVNS/TNBS-injected rats exhibited a significant hypothermia ( $-0.9 \pm 0.1$  °C,  $p < 0.05$  vs. controls) while they displayed no change of body temperature during the light period. No change was observed during the night in VNS/TNBS animals compared to the noVNS/TNBS group (Fig. 1). The same effect was reported during the following day (day 2; data not shown).

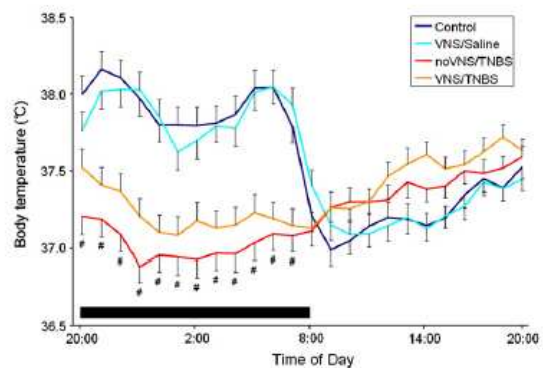


Fig. 1. Effect of VNS on 24-h body temperature evolution 12 h after colonic instillation of saline or TNBS: rats with colitis (noVNS/TNBS, red curve) presented a disruption in normal thermoregulation occurring as of the first night following TNBS instillation associated with significant hypothermia ( $-0.9 \pm 0.1$  °C) compared to controls (blue curves) ( $\# p < 0.05$ , ANOVA for repeated measures and Bonferroni post hoc test for two by two comparisons). Bar indicates the dark period ( $n \geq 13$ ).



3.2. Effect of VNS on classical evaluation of colitis

3.2.1. Body weight loss

A significant weight loss, expressed as the percentage of body weight change between the 1st and 5th day of VNS, was observed in noVNS/TNBS ( $-4.1 \pm 1.1\%$ ) compared to the control group ( $14.5 \pm 1.3\%$ ) ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 2). In the VNS/TNBS group, the decrease of body weight was significantly lower ( $-0.3 \pm 1.5\%$ ,  $p = 0.04$ ) compared to no VNS/TNBS animals (Fig. 2).

3.2.2. Macroscopic assessment

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

3.2.3. Histological assessment

No histological damage was observed in saline-injected animals with or without VNS (grade 0) (Fig. 3A, Table 1). TNBS induced mucosal lesions: one grade 0 and two grade II above the lesion (Fig. 3B, Table 1) and one grade II and two grade IV in the lesion (Fig. 3C, Table 1). Histological scores in the lesion were not modified by VNS (one grade I and two grades IV) (Fig. 3C, Table 1), while colonic tissue above the lesion was relatively protected by VNS and showed a lower degree of inflammation (two grades 0 and one grade I) (Fig. 3B, Table 1).

3.2.4. Myeloperoxidase quantification

TNBS induced a significant increase of MPO concentration both at the level of macroscopic colitis and just above the lesion ( $1,426.6 \pm 119.4$  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) (Fig. 4). Compared to noVNS/TNBS, VNS/TNBS animals presented a decrease of MPO concentration which was significant only at the level of the colon immediately above the lesion ( $9.5 \pm 4.2$  ng/mg protein versus  $23.9 \pm 6.0$  ng/mg protein,  $p = 0.03$ ) (Fig. 4).

3.3. Effect of VNS on levels of cytokine mRNAs in animals without colitis

A significant decrease of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNAs was observed in VNS/saline group compared to control (respectively  $73.5 \pm 6.9\%$  and  $79.8 \pm 8.8\%$  of control group's levels,  $p < 0.05$ ) (Fig. 5).

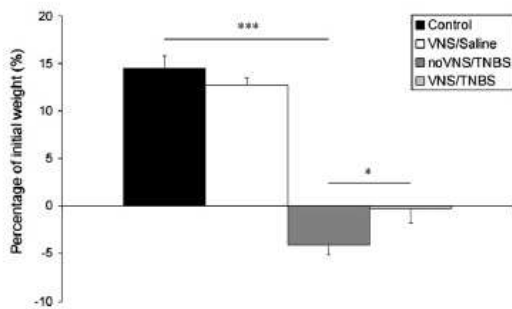


Fig. 2. Effect of VNS on body weight change 5 days after colonic instillation of saline or TNBS: stimulated saline group (VNS/saline) was not significantly different compared to the control group ( $12.7 \pm 0.7\%$  vs.  $14.5 \pm 1.3\%$ ). A significant body weight loss ( $-4.1 \pm 1.1\%$ ,  $p < 0.0001$ ) was observed in the nonstimulated colitis group (noVNS/TNBS) compared to control group. The VNS/TNBS group showed significantly less reduction in body weight ( $-0.3 \pm 1.5\%$ ,  $p = 0.04$ ) compared to nonstimulated animals (noVNS/TNBS).  $n \geq 12$ ; \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ ; Mann-Whitney test.

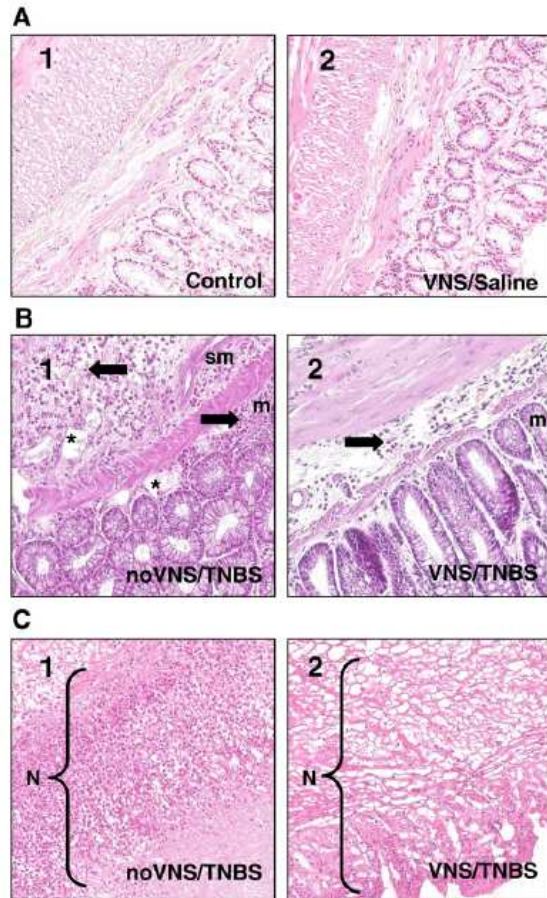


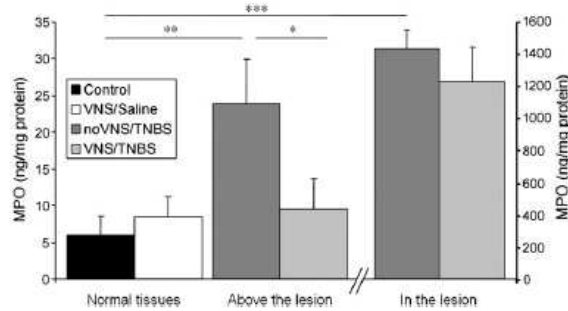
Fig. 3. Effect of VNS on histological staining of representative colons 5 days after colonic instillation of saline or TNBS. Microscopic photographs of colonic samples, (A) in normal tissues: A1 and 2; (B) above the lesion: B1) grade II [-: capillary congestion; ->: interstitial polymorphic inflammatory infiltrate diffuse in the mucosa (m) and submucosa (sm); B2) grade I (mild, focal inflammatory infiltrate); (C) in the lesion: C1 and 2: transmural necrosis (N).

Table 1  
Grading of histological lesions on microscopic sections of the colon.

	Above the lesion	In the lesion
Control	0 0 0	0 0 0
VNS/saline	0 0 0	0 0 0
noVNS/TNBS	0 II II	II IV IV
VNS/TNBS	0 0 I	I IV IV

Effect of VNS on histological staining of representative colons 5 days after colonic instillation of saline or TNBS: 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 by comparison to noVNS/TNBS animals. No change was observed in the lesion both in noVNS/TNBS and VNS/TNBS animals ( $n = 3$ ).





**Fig. 4.** Effect of VNS on MPO quantification (ng/mg protein) in the colon. TNBS induced a significant increase of MPO both at the level of the lesion and just above (\*\*  $p < 0.001$  and \*\*  $p < 0.008$ , respectively). VNS/TNBS animals presented a decrease of MPO concentration which was significant above the lesion (\*  $p < 0.05$ ;  $n \geq 7$ , Mann–Whitney test).

#### 3.4. Effect of VNS on levels of cytokine mRNAs after colitis induction

TNBS induced a significant increase of all studied mRNAs in the lesion compared to the control group ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 5). VNS induced no change of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM1 and IL-6 mRNA levels in the lesion as well as TNF $\alpha$  and ICAM1 mRNAs above the lesion.

#### 3.5. Effect of VNS on the multivariate index of colitis

Table 2 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;  $F_{\text{approx}}(17.7) = 7.814$ ;  $p < 0.0051$ ). According to the standardized coefficient (SC), some of these parameters were more particularly associated with the inflammatory process in the lesion, such as IL-6 (SC: 4.027) while some parameters such as the locomotor activity (SC: 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,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 6). VNS induced a significant decrease ( $p < 0.001$ ) of the same multivariate index of colitis (all previous parameters included) compared to noVNS/TNBS rats ( $3.49 \pm 1.98$  RU) (Fig. 6).

## 4. Discussion

The role of the vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation has been recently reviewed (Van Der Zanden et al., 2009a). So far, all studies investigating the anti-inflammatory effect of VNS were performed acutely in anesthetized animals and the frequency range commonly used for this purpose was 5–10 Hz (Bernik et al., 2002b; Naritoku et al., 1995; Tracey, 2007). The originality of our experiments was to perform VNS on unanesthetized animals and, to our knowledge, this is the first study on the effects of VNS on the digestive tract in chronically implanted freely moving animals. We chose to stimulate only the left vagus nerve to minimize the effects on heart rate (Hotta et al., 2009), this nervous branch selectively innervates the atrio-ventricular node (McDowall R.J.S. et al., 1956). For the 5 Hz frequency, we also observed no change in behaviour of awakened or sleeping rats. A low-frequency range of stimulation (1–5 Hz) was classically used to obtain a peripheral anti-inflammatory effect through vagal efferents (Bernik et al., 2002a) (Borovikova et al., 2000) but vagal afferents may also be activated. For this purpose, we have recently provided the first fMRI study of VNS performed in rodents with low-frequency stimulation (i.e. 5 Hz). Highly significant VNS-related deactivations were found in large portions of the brain and particularly in the nucleus tractus solitarius which is the first

central relay of vagal afferents (Reyt et al., 2010). Consequently, both vagal afferents and efferents are involved by VNS.

The rat model of colonic inflammation was first developed by Morris et al. (1989) using intra-luminal instillation of TNBS. In our experiments, the choice to perform VNS for 5 days was based on the work of Miceli and Jacobson (2003) who used a pharmacological approach to the cholinergic anti-inflammatory pathway using acetylcholinesterase inhibitors and reported a significant increase in the macroscopic colonic damage score on day 5 following induction of colitis. This is also the time required to obtain an acute inflammatory response with transmural inflammation (Miceli and Jacobson, 2003) (Alex et al., 2009) (Morris et al., 1989).

Our results indicate that VNS has a protective effect on colitis-induced weight loss, a classical parameter of colitis in humans and animals (Ballinger et al., 2000; Morris et al., 1989; Rigaud et al., 1994). In our experimental conditions, with the lowest dose of TNBS (10 mg/rat) to induce colitis (Morris et al., 1989), a 4% weight loss was observed which was reduced significantly to only 0.3% by VNS.

Another novel aspect of our study was to perform histological, biochemical, and molecular assessments in two different areas: the macroscopic damaged colon (lesion) and the area immediately above the lesion. Indeed, it is expected that the area above the lesion may be a key target for VNS therapy, i.e. to have a preventive effect or to limit the extension of the lesion. Qualitative histological evaluation supports the different effects of colitis in both areas with previously described modifications (Miceli and Jacobson, 2003; Morris et al., 1989; Porcher et al., 2004), while no macroscopic and microscopic lesions were observed in saline-treated animals. Interestingly, VNS/TNBS rats had less inflammatory infiltrate immediately above the lesion while VNS caused only a slight reduction in inflammatory infiltrate in the lesion compared to noVNS/TNBS. This argues for a major efficiency of VNS on less damaged tissues in our experimental conditions. This could be explained by the fact that the lesion is represented by damaged and necrotic cells with a poor response to therapeutics. These histological results were further supported by MPO quantification. MPO is an enzyme predominantly found in neutrophils and is currently used as a quantitative index of intestinal inflammation (Bradley et al., 1982). Previous studies have reported a statistically significant increase of MPO in colonic tissue, but without any distinction between lesion and adjacent regions (Ghia et al., 2006; Miceli and Jacobson, 2003). In our experiments, TNBS induced a statistically significant 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 reinforces our hypothesis that VNS therapy could be of interest for the treatment of mild colitis but also to prevent extension of the lesion and relapse.

Concerning circadian rhythms, TNBS classically induced a sickness response characterized by a disruption of rhythms with a lower body temperature during the dark period and a mild fever during the light period (Boisse et al., 2003). We saw the same effects on non-stimulated animals, 12 h after TNBS instillation, with a significant hypothermia during the dark period. It is well known that TNF $\alpha$  is transiently increased after TNBS instillation (Tateishi et al., 1997). In our experimental conditions, an increase of TNF in colonic tissues started 90 min after TNBS instillation, with a peak at 3 h and then values remained elevated until the 4th day (data not shown). It has been reported that the first response of increased levels of TNF was hypothermia (Tollner et al., 2000). Interestingly, in our results, a partial but nonsignificant inhibition of hypothermia was observed in the stimulated group during the same period; thus this effect could be related to the anti-TNF effect of VNS.

Inflammation is a complex, multi-scale biological response required for repair and regeneration after tissue injury. Due to the complexity of delayed inflammation kinetics, a global assessment

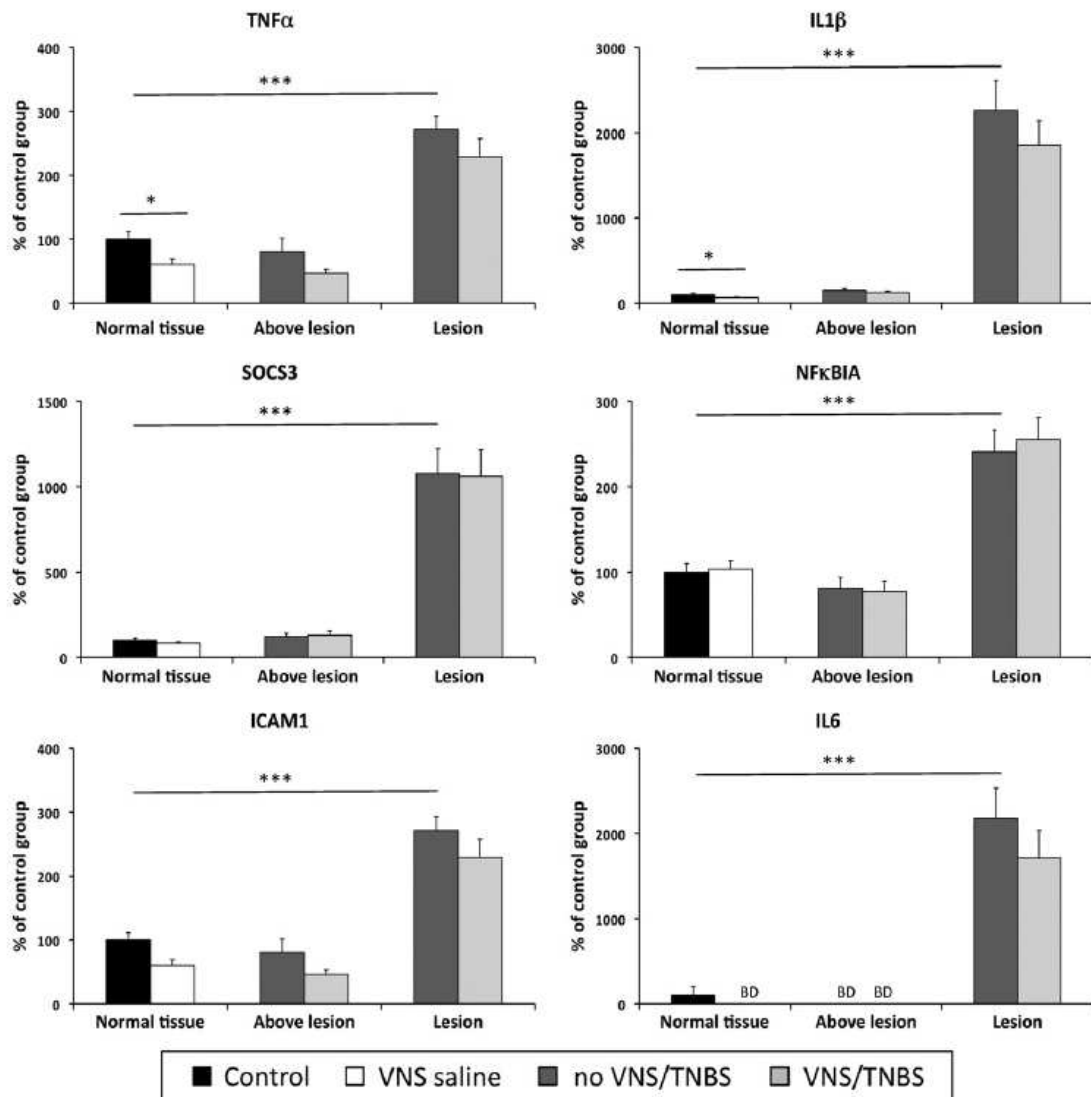


Fig. 5. Effect of VNS on TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , SOCS3, NF $\kappa$ BIA, ICAM1, and IL-6 mRNA levels in colonic tissues. TNBS induced a significant increase of all studied mRNAs in the lesion compared to the control group (\*\* $p < 0.0001$ ). VNS induced significant decreases of both TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA levels in normal tissues (\* $p < 0.05$ ,  $n \geq 12$ , Mann-Whitney test). BD: below the lower standard detection.

seems more appropriate to consider all biological interactions (Vodovotz et al., 2008). Hence, 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). These parameters allowed us to distinguish control and TNBS animals in non-stimulated conditions using a multivariate index of colitis. Using this discriminant analysis, a significant increase of this inflammatory index was observed in the noVNS/TNBS group, while VNS significantly decreased this index by approximately three times in VNS/TNBS (Fig. 6). In addition, values of standardized coefficients (range, 0.093–4.027) allowed an evaluation of the significance of each parameter in the TNBS colitis model. Among the five most important parameters (i.e. high values, Table 2) characterizing the inflammation, three of

them (IL-1beta, IL-6 and TNF alpha mRNAs) were decreased by VNS treatment (Fig. 5). Although the variation of these mRNA cytokine parameters were individually nonsignificant after VNS, the effect of the stimulation on chronic inflammatory response could be related when these parameters were combined in a multivariate analysis. Expression of cytokine-related mRNA observed at day 5 is quite different than the inflammatory response as previously observed by Tateishi et al. (1997) at the protein level. This discrepancy could be explained by both differences between mRNA and protein kinetics and the higher sensitivity of mRNA assessments. TNBS colitis shares many of the clinical, histopathological, and immunological features of Crohn's disease which is characterized by an impairment of the Th1-Th17/Th2 inflammatory balance (Alex et al., 2009). TNF, a key cytokine in IBD, is necessary for both the initiation and perpetuation



of the Th1 response in TNBS colitis (Strober et al., 2002) and it is the most important parameter above the lesion in our study (Table 2).

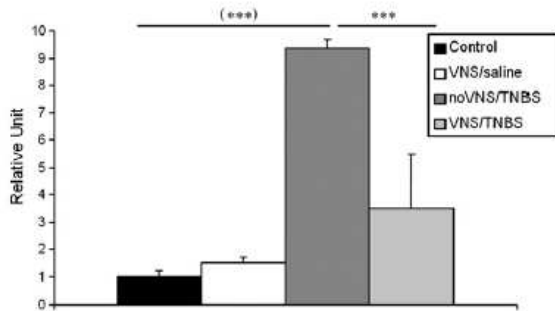
Interestingly, the decrease of TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  mRNAs on normal tissue in VNS/saline animals suggests the possibility of an anti-inflammatory effect on the basal level of cytokines.

It has been proposed that VNS improvement of postoperative ileus inflammation in rats was mediated by the macrophage nAChR (for review (Van Der Zanden et al., 2009a)). It has also been described that the vagus nerve plays an important role in lymphocyte trafficking (Antonica et al., 1996). Thus, VNS could potentially affect several types of immune cells, i.e. modulating CD4+ cell activity (Karimi et al., 2010). Mechanisms involved in this anti-inflammatory effect remain to be determined as for example i) the JAK2-STAT3 signalling pathway macrophage activation which has been described to be attenuated by VNS in a mouse model of surgery-induced inflammation (The et al., 2007), and ii) the role played by the spleen reported to be necessary in the modulation of inflammation by the vagus nerve (Huston et al., 2006; Rosas-Ballina et al., 2008). VNS may also affect intestinal permeability which is known to be increased in IBD, forming the basis of lower inflammation as presented in a nonlethal rat hemorrhagic shock model (Luyer et al., 2005).

The results of this study have clinical relevance. Indeed, because of its anti-inflammatory property, notably on the low damaged tissue, VNS should be of interest in the treatment of IBD (Bonaz, 2007), particularly in the case of mild colitis and/or in the prevention of recurrence. In addition, since overall intentional non-adherence is reported by 39% of IBD patients (Cervený et al., 2007), VNS therapy is of interest because it is independent of patient compliance.

#### Acknowledgements

Authors would like to acknowledge 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.



**Fig. 6.** Multivariate index of colitis obtained after discriminatory analysis applied on physiological parameters (locomotor activity, body temperature), quantification level of cytokine and cytokine-related mRNAs (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, SOCS3, NF $\kappa$ B, TBX21) above and in the lesion (relative unit) and mean of lesion areas for the four groups. In noVNS/TNBS animals, a significant increase of the multivariate index of colitis was observed compared to the control group (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ). A significant decrease (\*\*\*)  $p < 0.001$  of the multivariate index of colitis was observed in VNS/TNBS animals compared to noVNS/TNBS rats ( $n \geq 12$ ).

**Table 2**

Characterization of TNBS inflammatory response.

	Parameters	Standardized coefficients
1	IL-6 in the lesion	4.027
2	SOCS3 in the lesion	3.622
3	TNF $\alpha$ above the lesion	2.719
4	IL-1 $\beta$ in the lesion	2.201
5	NF $\kappa$ B in the lesion	2.091
6	NF $\kappa$ B above the lesion	1.820
7	Body temperature at day 1	1.735
8	Body temperature at day 2	1.726
9	ICAM1 above the lesion	1.641
10	ICAM1 in the lesion	1.068
11	Mean of lesion areas	1.041
12	IL-1 $\beta$ above the lesion	0.964
13	SOCS3 above the lesion	0.959
14	TNF $\alpha$ in the lesion	0.863
15	TBX21 in the lesion	0.569
16	Locomotion at day 2	0.432
17	Locomotion at day 1	0.093

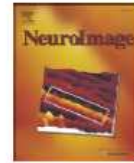
Characterization of TNBS inflammatory response: parameters in descending order are expressed by standardized coefficients; all studied parameters contribute to colitis and the model of multivariate index of colitis is significant (Lambda Wilk: 0.050; F approx (17.7) = 7.814;  $p < 0.0051$ ).

#### References

- Alex, P., Zachos, N.C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T.E., Conklin, L.S., Centola, M., Li, X., 2009. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 341–352.
- Anton, P.A., Shanahan, F., 1998. Neuroimmunomodulation in inflammatory bowel disease. How far from "bench" to "bedside"? *Ann. NY Acad. Sci.* 840, 723–734.
- Antonica, A., Ayroldi, E., Magni, F., Paolucci, N., 1996. Lymphocyte traffic changes induced by monolateral vagal denervation in mouse thymus and peripheral lymphoid organs. *J. Neuroimmunol.* 64, 115–122.
- Bai, A., Guo, Y., Lu, N., 2007. The effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway on experimental colitis. *Scand. J. Immunol.* 66, 538–545.
- Ballinger, A.B., Azoos, O., El-Haj, T., Poole, S., Farthing, M.J., 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.
- Baumgart, D.C., Sandborn, W.J., 2007. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369, 1641–1657.
- Bernik, T.R., Friedman, S.G., Ochani, M., DiRaimo, R., Susarla, S., Czura, C.J., Tracey, K.J., 2002a. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J. Vasc. Surg.* 36, 1231–1236.
- Bernik, T.R., Friedman, S.G., Ochani, M., DiRaimo, R., Ulloa, L., Yang, H., Sudan, S., Czura, C.J., Ivanova, S.M., Tracey, K.J., 2002b. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Exp. Med.* 195, 781–788.
- Boisse, L., Van Sickle, M.D., Sharkey, K.A., Pittman, Q.J., 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.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462.
- Bradley, P.P., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 60, 618–622.
- Cervený, P., Bortlik, M., Kubena, A., Vlcek, J., Lakatos, P.L., Lukas, M., 2007. Nonadherence in inflammatory bowel disease: results of factor analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 1244–1249.
- Chevrier, C., Bourdon, L., Ganini, F., 2006. Cosignaling of adenosine and adenosine triphosphate in hypobaric hypoxia-induced hypothermia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R595–600.
- Dantzer, R., Konsman, J.P., Bluthé, R.M., Kelley, K.W., 2000. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton. Neurosci.* 85, 60–65.
- de Jonge, W.J., Ulloa, L., 2007. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 151, 915–929.
- de Jonge, W.J., van der Zanden, E.P., The, F.O., Bijlsma, M.F., van Westerloo, D.J., Bennis, R.J., Berthoud, H.R., Uematsu, S., Akira, S., van den Wijngaard, R.M., Boeckstaens, G.E., 2005. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 6, 844–851.
- Fogel, R., Zhang, X., Renehan, W.E., 1996. Relationships between the morphology and function of gastric and intestinal distention-sensitive neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J. Comp. Neurol.* 364, 78–91.
- Foley, J.O., DuBois, F., 1937. Quantitative studies of the vagus nerve in the cat. I. The ratio of sensory to motor fibers. *J. Comp. Neurol.* 67, 49–67.
- Geboes, K., Desreumaux, P., Jouret, A., Ectors, N., Rutgeerts, P., Colombel, J.F., 1999. Histopathologic diagnosis of the activity of chronic inflammatory bowel disease. Evaluation of the effect of drug treatment. Use of histological scores. *Gastroentérol. Clin. Biol.* 23, 1062–1073.



- Ghia, J.E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E.F., Collins, S.M., 2006. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 131, 1122–1130.
- Groves, D.A., Brown, V.J., 2005. Vagal nerve stimulation: a review of its applications and potential mechanisms that mediate its clinical effects. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 493–500.
- Handforth, A., Krahl, S.E., 2001. Suppression of harmaline-induced tremor in rats by vagus nerve stimulation. *Mov. Disord.* 16, 84–88.
- Hotta, H., Lazar, J., Orman, R., Koizumi, K., Shiba, K., Kamran, H., Stewart, M., 2009. Vagus nerve stimulation-induced bradyarrhythmias in rats. *Auton. Neurosci.* 151, 98–105.
- Huston, J.M., Ochani, M., Rosas-Ballina, M., Liao, H., Ochani, K., Pavlov, V.A., Gallowitsch-Puerta, M., Ashok, M., Czura, C.J., Foxwell, B., Tracey, K.J., Ulloa, L., 2006. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J. Exp. Med.* 203, 1623–1628.
- Karimi, K., Bienenstock, J., Wang, L., Forsythe, P., 2010. The vagus nerve modulates CD4 + T cell activity. *Brain Behav. Immun.* 24, 316–323.
- Luyer, M.D., Greve, J.W., Hadfoune, M., Jacobs, J.A., Dejong, C.H., Buurman, W.A., 2005. Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve. *J. Exp. Med.* 202, 1023–1029.
- Malgoire, A., Banzet, S., Mouret, C., Bigard, A.X., Peinnequin, A., 2007. Quantification of low-expressed mRNA using 5' LNA-containing real-time PCR primers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 246–252.
- McDowall, R.J.S., Malcolmson, G.E., I., M., 1956. The control of the circulation of the blood. Dawson, London, p. 619.
- Miceli, P.C., Jacobson, K., 2003. Cholinergic pathways modulate experimental dinitrobenzene sulfonic acid colitis in rats. *Auton. Neurosci.* 105, 16–24.
- Milby, A.H., Halpern, C.H., Baltuch, G.H., 2008. Vagus nerve stimulation for epilepsy and depression. *Neurotherapeutics* 5, 75–85.
- Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., Wallace, J.L., 1989. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96, 795–803.
- Naritoku, D.K., Terry, W.J., Helfert, R.H., 1995. Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res.* 22, 53–62.
- Paschos, K.A., Kolios, G., Chatzaki, E., 2009. The corticotropin-releasing factor system in inflammatory bowel disease: prospects for new therapeutic approaches. *Drug Discov Today* 14, 713–720.
- Pavlov, V.A., Wang, H., Czura, C.J., Friedman, S.G., Tracey, K.J., 2003. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol. Med.* 9, 125–134.
- Pavlov, V.A., Parrish, W.R., Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Puerta, M., Ochani, K., Chavan, S., Al-Abed, Y., Tracey, K.J., 2009. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav. Immun.* 23, 41–45.
- 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., Dantzer, C., Canini, F., Mathieu, N., Bonaz, B., 2010. Psychological adjustment and autonomic disturbances in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 35, 653–662.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- 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.
- Reyt, S., Picq, C., Sinniger, V., Clarencon, D., Bonaz, B., David, O., 2010. Dynamic Causal Modelling and physiological confounds: a functional MRI study of vagus nerve stimulation. *Neuroimage* 52, 1456–1464.
- Rigaud, D., Angel, L.A., Cerf, M., Carduner, M.J., Melchior, J.C., 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.
- Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Parrish, W.R., Ochani, K., Harris, Y.T., Huston, J.M., Chavan, S., Tracey, K.J., 2008. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 11008–11013.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Strober, W., Fuss, I.J., Blumberg, R.S., 2002. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 495–549.
- 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.
- Taylor, C.T., Keely, S.J., 2007. The autonomic nervous system and inflammatory bowel disease. *Auton. Neurosci.* 133, 104–114.
- The, F.O., Boeckxstaens, G.E., Snoek, S.A., Cash, J.L., Bennink, R., Larosa, G.J., van den Wijngaard, R.M., Greaves, D.R., de Jonge, W.J., 2007. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 133, 1219–1228.
- Tobin, M.V., Logan, R.F., Langman, M.J., McConnell, R.B., Gilmore, I.T., 1987. Cigarette smoking and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 93, 316–321.
- Tollner, B., Roth, J., Storr, B., Martin, D., Voigt, K., Zeisberger, E., 2000. The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. *PLugers Arch* 440, 925–932.
- Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853–859.
- Tracey, K.J., 2007. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* 117, 289–296.
- Tracey, K.J., 2009. Reflex control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 418–428.
- Van Der Zanden, E.P., Boeckxstaens, G.E., de Jonge, W.J., 2009a. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 6–17.
- van der Zanden, E.P., Snoek, S.A., Heinsbroek, S.E., Stanisor, O.I., Verseijden, C., Boeckxstaens, G.E., Peppelenbosch, M.P., Greaves, D.R., Gordon, S., De Jonge, W.J., 2009b. Vagus nerve activity augments intestinal macrophage phagocytosis via nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 4\beta 2$ . *Gastroenterology* 137, 1029–1039, 1039.e1–4.
- van Westerloo, D.J., Giebelen, I.A., Florquin, S., Bruno, M.J., Larosa, G.J., Ulloa, L., Tracey, K.J., van der Poll, T., 2006. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology* 130, 1822–1830.
- 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., Csete, M., Bartels, J., Chang, S., An, G., 2008. Translational systems biology of inflammation. *PLoS Comput. Biol.* 4, e1000014.



## Dynamic Causal Modelling and physiological confounds: A functional MRI study of vagus nerve stimulation

Sébastien Rey<sup>a,d,1</sup>, Chloé Picq<sup>b,c,d,1</sup>, Valérie Sinniger<sup>b</sup>, Didier Clarençon<sup>b,c</sup>,  
Bruno Bonaz<sup>b,f</sup>, Olivier David<sup>a,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique, Inserm, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France

<sup>b</sup> Stress et Interactions Neuro-Digestives (SIND; EA3744), Inserm, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France

<sup>c</sup> Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Antenne de La Tronche, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, France

<sup>d</sup> Université Joseph Fourier, Grenoble, France

<sup>e</sup> Service de Neuroradiologie et Unité IRM, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France

<sup>f</sup> Clinique Universitaire d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 March 2010

Revised 23 April 2010

Accepted 7 May 2010

Available online 21 May 2010

### ABSTRACT

Dynamic Causal Modelling (DCM) has been proposed to estimate neuronal connectivity from functional magnetic resonance imaging (fMRI) using a biophysical model that links synaptic activity to hemodynamic processes. However, it is well known that fMRI is sensitive not only to neuronal activity, but also to many other psychophysiological responses which may be task-related, such as changes in cardio-respiratory activity. They are not explicitly taken into account in the generative models of DCM and their effects on estimated neuronal connectivity are not known. The main goal of this study was to report the face validity of DCM in the presence of strong physiological confounds that presumably cannot be corrected for, using an fMRI experiment of vagus nerve stimulation (VNS) performed in rats. First, a simple simulation was used to evaluate the principled ability of DCM to recover directed connectivity in the presence of a confounding factor. Second, we tested the experimental validity using measures of the BOLD correlates of left 5 Hz VNS. Because VNS mostly activates the central autonomic regulation system, fMRI signals were likely to represent both direct and indirect vascular responses to such activation. In addition to the inference of standard statistical parametric maps, DCM was thus used to estimate directed neural connectivity in a small brain network including the nucleus tractus solitarius (NTS) known to receive vagal afferents. Though blood pressure changes may constitute a major physiological confound in this dataset, model comparison of DCMs still allowed the identification of the NTS as the input station of the VNS pathway to the brain. Our study indicates that current developments of DCM are robust to psychophysiological responses to some extent, but does not exclude the need to develop specific models of brain – body interactions within the DCM framework to better estimate neuronal connectivity from fMRI time series.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Dynamic Causal Modelling (DCM) (Friston et al., 2003) has been proposed to estimate neuronal connectivity from functional magnetic resonance imaging (fMRI) time series weighted by the blood oxygen level dependent (BOLD) contrast. It is based on a generative model that links synaptic activity to BOLD time series using a hemodynamic model. Observation equations of the hemodynamic model transform the synaptic activity into a vasodilatory signal, cerebral blood flow, cerebral blood volume and deoxyhaemoglobin content that are combined together to give rise to the BOLD signal (Friston et al.,

2000). Synaptic activity amongst different brain regions of interest (ROI) is obtained using state equations that are differential equations derived directly from assumed intrinsic and extrinsic neuronal connectivity (see (Friston et al., 2003) for mathematical details). We have recently shown that estimating this hidden neuronal activity is crucial to identifying appropriate orientation of interactions from fMRI time series (David et al., 2008).

DCM has been used in humans to study several cognitive systems such as language (Mechelli et al., 2005), visuospatial attention (Siman-Tov et al., 2007) or face perception (Fairhall and Ishai, 2007). Furthermore, reproducibility of DCM results over scans within the same scan session has been found to be excellent in an experiment on emotional facial expressions (Schuyler et al., 2009). However, it is well known that BOLD fMRI is sensitive not only to task-related neuronal processes, but also to many physiological responses of the central autonomic regulation system (Cechetto and Shoemaker, 2009;

\* Corresponding author. Grenoble Institut des Neurosciences–Inserm U836, Chemin Fortuné Ferrini–Bât EJ Safra, 38700 La Tronche, France. Fax: +33 456520598.

E-mail address: [odavid@ujf-grenoble.fr](mailto:odavid@ujf-grenoble.fr) (O. David).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.



Saper, 2002), such as changes in blood pressure related to cardio-respiratory activity (Birn et al., 2006; Dagli et al., 1999; de Munck et al., 2008; Gray et al., 2009; Wise et al., 2004). If they are directly measured, they can be either removed from the data before any connectivity analysis, for instance using subspace projection, or incorporated explicitly in a generative model of the data, such as a DCM, on which connectivity inferences will be performed. When they are task-related however, these physiological responses are correlated to neuronal responses of interest and thus are difficult to remove during the preprocessing of data. Approaches based on partial correlation, such as partial Granger causality (Guo et al., 2008), then allow to model confounds as latent variables for improved estimation of causal relationships amongst measured time series. Because they are not explicitly taken into account in the generative models of the current release of DCM ([www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm8](http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm8), Wellcome Department of Imaging Neuroscience, University College London), the effects of task-related physiological confounds have rarely been considered when interpreting DCM results. The main goal of this study was to report the face validity of DCM for fMRI in the presence of strong physiological confounds that cannot be corrected for, because of lack of experimental measures or lack of differentiability between effects of interest and non interest, using an fMRI experiment of vagus nerve stimulation (VNS) performed in rats.

Although mechanisms of action of VNS remain poorly understood, VNS is used in humans for treatment-resistant depression and epilepsy (Ben Menachem, 2002; Marangell et al., 2007; Milby et al., 2008). It has also been proposed to use VNS as a modulator of intestinal inflammation through the cholinergic anti-inflammatory pathway (Bonaz, 2007; Van Der Zanden et al., 2009). On the one hand, effects observed on the central nervous system are mediated through vagal afferents (80% of VN fibres), which usually are intermittently stimulated at 30 Hz. On the other hand, VN efferent fibres (20%) provide parasympathetic innervation primarily to the lungs, heart, and gastrointestinal tract and have anti-inflammatory properties, i.e. the cholinergic anti-inflammatory pathway (Borovikova et al., 2000; Tracey, 2009). Current range frequency of VNS protocols for these purposes is 5–10 Hz (Bernik et al., 2002; Naritoku et al., 1995; Tracey, 2007).

Because the nucleus tractus solitarius (NTS), located in the brainstem, receives vagal afferent fibres, central effects of VNS are thought to be mediated through the numerous projections of the NTS into other brain regions. Neurochemical studies (Ben-Menachem et al., 1995; Hamberger et al., 1993; Krahl et al., 1998; Naritoku et al., 1995) suggested activation by VNS of the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus, the major sources of brain norepinephrine and serotonin respectively. This has been confirmed electrophysiologically by showing increases in neuronal firing rates in those structures after acute VNS (Groves et al., 2005) or after long-term stimulation treatment in rats (Dorr and Debonnel, 2006). In humans *in vivo*, central effects of VNS, usually performed at about 30 Hz, have been studied mostly using electroencephalography (EEG) (Marrosu et al., 2005), positron emission tomography (PET) and single photon emission computer tomography (SPECT) (see (Chae et al., 2003) for a review) and functional magnetic resonance imaging (fMRI) (Bohning et al., 2001; Dietrich et al., 2008; Liu et al., 2003; Lomarev et al., 2002; Nahas et al., 2007; Narayanan et al., 2002; Sucholeiki et al., 2002). Despite a significant variability in reported findings, activations in the medulla/brainstem, limbic regions (insula, anterior cingulate cortex, hippocampus, amygdala, and hypothalamus), thalamus, cerebellum, and periaqueductal grey (PAG) were most commonly observed. In animals, information about VNS mechanisms gathered from neuroimaging studies is scarce (Biraben et al., 2008; Dedeurwaerdere et al., 2005). Because of the modulatory properties of VNS on the central autonomic regulation system, the origins of BOLD effects observed during VNS might not only be glial and neuronal but also be strongly related to other physiological processes. The medullary nuclei targeted by VN indeed couple cardiac function to blood pressure and respiration, the fMRI correlates of which are detectable in humans

(Gray et al., 2009). VNS is thus an interesting experimental setup to investigate the behaviour of biophysical models used to analyse fMRI signals to detect neural effect, as proposed in DCM.

Here, we first used a simple simulation to evaluate the principle ability of DCM to recover directed connectivity in the presence of a confounding factor strongly correlated to the experimental design. Second, we tested the experimental validity of this approach using measures of the BOLD correlates of left 5 Hz VNS specifically acquired in Sprague-Dawley rats at 4.7 T. In Supplementary materials, we provide a series of control experiments (heart rate changes during 5 Hz VNS, fMRI of VNS in vagotomized rats, fMRI during ephedrine injection) to ascertain the presence in our dataset of neuronal and non neuronal effects, through the activation of the central autonomic regulation system. Interestingly, though changes in blood pressure or in heart rate may constitute a major physiological confound in this dataset (see Fig. S2 in Supplementary materials for experimental evidence of tight correlation between BOLD and heart rate), model comparison of families of DCMs still allowed the identification of the NTS as the input station of the VNS pathway to the brain.

## Materials and methods

### Animals

Adult male Sprague-Dawley rats (250–350 g) (Charles River, France) were housed in a controlled environment (12 h light/dark cycles, 20–22 °C) with food and water ad libitum. Animals were allowed a minimum of 7 days to adapt to housing conditions before any manipulation. All animals were treated according to guidelines approved by the European Ethics Committee (decree 86/609/CEE). Procedures were approved by the institutional animal welfare committees of the Grenoble Institute of Neuroscience, of the Institut de Recherche Biomédicale des Armées and of the legal French Ministry of Agriculture (authorization number 38 04 48).

A total number of 25 rats were used in this study. Eight animals were used for fMRI of VNS. In Supplementary materials, validation of VNS parameters was done on 6 rats; 4 animals underwent vagotomy and VNS fMRI; and 7 animals were used to measure ephedrine effects in fMRI.

### VNS surgery and parameters

Oxygen saturation and heart rate were monitored during surgery. Anaesthesia was induced with 5% isoflurane in air/oxygen mixture (8:2) and maintained during surgery at 2.5%. An incision was made over the ventral region of the neck. Then the left (or right for the first experiment comparing left and right VNS) VN and the carotid artery were isolated. A bipolar electrode (Cyberonics Inc., Webster, Texas, USA) was gently wrapped around the pack and connected to a stimulation chain: S88 stimulator, SIU5 isolation unit, CCU1 constant current unit (Grass Technologies, Astro-Med, RI, US). VNS was performed using biphasic pulses with the following parameters: 1 mA, 5 Hz, 500  $\mu$ s pulse width and cycle of 9 s ON/51 s OFF.

### Animal preparation for fMRI

Immediately after electrode implantation, a bolus of 0.5 mL/kg dexmedetomidine (Dexdomitor, Pfizer) was administered in the hind limb muscle on a 1 minute basis, and isoflurane was discontinued to maximize the specificity of BOLD activations (Weber et al., 2006). Animals were then placed in a rat holder (Bruker, Germany) and fixed with tooth bar and ear plugs to prevent any motion. Respiratory rate, temperature and heart rate were visually monitored throughout fMRI experiments. ECG was recorded using two gold plated electrodes and conductive gel fixed with micropore surgical tape placed on the right forelimb and the left hind limb. Experiments where animals presented



abnormal respiratory patterns were discontinued and these animals were removed from the study. Body temperature was maintained by a water-circulating heating-pad. All physiological measures were done with a MR-compatible small animal monitoring and gating system (Model 1025, SA Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA). The electrode was connected to the stimulator, and animals were inserted in the magnet. Animals were freely breathing an air/O<sub>2</sub> mixture (9:1) during fMRI experiments that lasted no longer than 60 minutes. At the end of fMRI experiments, animals were anesthetized with 2.5% isoflurane in air/O<sub>2</sub> mixture during removal of electrode. They were then euthanized with an intracardiac injection of Pentobarbital (Dolethal®; 200 mg/kg).

#### MR parameters

fMRI experiments were performed on a 4.7 T Bruker Avance III horizontal animal scanner, equipped with a 21 cm shielded gradient system (600 mT/m). Radiofrequency transmission was achieved with a 12 cm diameter volume coil, and the resonance signal was received with a surface coil placed over the head of the animal to allow an optimal recording of the brain and brainstem. Both coils were actively decoupled from each other.

FLASH pilot slices in three directions were acquired to position the animal in the magnet with the plane of the interaural line at the magnet center. A field map was then acquired, and shimming on whole brain was performed using MapShim (Bruker). Final shim was within 50 Hz on the entire brain for each animal. Anatomical images were acquired for brain normalization using a RARE sequence: TE = 13.125 ms; effective 52.5 ms; TR = 5800 ms; RARE factor = 8; acquisition time = 3 min 30 s.

Once all physiological parameters were stabilized, three fMRI sessions of 10 min duration each were acquired. BOLD signals were obtained using coronal multi-slice gradient-echo EPI with the following parameters: TE = 30 ms (echo position 33%, no zero-filling); TR = 3 s; BW = 200 kHz; flip angle 75; 25 consecutive slices of 1 mm thickness; FOV = 25.6 × 25.6 mm; matrix of 64 × 64 pixels, allowing a spatial resolution of 0.4 × 0.4 × 1 mm.

A standard block design was used for VNS, alternating ON and OFF periods expressed in scans as follows: 10 OFF + 9 × [3 ON + 17 OFF] + 3 ON + 7 OFF. Duration of each session was 10 min. Animals were allowed to rest for at least 7 minutes between two successive sessions.

#### fMRI data analysis

Standard fMRI data analysis was done using SPM5 ([www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm](http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm), Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, Functional Imaging Laboratory, London, UK). Some routines of this software were adapted to rat imaging in accordance with (Schweinhart et al., (2003)). DCM analyses were performed using SPM8.

#### Preprocessing

For each session, EPI volumes were first realigned to account for motion correction. Then all images were normalised to a template with coordinates chosen according to the rat atlas of Paxinos and Watson, with the origin at the bregma (Paxinos and Watson, 1997). Practically, we used the T2 template kindly provided by Schweinhart et al., who have provided useful guidelines to construct specific small animal templates on any MR system (Schweinhart et al., 2003). Normalised images were resampled to reach an isotropic spatial resolution of 0.4 mm. Finally, normalised EPI images were smoothed with a Gaussian kernel of 0.8 mm FWHM, and detrended using a high-pass filter based on the discrete cosine transform (standard cutoff of 1/128 s).

#### Statistical maps of BOLD changes

Statistical analysis of BOLD signals was done on smoothed, normalised and realigned EPI images. The regressor of interest was

obtained by convolving the VNS paradigm with the canonical hemodynamic response function provided in SPM5. For each animal, maps of the *t*-statistic of activations were obtained by correlating the high-pass filtered time series of each voxel with the regressor of interest using a standard first-level statistical design (Friston et al., 2005). Activations at the group level were obtained using a fixed-effect analysis following guidelines provided in (Friston et al., (1999)). The decision to perform a fixed-effect analysis was based (i) on the reduced number of animals in each condition, which was too small to perform a random-effect analysis, and (ii) on the good reproducibility between animals of the activation patterns.

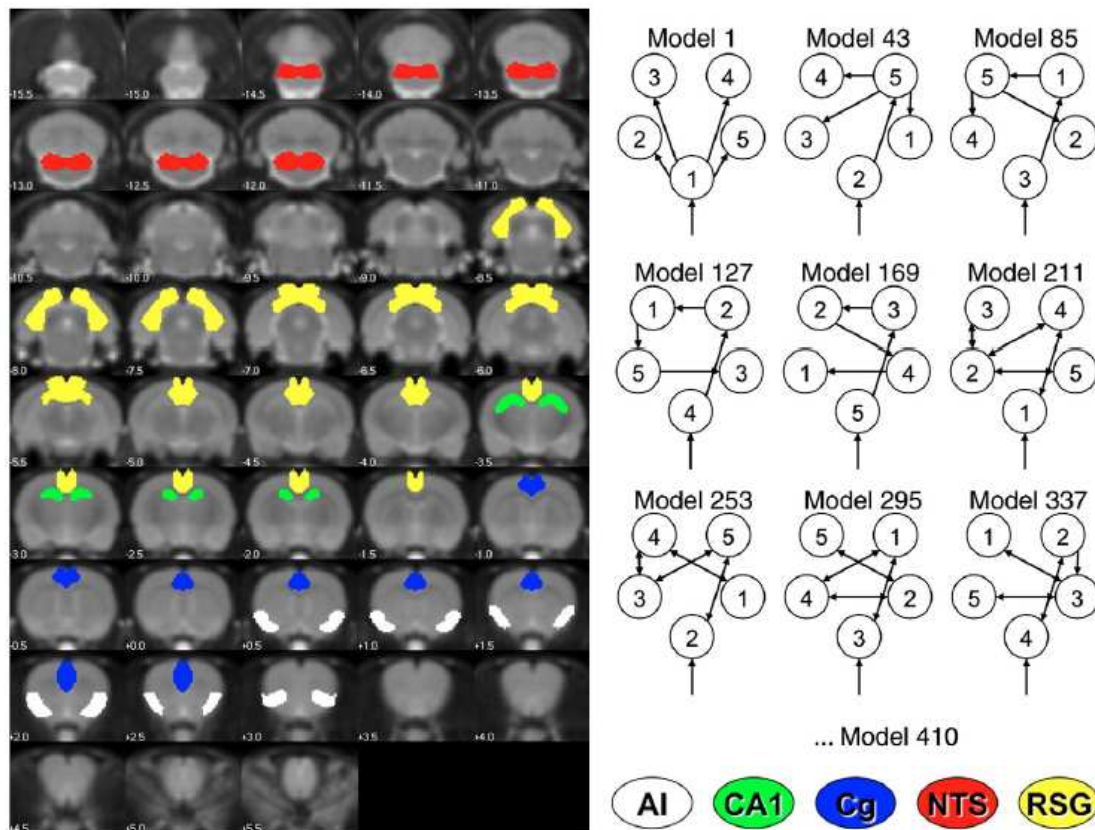
#### Dynamic Causal Modelling

In DCM for fMRI (Friston et al., 2003), a bilinear neuronal state equation specifies the connectivity between brain regions. The synaptic activity is then transformed into BOLD signals using a hemodynamic model. Knowing the data and the stimulus input (VNS paradigm), DCM proceeds to a conjoint estimation, from the measured BOLD time series, of the neuronal connectivity and of the hemodynamic parameters. The evidence of a dynamic causal model is defined by its marginal likelihood obtained after model optimisation (Penny et al., 2004). Comparing competing models can thus readily be performed by comparing the model evidence (the most plausible model is the one with the largest evidence). Here, the model-log evidence was approximated by the model negative free energy. The free energy is the quantity (objective function) optimised by variational Bayes methods implemented in SPM8 for DCM (Friston et al., 2007). It provides a bound on the log-evidence for any model (exact for linear models). Assuming each dataset is independent of the others and that only one model underlies brain responses, the log-evidence at the group level in a fixed-effect (FFX) analysis is simply obtained by adding the log-evidence of each session (Garrido et al., 2007). To diminish the sensitivity to outliers, which may be important in small group samples, and to the possibility that various brains react differently to the same stimulus, a methodology for random-effect (RFX) analysis of group model evidences has recently been proposed (Stephan et al., 2009). We performed both FFX and RFX analyses on actual data for comparing group evidence using DCM code as implemented in SPM8.

When many models are compared together, finding “the best model” may be inadequate because of the large number of experimental factors and modelling approximations that remain insufficiently controlled to detect small differences amongst models. To overcome this shortcoming, it has been proposed very recently to combine family level inference and Bayesian model averaging within families (Penny et al., 2010). Family level inference indeed removes uncertainty about aspects of model structure other than the characteristic of interest. Here, we tested whether DCM was able to recover two aspects from known neuroanatomy: (i) the NTS receives vagal afferents; and (ii) interregional connectivity is largely bidirectional.

To estimate whether VNS activations could be explained by propagation of NTS neural activity, after receiving all vagal afferents, the time series of deactivated regions by VNS were first extracted. Second, according to observed deactivations, five ROIs were delineated from the rat atlas of (Paxinos and Watson, (1997)) and were chosen as follows (Fig. 1 and Table 1): NTS, cingulate cortex (Cg), retrosplenial granular cortex (RSG), anterior hippocampus (restricted to CA1), and insula (AI). ROI time series were obtained for each session using the SPM ROI tool, which computes the first scaled eigenvariate (i.e. weighted mean) of the time series of voxels (between 130 and 200 voxels per ROI, on average) selected by applying the anatomical mask of the ROI (Fig. 1) on the map of negative *t*-values, thresholded at  $p < 0.001$  uncorrected. Finally, 410 DCMs were generated as follows, in a constrained way because it was not practically feasible to test all possible models: given 5 ROIs, there exist 41 possible graphs which connect uni-directionally ROI 1 to the





**Fig. 1.** Dynamic Causal Modelling of VNS in rat. Left: regions of interest are superimposed on a T2 rat template (coronal slices shown every 0.5 mm, in posterior to anterior order). Right: nine amongst the 410 tested DCMs of VNS. NTS: nucleus tractus solitarius; CA1: hippocampus (anterior part); AI: insular cortex; RSG: retrosplenial granular cortex; Cg: cingulate cortex.

others (with serial or parallel connections, ROI 1 receiving an extrinsic input modelling VNS afferents). Assuming that all regions could potentially receive the VNS input,  $41 \times 5 = 205$  unidirectional models with a single extrinsic input were generated and estimated. The location of the extrinsic input defined a family of model (named according to the input station) and the point (i) above (whether DCM for fMRI estimated the NTS as being the input station of VNS) was addressed by using Bayesian model comparison (FFX and RFX) of the

five families. In addition, 205 bidirectional models were generated from the previous 205 unidirectional models and fitted to the data. By comparing the two families defined by unidirectional and bidirectional connections, the point (ii) above (whether DCM estimates bidirectional long range brain connectivity) was finally investigated.

**Simulation**

To evaluate the sensitivity of DCM to detect causal relationships as a function of the amplitude of confounds, we set up a toy model: 2 ROIs were considered (1 & 2) that were mutually connected with a weight of 0.7. Time series of 10 min duration were generated with parameters similar to those in MR parameters Experimental Section II.4: 180 scans, TR = 3 s, input  $u$  on ROI 1 the same as the VNS function. Time series  $y_1$  and  $y_2$  of ROIs 1 & 2 were generated by integrating the following state equations:

$$\begin{cases} \dot{x}(t) = \begin{bmatrix} -1 & 0.7 \\ 0.7 & -1 \end{bmatrix} x(t) + \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix} u(t) \\ y(t) = h(x(t)) + \epsilon(t) \end{cases} \quad (1)$$

where  $\dot{x} = \frac{dx}{dt}$ ,  $t$  is time,  $x = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix}$  are the neuronal states and  $y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \end{bmatrix}$  are BOLD time series obtained from  $x$  using the hemodynamic model  $h$  with canonical parameters as described in (Stephan et al., (2009)). Normally distributed random noise with unit variance,  $\epsilon(t)$ , was assumed to model physiological and experimental noise

**Table 1**  
List of ROIs used in DCM. See Fig. 1. Coordinates indicate the centre of ROIs, in the atlas of Paxinos and Watson referenced to bregma (Paxinos and Watson, 1997). D-V: dorso-ventral; M-L: medio-lateral; A-P: antero-posterior.

DCM ROI	Anatomical structures	Abbreviations in Paxinos and Watson atlas	Centre coordinates		
			D-V	M-L	A-P
AI	Nucleus of the solitary tract/ vestibular nucleus	Sol/VE	-8	$\pm 1.2$	-13.2
CA1	Field CA1 of hippocampus	CA1	-3	$\pm 1.2$	-2.8
Cg	Cingulate cortex	Cg1/Cg 2	-2.4	$\pm 0.3$	0.5
NTS	Nucleus of the solitary tract/ vestibular nucleus/prepositus nucleus/intercalated nucleus of the medulla/ gracile nucleus	Sol/VE/Pr/In/Gr	-8	$\pm 1.2$	-13.2
RSG	Granular and agranular retrosplenial cortex	RSGa/RSGb/RSA	-1.7	$\pm 0.8$	-5.6

uncorrelated to stimulation  $u(t)$ . Positive parameter  $\sigma$  allowed to tune signal-to-noise ratio (SNR).

Physiological confounds  $c$  were defined as:

$$c = \frac{y_1 + y_2}{2} \quad (2)$$

They were thus highly correlated to BOLD time series  $y$  generated by neuronal activity  $x$ . Measured time series  $m$  were assumed to be a linear combination of  $y$  and  $c$ :

$$m = y + \begin{bmatrix} r \\ r \end{bmatrix} c \quad (3)$$

where  $r$  is the confound to neuronal hemodynamic response ratio. It was then varied from 0 (no confound) to 10. SNR was defined as the ratio between the standard deviations of  $m(t)$  and of  $\sigma\epsilon(t)$ , and was varied between 5 and 1. For each tested values of the pair  $[r, \text{SNR}]$ , generated time series  $m(t)$  were fitted using two models: the true model (model A) as described by the neuronal state Equation (1), and two false models in which the extrinsic input impinged on ROI 2 only (model B), or on both ROIs (model C) (Fig. 2).

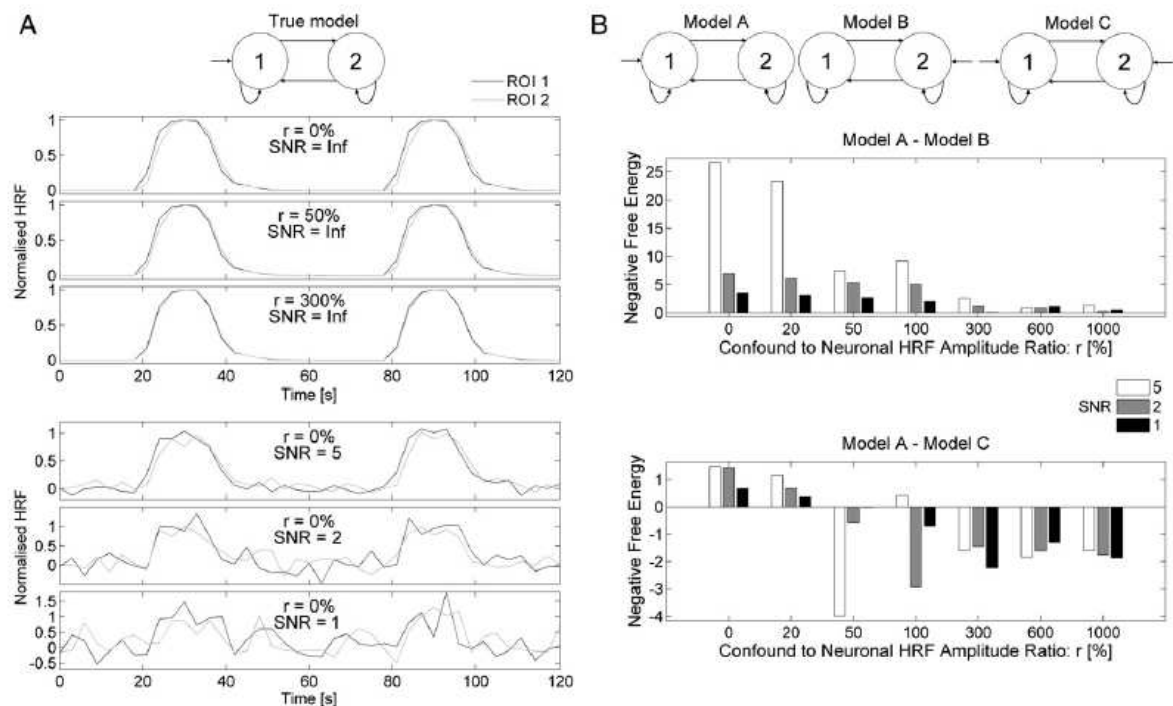
The influence of the confounds  $c$  on DCM ability to detect true directionality of information flow between ROI 1 and ROI 2 was evaluated by plotting the difference in log model evidence (approximated by the negative free energy) of models A, B and C, as a function of  $r$  and of SNR.

## Results

### Simulation

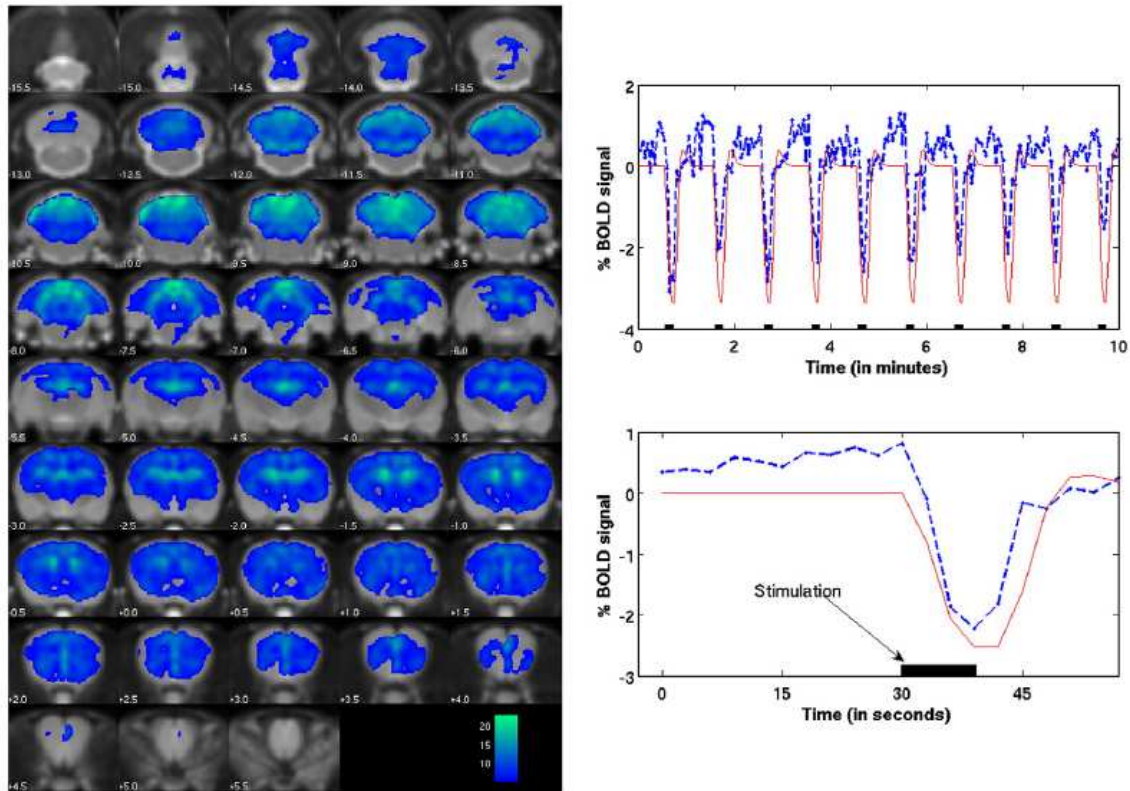
Fig. 2A shows two minutes of simulated time series with hemodynamic response function (HRF) amplitude normalised to 1 for display. The “true” generative model used here is defined by Equation (1). The three first panels show different degrees of contamination by confounds (common mode of original time series) defined by different values of parameter  $r$ , without random noise (SNR = Inf, i.e.  $\sigma = 0$ ). As one might expect from the design of this simple simulation, increasing  $r$  induced a reduction of the time delay between the activity of ROIs 1 & 2, and therefore challenged the detection of information flow from ROI 1 towards ROI 2. The three last panels show examples of simulated BOLD time series for the different values of SNR.

Fig. 2B shows the difference of negative free energy (approximate of log model evidence) between Models A & B (top) and Models A and C (bottom), when fitted to data shown in Fig. 2A and averaged over 50 realisations, as a function of parameter  $r$  and SNR. When  $r$  increased, model evidences decreased (global effect of confounds not shown) and also the difference of log evidence between the Models A & B. The effect of random noise (quantified by the SNR) was similar to that of correlated confound. Model A (true model) always remained more plausible than Model B (indicated a false position of the extrinsic input), as indicated by its largest log evidence. However, the difference between Models A & C was not significant (a value of 3 if log evidence being a common threshold value for significance), whatever the degree of noise considered.



**Fig. 2.** Simulation of Dynamic Causal Modelling with correlated confounds. A: 2 min of generated time series (HRF with amplitude normalised to 1) with the “true” model defined by Eq. (1). The three first panels show different degrees of contamination by confounds (common mode of original time series) defined by different values of parameter  $r$ , without random noise (SNR = Inf, i.e.  $\sigma = 0$ ). The three last panels show examples of simulated BOLD time series for the different values of SNR. B: difference of negative free energy (approximate of log model evidence) between Models A and B (top) and Models A and C (bottom), when fitted to data shown in A and averaged over 50 realisations, as a function of parameter  $r$  and SNR.





**Fig. 3.** Deactivations induced by vagal nerve stimulation (group study,  $n=8$ ). Left: map of negative  $t$ -value (thresholded at  $p<0.001$ , FWE corrected) showing deactivations. Top right: group average of BOLD signal variations in the NTS (blue) superimposed on the regressor of interest (red) obtained after convolution of the canonical hemodynamic response with the stimulus function (black). Bottom right: average over all stimulations.

#### fMRI of VNS

Highly significant VNS-related deactivations ( $p<0.001$ , FWE corrected) were found at the animal level and at the group level ( $n=8$ ) (Fig. 3). No significant activations were observed, neither at the group level nor at the animal level. While most of the brain was found to be deactivated at the group level, the strongest deactivations were mainly located in subcortical structures, such as the anterior NTS, the locus coeruleus, the parabrachial nucleus and the vestibular nucleus, in the anterior hippocampus, in the inferior and superior colliculi, or in the cerebellum. The most significant cortical deactivations were found in the retrosplenial, prefrontal, infralimbic, anterior cingulate and agranular insular cortices.

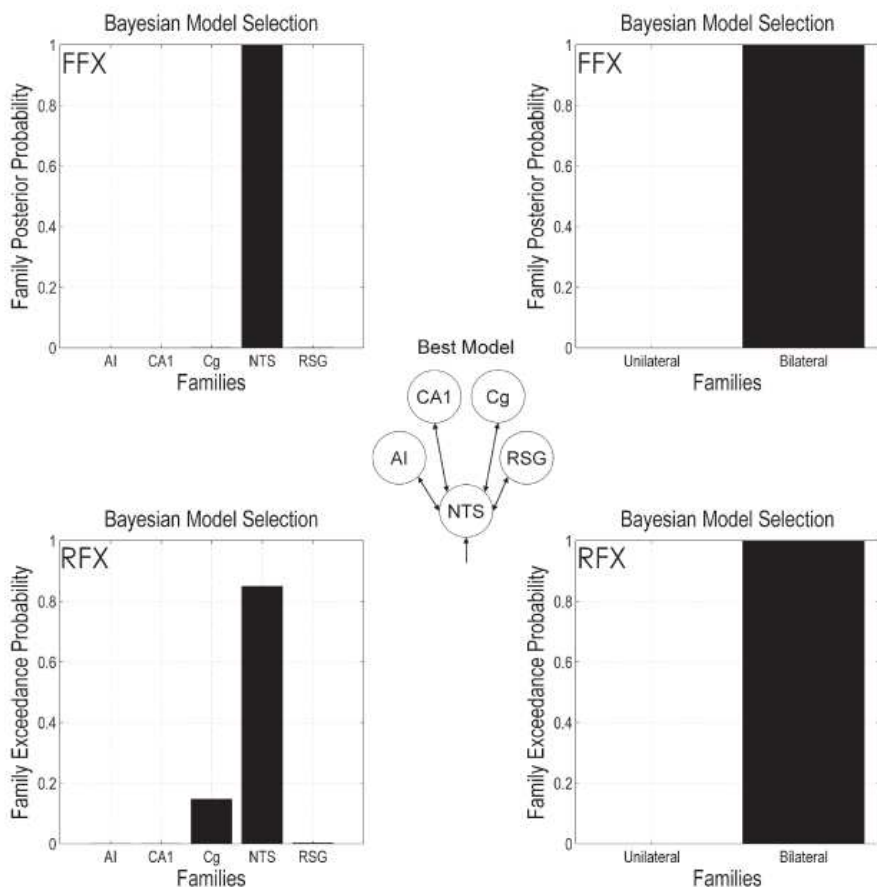
Three rats were removed from DCM analyses because the signal-to-noise ratio was too poor in the predefined ROIs. In the remaining five rats, BOLD time series recorded during stimulation of the intact left VN were well fitted by the different DCMs of Fig. 1. Bayesian model selection was performed at the group level on families of models (Penny et al., 2010) to two test main features (Fig. 4). First (Fig. 4 left), we addressed the identification of the input station of VNS by grouping together the 41 models having the same extrinsic input. We found a clear preference for models receiving vagal afferents on the NTS (FFX posterior probability: AI = 0, CA1 = 0, Cg = 0, NTS = 1, RSG = 0; RFX exceedance probability: AI = 0.0003, CA1 = 0.0002, Cg = 0.1474, NTS = 0.8493, RSG = 0.0028). Second (Fig. 4 right), we verified that the DCM approach was capable of detecting the presence of bilateral long range connectivity by comparing

the 210 models with bilateral connections against the 210 other models with forward connections only (FFX posterior probability: unidirectional = 0, bidirectional = 1; RFX exceedance probability: unidirectional = 0, bidirectional = 1). Finally, the most plausible model (Fig. 4 middle) was identified as the one combining those two features, with the fastest spreading from the NTS towards other regions (i.e. direct connections).

#### Discussion

To our knowledge, the central effects of VNS at a low frequency of stimulation have been rarely explored (Lomarev et al., 2002; Osharina et al., 2006). Here we provided the first fMRI study of acute VNS performed in rodents. Highly significant VNS-related deactivations were found in large portions of the brain, and particularly in the NTS and closely connected structures, such as the parabrachial nucleus, the locus coeruleus and the hippocampus. The VNS-induced fMRI deactivation of the cerebellum was also in agreement with the known anatomical projections of the NTS to the inferior portions of the cerebellum (Xu and Frazier, 1995). Significant deactivations were also reported in the prefrontal cortex and retrosplenial cortex, regions which are known to express c-Fos, a nuclear protein used as a non specific marker of neuronal activation, after continuous 30 Hz VNS (Naitoku et al., 1995).

The observed massive deactivation of the brain is different from reported findings in the only other study of VNS using functional neuroimaging published in rat (Dederwaerdere et al., 2005), where glucose metabolism, as measured by FDG-PET, significantly changed



**Fig. 4.** Group level ( $n=5$ ) Bayesian selection of families of the 410 tested models. Top: fixed-effect analysis (FFX) showing family posterior probability; bottom: random-effect analysis (RFX) showing family exceedance probability. Left: families were constructed to estimate the input station of the VNS (family labels indicate the input structure) and results indicate the NTS as the most likely. Cg comes second and probability is very weak for other scenarios. Right: families grouped together models with unidirectional or bidirectional interregional connectivity. Clear evidence is for the existence of bidirectional long range neuronal connections. Middle: most likely model amongst the 410 tested models.

during acute VNS only in the hippocampus (decrease) and olfactory bulbs (increase). In patient studies of acute VNS, local activations and deactivations were also reported (Bohning et al., 2001; Dietrich et al., 2008; Liu et al., 2003; Lomarev et al., 2002; Nahas et al., 2007; Narayanan et al., 2002; Sucholeiki et al., 2002). The differences between these findings and ours can be explained by several factors, such as diversity in stimulation protocols or in animal preparation. It is also difficult to directly compare results obtained in rats and in humans. In fact, two elements led us to consider a strong cardio-respiratory contribution to these deactivations: (i) deactivation of the brain was concomitant with a transient decrease of heart rate (6% of heart rate decrease measured during 1 h left VNS, see Supplementary materials); (ii) the most significantly deactivated structures belonged to the central autonomic regulation system (Saper, 2004). Two experimental controls to further understand BOLD statistical maps of acute VNS were performed (see Supplementary materials): (i) no brain activation was found when the distal end of the vagus nerve (below VN section, i.e. disrupted vagal afferents) was stimulated, whereas brain activations remained unchanged when vagal efferents were disrupted (i.e. stimulation of the proximal end of the vagus nerve, just above VN section). Critically, this series of oriented vagotomy experiments demonstrated a major role taken by afferent fibres in comparison to efferent fibres, and thus

suggested the necessity of the activation of regulation nuclei of the mesencephalon to explain BOLD responses to VNS. (ii) BOLD responses to ephedrine injection showed a significant positive correlation with heart rate changes (ephedrine increases heart rate (Avois et al., 2006)) in many brain regions also deactivated during VNS. VNS and ephedrine results put together, they suggested that the negative sign of BOLD activations during VNS was mainly driven by heart rate decrease.

Because weak bradycardia accompanied VNS, it remained difficult to distinguish neuronal effects and cardio-respiratory effects, which are known to participate significantly to BOLD signals (Birn et al., 2006; Dagli et al., 1999; de Munck et al., 2008; Gray et al., 2009; Wise et al., 2004). DCM as used in this study can be perceived as a way to investigate whether there were neuronal components into measured fMRI signals. Indeed if inferred neuronal connectivity agreed with known neuronal circuitry, i.e. the NTS receives afferent inputs, then an indirect demonstration of the neural nature of measured BOLD signals would have been provided. Model comparison at the group level showed that it was the case since the NTS region was the most likely structure amongst five candidates to receive VNS inputs, in agreement with strong knowledge about neuroanatomical underpinnings of VNS. Moreover, DCM results were reinforced by the fact that we found clear evidence for bilateral long range connectivity, as commonly found in



neuroanatomical studies. The best model at the group level (Fig. 4) indicated fast (i.e. direct) connections from the NTS towards other brain regions. This is very reminiscent of the view of the NTS as a “hub”, or input station to the brain. It also indicates that DCM finds effective connectivity between regions that are not anatomically directly, but probably indirectly, connected. This may be the case for CA1, which is known to receive signals from the NTS, but probably through the amygdala or the locus coeruleus (which were not included in the DCMs and therefore acted as latent variables here).

Along with other electrophysiological validation studies of DCM combined with fMRI (David et al., 2008) or microdialysis recordings (Moran et al., 2008), this new experimental validation of DCM for fMRI is important for two reasons: (i) it is the second demonstration of the ability of DCM for fMRI to estimate neuronal connectivity features in agreement with prior knowledge in rat datasets and thus confirms conclusions derived in (David et al., (2008)); and (ii) it shows that DCM is able to recover the presumed neural input region in the presence of physiological noise. This may be because the state equations of the hemodynamic model are well suited to fit smooth physiological responses and that priors on hemodynamic parameters are sufficiently relaxed to allow them to do so, i.e. to capture neural or indirect hemodynamic variability (David et al., 2008; Friston, 2009; Roebroeck et al., 2009).

To further illustrate this point, we performed a short simulation on a toy model composed of two interconnected regions where a hemodynamic confound modelling task-related physiological responses was assumed to be symmetrically correlated to the neurally induced hemodynamic activity of each region (Fig. 2). The evidence of DCMs was obviously sensitive to the presence of correlated confounds. However, it was possible to detect the true model as being the most plausible model having generating the data when the models used distinct extrinsic inputs (Models A & B). The limit of significance was nonetheless reached for strong correlated confounds ( $r > 300\%$ ), for different degrees of uncorrelated random noise (experimental or physiological). When the models shared common inputs (and probably extrinsic inputs that bypass true intrinsic connectivity such as in Model C), DCM was not able to differentiate models from average log evidence, for any noise level. This interesting result is reassuring for DCM analyses in fMRI, in general, as long as the location of extrinsic inputs is well motivated on the basis of strong anatomical knowledge of brain afferents. However, in other configurations, such as asymmetric confounds, additive experimental noise or more complex DCM architectures with potential interactions between intrinsic (i.e. between brain regions) and extrinsic (e.g. stimuli) connectivity, this ideal scenario could potentially be challenged and reversed.

Robustness of DCM in the presence of physiological responses as demonstrated here may not be true for all studies. Indeed, psychophysiological measurements, such as cardiac, vascular, respiratory, electrodermal, gastrointestinal, and papillary monitoring, may reveal subtle processes during brain-body interactions that are modulated by the experimental context, e.g. emotion or arousal level (Gray et al., 2009). Because DCM aims at revealing changes of neural connectivity associated to differential contextual responses, changes in physiological responses may be wrongly interpreted as changes in neuronal weights in the absence of an adapted generative model of brain-body interactions. Developing such models may be very important for future fMRI studies completed by parallel physiological monitoring to ascertain the validity of a neuronal interpretation of BOLD activation maps. This task is exciting but very complex and was well beyond the scope of this paper. Hopefully, fMRI modellers would soon come up with a solution to this problem.

#### Acknowledgments

We thank Cyberonics France for providing us with the VNS electrodes. This study was funded by Inserm and Agence Nationale pour la Recherche. The authors declare no conflict of interest.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neuroimage.2010.05.021.

#### References

- Avois, L., Robinson, N., Saudan, C., Baume, N., Mangin, P., Saugy, M., 2006. Central nervous system stimulants and sport practice. *Br. J. Sports Med.* 40 (Suppl 1), i16–i20.
- Ben-Menachem, E., 2002. Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy. *Lancet Neurol.* 1, 477–482.
- Ben-Menachem, E., Hamberger, A., Hedner, T., Hammond, E.J., Uthman, B.M., Slater, J., Treig, T., Stefan, H., Ramsay, R.E., Wernicke, J.F., et al., 1995. Effects of vagus nerve stimulation on amino acids and other metabolites in the CSF of patients with partial seizures. *Epilepsy Res.* 20, 221–227.
- Bernik, T.R., Friedman, S.G., Ochani, M., DiRaimo, R., Susrarla, S., Czura, C.J., Tracey, K.J., 2002. Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J. Vasc. Surg.* 36, 1231–1236.
- Biraben, A., Guerin, S., Bobillier, E., Val-Laillet, D., Malbert, C.-H., 2008. Central activation after chronic vagus nerve stimulation in pigs: contribution of functional imaging. *Bull. Acad. Vét. France* 161, 441–448.
- Birn, R.M., Diamond, J.B., Smith, M.A., Bandettini, P.A., 2006. Separating respiratory-variation-related fluctuations from neuronal-activity-related fluctuations in fMRI. *Neuroimage* 31, 1536–1548.
- Bohning, D.E., Lomarev, M.P., Denslow, S., Nahas, Z., Shastri, A., George, M.S., 2001. Feasibility of vagus nerve stimulation-synchronized blood oxygenation level-dependent functional MRI. *Invest. Radiol.* 36, 470–479.
- Bonaz, B., 2007. The cholinergic anti-inflammatory pathway and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 133, 1370–1373.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462.
- Cechetti, D.F., Shoemaker, J.K., 2009. Functional neuroanatomy of autonomic regulation. *Neuroimage* 47, 795–803.
- Chae, J.H., Nahas, Z., Lomarev, M., Denslow, S., Lorberbaum, J.P., Bohning, D.E., George, M.S., 2003. A review of functional neuroimaging studies of vagus nerve stimulation (VNS). *J. Psychiatr. Res.* 37, 443–455.
- Dagli, M.S., Ingeholm, J.E., Haxby, J.V., 1999. Localization of cardiac-induced signal change in fMRI. *Neuroimage* 9, 407–415.
- David, O., Guillemain, I., Saittel, S., Reyt, S., Deransart, C., Segebarth, C., Depaulis, A., 2008. Identifying neural drivers with functional MRI: an electrophysiological validation. *PLoS Biol.* 6, 2683–2697.
- de Munck, J.C., Gonçalves, S.I., Faes, T.J., Kuijter, J.P., Pouwels, P.J., Heethaar, R.M., Lopes da Silva, F.H., 2008. A study of the brain's resting state based on alpha band power, heart rate and fMRI. *Neuroimage* 42, 112–121.
- 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.
- Dietrich, S., Smith, J., Scherzinger, C., Hofmann-Preiss, K., Freitag, T., Eisenkolb, A., Ringler, R., 2008. A novel transcutaneous vagus nerve stimulation leads to brainstem and cerebral activations measured by functional MRI. *Biomed. Tech. (Berl.)* 53, 104–111.
- Dorr, A.E., Debonnel, G., 2006. Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and noradrenergic transmission. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 890–898.
- Fairhall, S.L., Ishai, A., 2007. Effective connectivity within the distributed cortical network for face perception. *Cereb. Cortex* 17, 2400–2406.
- Friston, K., 2009. Dynamic causal modeling and Granger causality. Comments on: the identification of interacting networks in the brain using fMRI: model selection, causality and deconvolution. *Neuroimage*. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.09.031.
- Friston, K.J., Holmes, A.P., Worsley, K.J., 1999. How many subjects constitute a study? *Neuroimage* 10, 1–5.
- Friston, K.J., Mechelli, A., Turner, R., Price, C.J., 2000. Nonlinear responses in fMRI: the Balloon model, Volterra kernels, and other hemodynamics. *Neuroimage* 12, 466–477.
- Friston, K.J., Harrison, L., Penny, W., 2003. Dynamic causal modeling. *Neuroimage* 19, 1273–1302.
- Friston, K.J., Stephan, K.E., Lund, T.E., Morcom, A., Kiebel, S., 2005. Mixed-effects and fMRI studies. *Neuroimage* 24, 244–252.
- Friston, K., Mattout, J., Trujillo-Barreto, N., Ashburner, J., Penny, W., 2007. Variational free energy and the Laplace approximation. *Neuroimage* 34, 220–234.
- Garrido, M.I., Kilner, J.M., Kiebel, S.J., Stephan, K.E., Friston, K.J., 2007. Dynamic causal modelling of evoked potentials: a reproducibility study. *Neuroimage* 36, 571–580.
- Gray, M.A., Minati, L., Harrison, N.A., Gianaros, P.J., Napadow, V., Critchley, H.D., 2009. Physiological recordings: basic concepts and implementation during functional magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 47, 1105–1115.
- Groves, D.A., Bowman, E.M., Brown, V.J., 2005. Recordings from the rat locus coeruleus during acute vagal nerve stimulation in the anaesthetised rat. *Neurosci. Lett.* 379, 174–179.
- Guo, S., Seth, A.K., Kendrick, K.M., Zhou, C., Feng, J., 2008. Partial Granger causality—eliminating exogenous inputs and latent variables. *J. Neurosci. Methods* 172, 79–93.
- Hamberger, A., Haglid, K., Nyström, B., Silfvenius, H., 1993. Co-variation of free amino acids in human epileptogenic cortex. *Neurochem. Res.* 18, 519–525.
- Krahl, S.E., Clark, K.B., Smith, D.C., Bowning, R.A., 1998. Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 39, 709–714.
- Liu, W.C., Mosier, K., Kalinin, A.J., Marks, D., 2003. BOLD fMRI activation induced by vagus nerve stimulation in seizure patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 811–813.



- Lomarev, M., Denslow, S., Nahas, Z., Chae, J.H., George, M.S., Bohning, D.E., 2002. Vagus nerve stimulation (VNS) synchronized BOLD fMRI suggests that VNS in depressed adults has frequency/dose dependent effects. *J. Psychiatr. Res.* 36, 219–227.
- Marangell, L.B., Martinez, M., Jurdi, R.A., Zboyan, H., 2007. Neurostimulation therapies in depression: a review of new modalities. *Acta Psychiatr. Scand.* 116, 174–181.
- Marrosu, F., Santoni, F., Puligheddu, M., Barberini, L., Maleci, A., Ennas, F., Mascia, M., Zanetti, G., Tuveri, A., Biggio, G., 2005. Increase in 20–50 Hz (gamma frequencies) power spectrum and synchronization after chronic vagal nerve stimulation. *Clin. Neurophysiol.* 116, 2026–2036.
- Mechelli, A., Critnion, J.T., Long, S., Friston, K.J., Lambon Ralph, M.A., Patterson, K., McClelland, J.L., Price, C.J., 2005. Dissociating reading processes on the basis of neuronal interactions. *J. Cogn. Neurosci.* 17, 1753–1765.
- Milby, A.H., Halpern, C.H., Baltuch, G.H., 2008. Vagus nerve stimulation for epilepsy and depression. *Neurotherapeutics* 5, 75–85.
- Moran, R.J., Stephan, K.E., Kiebel, S.J., Rombach, N., O'Connor, W.T., Murphy, K.J., Reilly, R.B., Friston, K.J., 2008. Bayesian estimation of synaptic physiology from the spectral responses of neural masses. *Neuroimage* 42, 272–284.
- Nahas, Z., Teneback, C., Chae, J.H., Mu, Q., Molnar, C., Kozel, F.A., Walker, J., Anderson, B., Koola, J., Kose, S., Lomarev, M., Bohning, D.E., George, M.S., 2007. Serial vagus nerve stimulation functional MRI in treatment-resistant depression. *Neuropsychopharmacology* 32, 1649–1660.
- Narayanan, J.T., Watts, R., Haddad, N., Labar, D.R., Li, P.M., Filippi, C.G., 2002. Cerebral activation during vagus nerve stimulation: a functional MR study. *Epilepsia* 43, 1509–1514.
- Naritoku, D.K., Terry, W.J., Helfert, R.H., 1995. Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res.* 22, 53–62.
- 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.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Inc., San Diego.
- Penny, W.D., Stephan, K.E., Mechelli, A., Friston, K.J., 2004. Comparing dynamic causal models. *Neuroimage* 22, 1157–1172.
- Penny, W.D., Stephan, K.E., Daunizeau, J., Rosa, M.J., Friston, K.J., Schofield, T.M., Leff, A.P., 2010. Comparing families of dynamic causal models. *PLoS Comput. Biol.* 6, e1000709.
- Roebroeck, A., Formisano, E., Goebel, R., 2009. The identification of interacting networks in the brain using fMRI: model selection, causality and deconvolution. *Neuroimage*. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.09.036.
- Saper, C.B., 2002. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 433–469.
- Saper, C.B., 2004. Central autonomic system. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 761–796.
- Schuyler, B., Ollinger, J.M., Oakes, T.R., Johnstone, T., Davidson, R.J., 2009. Dynamic causal modeling applied to fMRI data shows high reliability. *Neuroimage* 49 (1), 603–611.
- Schweinhart, P., Fransson, P., Olson, L., Spenger, C., Andersson, J.L., 2003. A template for spatial normalisation of MR images of the rat brain. *J. Neurosci. Methods* 129, 105–113.
- Siman-Tov, T., Mendelsohn, A., Schonberg, T., Avidan, G., Podlipsky, I., Pessoa, L., Gadoth, N., Ungerleider, L.G., Hendler, T., 2007. Bihemispheric leftward bias in a visuospatial attention-related network. *J. Neurosci.* 27, 11271–11278.
- Stephan, K.E., Penny, W.D., Daunizeau, J., Moran, R.J., Friston, K.J., 2009. Bayesian model selection for group studies. *Neuroimage* 46, 1004–1017.
- Sucholeiki, R., Alsaadi, T.M., Morris III, G.L., Ulmer, J.L., Btswal, B., Mueller, W.M., 2002. fMRI in patients implanted with a vagal nerve stimulator. *Seizure* 11, 157–162.
- Tracey, K.J., 2007. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* 117, 289–296.
- Tracey, K.J., 2009. Reflex control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 418–428.
- Van Der Zanden, E.P., Boeckstaens, G.E., de Jonge, W.J., 2009. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 6–17.
- Weber, R., Ramos-Cabrer, P., Wiedermann, D., Van, C.N., Hoehn, M., 2006. A fully noninvasive and robust experimental protocol for longitudinal fMRI studies in the rat. *Neuroimage* 29, 1303–1310.
- Wise, R.G., Ide, K., Poulin, M.J., Tracey, I., 2004. Resting fluctuations in arterial carbon dioxide induce significant low frequency variations in BOLD signal. *Neuroimage* 21, 1652–1664.
- Xu, F., Frazier, D.T., 1995. Medullary respiratory neuronal activity modulated by stimulation of the fastigial nucleus of the cerebellum. *Brain Res.* 705, 53–64.

# Dynamic causal modelling and physiological confounds: A functional MRI study of vagus nerve stimulation

## Supplementary Materials

SÉBASTIEN REYT<sup>1,4,+</sup>, CHLOÉ PICQ<sup>2,3,4,+</sup>, VALÉRIE SINNIGER<sup>2</sup>, DIDIER CLARENÇON<sup>2,3</sup>, BRUNO BONAZ<sup>2,6</sup>,  
OLIVIER DAVID<sup>1,4,5,\*</sup>

1. *Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique, Inserm, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France.*
2. *Stress et Interactions Neuro-Digestives (SIND; EA3744), Inserm, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France.*
3. *Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Antenne de La Tronche, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, France.*
4. *Université Joseph Fourier, Grenoble, France.*
5. *Service de Neuroradiologie et Unité IRM, University Hospital, Grenoble, France.*
6. *Clinique Universitaire d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France.*

## Introduction

We provide in these Supplementary Materials results of experimental controls performed to evaluate the physiological origins of the BOLD activations measured during acute 5 Hz VNS in Sprague-Daley rats, as presented in the main text:

- Firstly, we evaluated the effects of VNS at 5Hz on heart rate.
- Secondly, because a moderate heart rate modulation might constitute a confound on the BOLD signal of neural origin (Dagli et al. 1999; de Munck et al. 2008), and in order to distinguish between peripheral cardiovascular modulations versus central nervous effects, we used two experimental controls:
  - Vagotomy above the electrode allowing stimulation of the distal end (VN efferents) or below the electrode for stimulation of the proximal end (VN afferents) was performed;
  - Pharmacological activation of the cardiovascular system with intravenous injection of ephedrine as a vasopressor was used to evaluate the sign of fMRI activations as a function of global blood pressure changes.

We concluded that 5Hz VNS mostly activates the central autonomic regulation system and that fMRI signals obtained during acute 5 Hz VNS are likely to represent both direct and indirect vascular responses to such activation. Interestingly however, though blood pressure changes may constitute a major physiological confound in this dataset, model comparison of DCMs still allowed the identification of the NTS as the input nucleus of the VNS pathway to the brain (see main text).

## II Materials and Methods

As in main text, except:

- **VNS surgery:** In rats undergoing vagotomy, the VN was cut just above the electrode (n=2), in order to stimulate efferences, or below (n=2) the electrode to stimulate afferences.
- **Heart rate modulation by VNS:** Heart rate modulation by VNS was quantified prior to MR acquisitions. During this first series of experiments, animals were maintained under 2% isoflurane. Temperature was monitored using a rectal probe and maintained at 37°C using a heating blanket (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard, USA). Oxygen saturation was also monitored using an optical probe (Nonin, France) located on the hind paw. Electrocardiogram (ECG) was recorded using 3 electrodes connected to an amplifier (ECG 100C, Biopac MP150, 2kHz sampling rate). Rats were continuously stimulated during 1 hour (n=6).
- **FMRI paradigm during ephedrine injection:** Same MR parameters as in main text. The experimental paradigm specific for ephedrine injection: after about 5 minutes of baseline sampling (100 TR), a bolus of ephedrine (0.05 mL) was injected intravenously in the tail vein. BOLD signal was sampled for 5 more minutes (Figure 1B). For those experiments, ECG was recorded in two rats only using a MR-compatible EEG amplifier (1024Hz sampling rate, SD-MRI 32, Micromed, Treviso, Italy) and two copper leads connected to the left forelimb and the right hindlimb.
- **FMRI data analyses:** as in main text, except:
  - Ephedrine cutoff for drift correction (preprocessing): 1/1028s.
  - For data obtained during ephedrine injection, the regressor was either the heart rate estimated from the ECG recorded simultaneously to fMRI, or a Heaviside step function modeling baseline and increased heart rate when recording of ECG was unavailable. Heart rate estimation was done by (i) high-pass filtering the ECG above

120Hz, (ii) detecting QRS peaks in between gradient artefacts (instantaneous heart rate is the inverse of the time interval between two adjacent QRS peaks), (iii) using a moving average (15s width) of instantaneous heart rate to get a smooth reconstruction. Temporal coregistration of ECG and fMRI was achieved by the means of a TTL trigger delivered by the MR scanner to the ECG amplifier at the beginning of each EPI volume acquisition.

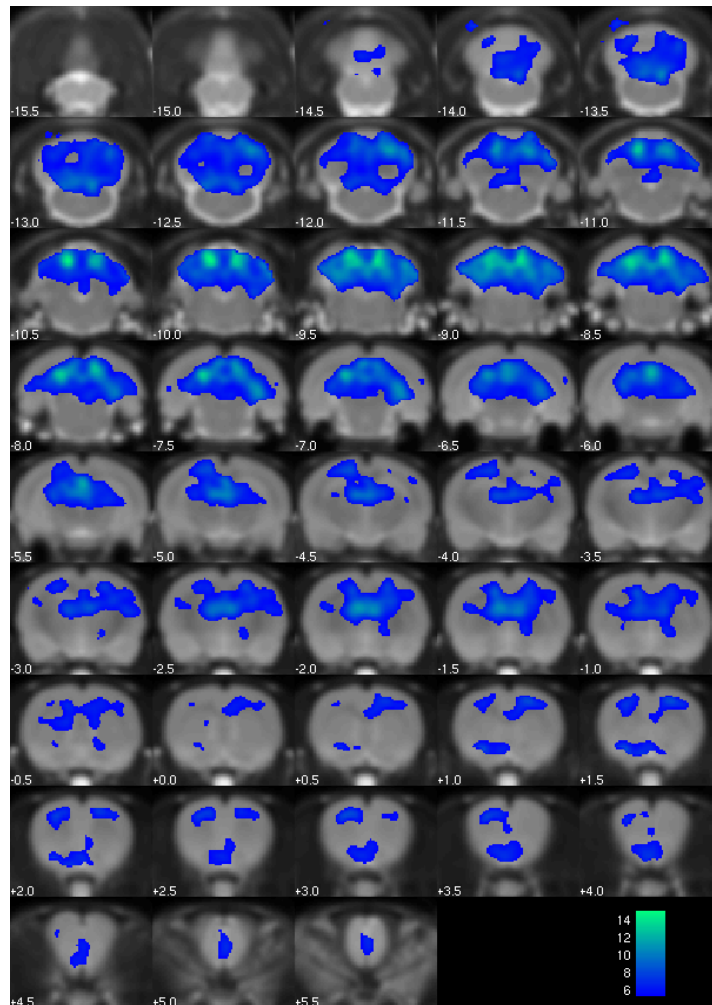
## **III Results**

### **III.1 Modulation of heart rate by VNS**

When 5Hz left VNS was continuously performed for 1 hour (n=5), a non significant decrease (6%,  $p>0.05$ , Wilcoxon test) of heart rate was observed during the first 7 minutes of stimulation. This decrease was significant (11%;  $p<0.05$ ) after one hour of stimulation. When VNS of the right VN was performed (n=1), the induced bradycardia was more important (19%). These findings advocated for the stimulation of the left (instead of right) VN during short periods (9s) for studying VNS in fMRI with minimal confounding effect of VNS-induced heart rate changes.

### **III.2 fMRI of VNS**

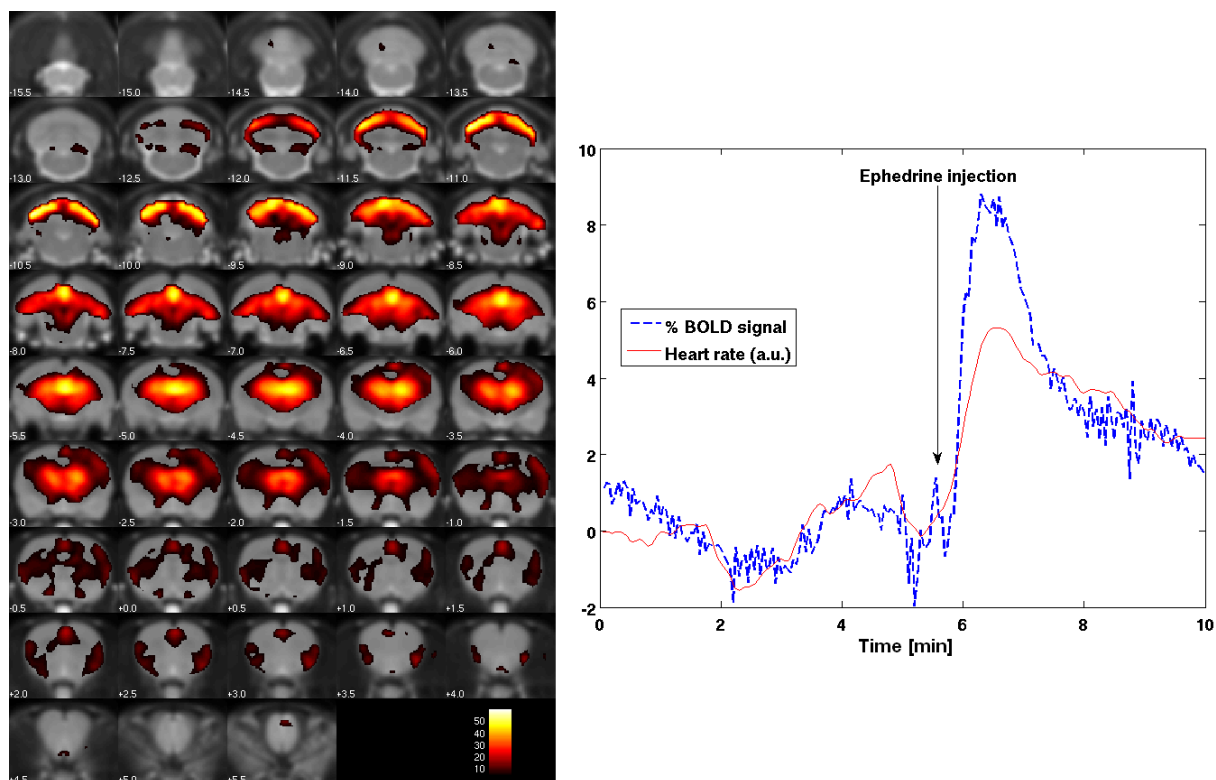
When the left VN was cut above the electrode, stimulation of distal ends of the nerve (n=2) did not induce any significant variations either in BOLD signal or in cardiac and respiratory activities, as compared to non-vagotomised rats. Conversely, when the left VN was cut under the electrode, stimulation of proximal VN ending (n=2), brain activation maps and other physiological measures were similar to those obtained in non-vagotomised rats (Figure S1).



**Figure S1:** Deactivations induced by stimulation of the proximal end of the vagal nerve (above the section) (group study, n=2, thresholded t-map at  $p < 0.001$  FWE corrected).

### III.3 fMRI of heart rate changes induced by ephedrine

A heart rate increase of about 20% of baseline level was observed between one and two minutes after ephedrine injection. Heart rate response slowly decreased afterwards to reach a value of about 10% of baseline level at the end of fMRI scans (*i.e.* 5 minutes after injection) (Figure S2). No strong respiratory effects were detected due to ephedrine injection. Heart rate increase was significantly correlated with widespread BOLD activations, mainly located in the locus coeruleus, the PAG, the cerebellum, the thalamus, and the insular and cingulate cortices.

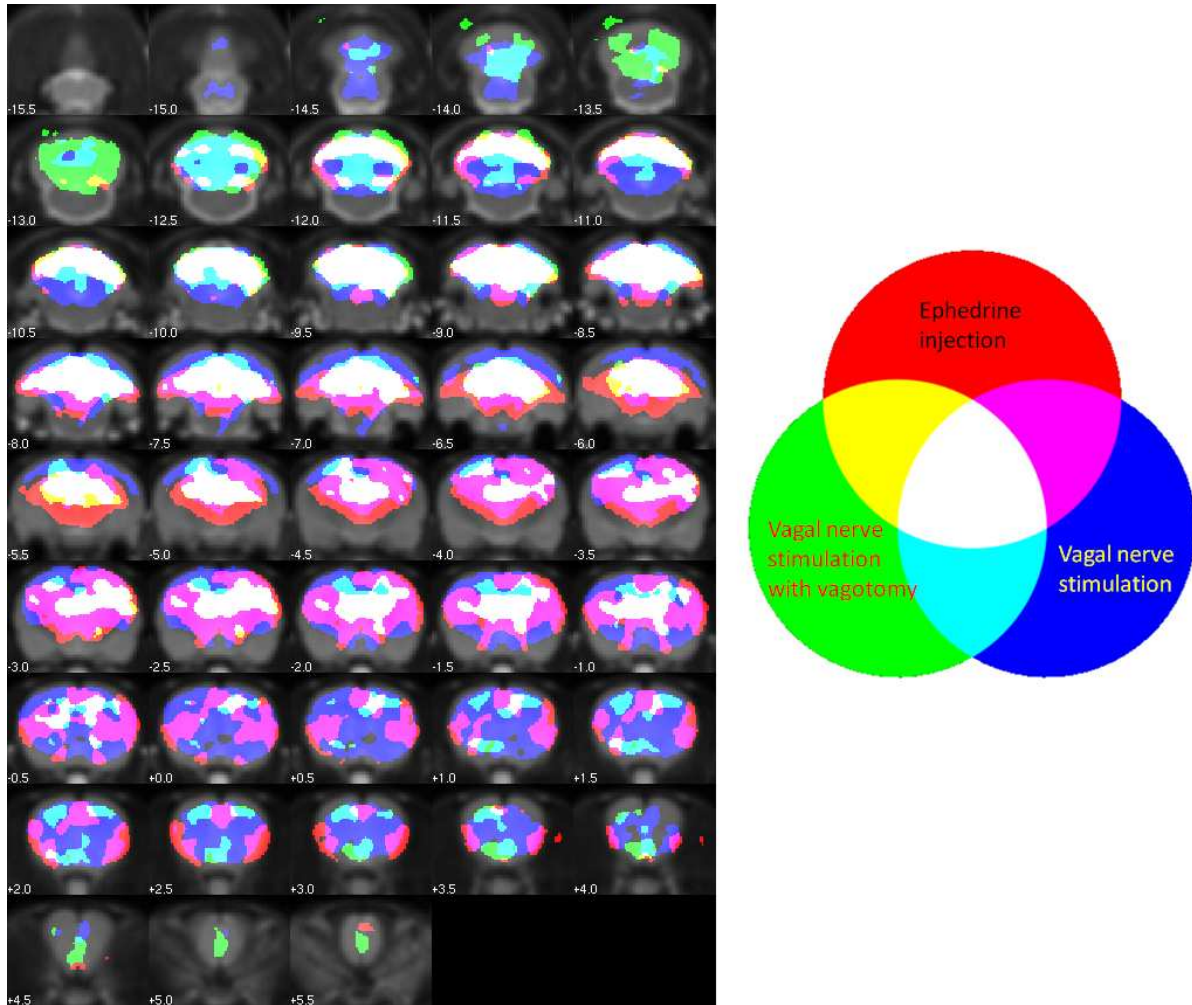


**Figure S2:** Activations induced by intravenous ephedrine injection. Left: Thresholded t-map showing group activations ( $n=7$ ,  $p<0.001$  FWE corrected). Right: Time course of variations of heart rate (red) and BOLD signal averaged over all activated brain voxels (blue), for one rat. Note the excellent correlation between both variables.

### III.3 Superposition of fMRI activation maps

Figure S3 shows at the group level a superposition of the different types of activations (intact VNS, ascending VNS and ephedrine injection). Overlap of BOLD activations between those conditions was important. However, VNS-specific deactivations remained detectable in the superior medulla (NTS region), in the anterior part of the septum, in the anterior motor cortex, and in the posterior and basal cerebellum.





**Figure S3:** Overlap of activation maps. Binary maps were obtained from the t-maps ( $p < 0.001$ , FWE corrected) and the superimposition of the different conditions was coded in true colours. VNS-specific deactivations shows up in blue (intact VNS) or green (vagotomised VNS), in cyan for both conditions (most robust VNS-related activations).

## IV Discussion

When heart rate was experimentally increased using intravenous injection of ephedrine, we found BOLD activations only, in opposition to VNS. Main BOLD activations found after ephedrine injection were localised in the PAG, thalamus, cerebellum, hippocampus, insula and cingulate cortex. Most of these structures belong to the central autonomic system (Saper 2004), to the serotonin

system (Harding 2004) and to the noradrenergic system (Aston-Jones 2004), and agree with the notion of an autonomic brain activation. Ephedrine is a mixed sympathomimetic agent which acts as a stimulant of the central nervous system by enhancing the release of noradrenaline from sympathetic neurones. In turn, the sympathetic neurones stimulate alpha and beta receptors of the heart. Ephedrine not only activates the heart rate, but also causes peripheral constriction, resulting in an increase in peripheral resistance which leads to a sustained rise in blood pressure (Avois et al. 2006). It is thus highly plausible that BOLD activations may also largely reflect increase in blood pressure. Indeed, taken together, the covariation of the sign of BOLD effects and of heart rate modulation after VNS and ephedrine injection suggests that it is entirely plausible that an important ratio of fMRI correlates observed during VNS represent indirect physiological responses.

VNS performed in vagotomised animals finally allowed us to determine that the primary cause of the physiological responses measured in fMRI was the activation of brainstem nuclei involved in the central autonomic regulation system, and not the activation of cardiac receptors to VNS. No brain activation was indeed observed after removing VN afferents. This result also suggests a major role taken by afferent fibres in comparison to efferent fibres during VNS because hemodynamic changes necessitated the activation of regulation nuclei of the mesencephalon which appeared to be specifically deactivated by VNS when overlapping the different experimental conditions (Figure S3).

## VIII. REFERENCES

# Références

- Agostoni, E., Chinnock, J. E., De Daly, M. B., and Murray, J. G. (1957). "Functional and histological studies of the vagus nerve and its branches to the heart, lungs and abdominal viscera in the cat." *J Physiol*, 135(1), 182-205.
- Alex, P., Zachos, N. C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T. E., Conklin, L. S., Centola, M., and Li, X. (2008). "Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis." *Inflamm Bowel Dis*.
- Altschuler, S. M., Escardo, J., Lynn, R. B., and Miselis, R. R. (1993). "The central organization of the vagus nerve innervating the colon of the rat." *Gastroenterology*, 104(2), 502-9.
- Aston-Jones, G. (2004). "Locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cells groups", in G. Paxinos, (ed.), *The Rat Nervous System*. San Diego: Elsevier Academic Press, pp. 259-294.
- Attanavanich, K., and Kearney, J. F. (2004). "Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells." *J Immunol*, 172(2), 803-11.
- Avois, L., Robinson, N., Saudan, C., Baume, N., Mangin, P., and Saugy, M. (2006). "Central nervous system stimulants and sport practice." *Br J Sports Med*, 40 Suppl 1, i16-20.
- Banks, W. A., and Kastin, A. J. (1997). "Relative contributions of peripheral and central sources to levels of IL-1 alpha in the cerebral cortex of mice: assessment with species-specific enzyme immunoassays." *J Neuroimmunol*, 79(1), 22-8.
- Banovic, I., Gilibert, D., and Cosnes, J. (2009). "Perception of improved state of health and subjective quality of life in Crohn's disease patients treated with Infliximab." *J Crohns Colitis*, 3(1), 25-31.
- Bao, M., Zhou, J., and Luan, G. M. (2011). "Treatment of drug-resistant epilepsy with vagus nerve stimulation - review of 45 cases." *Chin Med J (Engl)*, 124(24), 4184-8.
- Beekwilder, J. P., and Beems, T. (2010). "Overview of the clinical applications of vagus nerve stimulation." *J Clin Neurophysiol*, 27(2), 130-8.
- Bellinger, D., Millar, B., Perez, S., Carter, J., Wood, C., ThyagaRajan, S., Molinaro, C., Lubahn, C., and Lorton, D. (2006). "Innervation of lymphoid organs : Clinical implications." *Clinical Neuroscience Research*, 6, 3-33.
- Bellinger, D. L., Lorton, D., Hamill, R. W., Felten, S. Y., and Felten, D. L. (1993). "Acetylcholinesterase staining and choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen: lack of evidence for cholinergic innervation." *Brain Behav Immun*, 7(3), 191-204.
- Ben-Menachem, E. (2002). "Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy." *Lancet Neurol*, 1(8), 477-82.
- Bendelac, A., Savage, P. B., and Teyton, L. (2007). "The biology of NKT cells." *Annu Rev Immunol*, 25, 297-336.
- Bernik, T. R., Friedman, S. G., Ochani, M., DiRaimo, R., Susarla, S., Czura, C. J., and Tracey, K. J. (2002a). "Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion." *J Vasc Surg*, 36(6), 1231-6.
- Bernik, T. R., Friedman, S. G., Ochani, M., DiRaimo, R., Ulloa, L., Yang, H., Sudan, S., Czura, C. J., Ivanova, S. M., and Tracey, K. J. (2002b). "Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway." *J Exp Med*, 195(6), 781-8.
- Bernstein, C. N. (2010). "Epidemiologic clues to inflammatory bowel disease." *Curr Gastroenterol Rep*, 12(6), 495-501.
- Berrebi, D., Maudinas, R., Hugot, J. P., Chamailard, M., Chareyre, F., De Lagausie, P., Yang, C., Desreumaux, P., Giovannini, M., Cezard, J. P., Zouali, H., Emilie, D., and Peuchmaur, M. (2003). "Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon." *Gut*, 52(6), 840-6.
- Berthoud, H. R., and Neuhuber, W. L. (2000). "Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system." *Auton Neurosci*, 85(1-3), 1-17.

- Berthoud, H. R., and Powley, T. L. (1993). "Characterization of vagal innervation to the rat celiac, suprarenal and mesenteric ganglia." *J Auton Nerv Syst*, 42(2), 153-69.
- Berthoud, H. R., and Powley, T. L. (1996). "Interaction between parasympathetic and sympathetic nerves in prevertebral ganglia: morphological evidence for vagal efferent innervation of ganglion cells in the rat." *Microsc Res Tech*, 35(1), 80-6.
- Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., Da Prada, M., Burri, R., and Honegger, C. (1983). "The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons." *Science*, 221(4610), 564-6.
- Besedovsky, H. O., del Rey, A., and Sorkin, E. (1981). "Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels." *J Immunol*, 126(1), 385-7.
- Birn, R. M., Diamond, J. B., Smith, M. A., and Bandettini, P. A. (2006). "Separating respiratory-variation-related fluctuations from neuronal-activity-related fluctuations in fMRI." *Neuroimage*, 31(4), 1536-48.
- Blalock, J. E. (2002). "Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock." *J Exp Med*, 195(6), F25-8.
- Blalock, J. E., and Smith, E. M. (2007). "Conceptual development of the immune system as a sixth sense." *Brain Behav Immun*, 21(1), 23-33.
- Bohning, D. E., Lomarev, M. P., Denslow, S., Nahas, Z., Shastri, A., and George, M. S. (2001). "Feasibility of vagus nerve stimulation-synchronized blood oxygenation level-dependent functional MRI." *Invest Radiol*, 36(8), 470-9.
- Bonaz, B. (2007). "The cholinergic anti-inflammatory pathway and the gastrointestinal tract." *Gastroenterology*, 133(4), 1370-3.
- Bonaz, B. (2010). "[Brain-gut interactions]." *Rev Med Interne*, 31(8), 581-5.
- Boon, P., Raedt, R., de Herdt, V., Wyckhuys, T., and Vonck, K. (2009). "Electrical stimulation for the treatment of epilepsy." *Neurotherapeutics*, 6(2), 218-27.
- Boost, K. A., Leipold, T., Scheiermann, P., Hoegl, S., Sadik, C. D., Hofstetter, C., and Zwissler, B. (2009). "Sevoflurane and isoflurane decrease TNF-alpha-induced gene expression in human monocytic THP-1 cells: potential role of intracellular IkappaBalpha regulation." *Int J Mol Med*, 23(5), 665-71.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Nardi, D., Zhang, M., Yang, H., Ombrellino, M., and Tracey, K. J. (2000a). "Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation." *Auton Neurosci*, 85(1-3), 141-7.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W., and Tracey, K. J. (2000b). "Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin." *Nature*, 405(6785), 458-62.
- Brandon, K. W., and Rand, M. J. (1961). "Acetylcholine and the sympathetic innervation of the spleen." *J Physiol*, 157(1), 18-32.
- Bratton, B. O., Martelli, D., McKinley, M. J., Trevaks, D., Anderson, C. R., and McAllen, R. M. (2012). "Neural regulation of inflammation: no neural connection from vagus to splenic sympathetic neurons." *Exp Physiol*.
- Buijs, R. M., van der Vliet, J., Garidou, M. L., Huitinga, I., and Escobar, C. (2008). "Spleen vagal denervation inhibits the production of antibodies to circulating antigens." *PLoS One*, 3(9), e3152.
- Buller, K. M. (2001). "Role of circumventricular organs in pro-inflammatory cytokine-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28(7), 581-9.
- Casazza, M., Avanzini, G., Ferroli, P., Villani, F., and Broggi, G. (2006). "Vagal nerve stimulation: relationship between outcome and electroclinical seizure pattern." *Seizure*, 15(3), 198-207.
- Chatila, T. A. (2005). "Role of regulatory T cells in human diseases." *J Allergy Clin Immunol*, 116(5), 949-59; quiz 960.

- Chen, X. H., Itoh, M., Sun, W., Miki, T., and Takeuchi, Y. (1996). "Localization of sympathetic and parasympathetic neurons innervating pancreas and spleen in the cat." *J Auton Nerv Syst*, 59(1-2), 12-6.
- Chomarat, P., Rissoan, M. C., Banchereau, J., and Miossec, P. (1993). "Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes." *J Exp Med*, 177(2), 523-7.
- Chou, R. C., Stinson, M. W., Noble, B. K., and Spengler, R. N. (1996). "Beta-adrenergic receptor regulation of macrophage-derived tumor necrosis factor-alpha production from rats with experimental arthritis." *J Neuroimmunol*, 67(1), 7-16.
- Colicchio, G., Policicchio, D., Barbati, G., Cesaroni, E., Fuggetta, F., Meglio, M., Papacci, F., Rychlicki, F., Scerrati, M., and Zamponi, N. (2010). "Vagal nerve stimulation for drug-resistant epilepsies in different age, aetiology and duration." *Childs Nerv Syst*, 26(6), 811-9.
- Collins, S. M. (2001). "Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280(3), G315-8.
- Corvaisier-Chiron, M., and Beauvillain, C. (2010). "T regulator and Th17 lymphocytes : physiological and pathological functions." *Revue Francophone des Laboratoires*, 2010(424), 31-40.
- Dagli, M. S., Ingeholm, J. E., and Haxby, J. V. (1999). "Localization of cardiac-induced signal change in fMRI." *Neuroimage*, 9(4), 407-15.
- Dantzer, R. (1994). "How do cytokines say hello to the brain? Neural versus humoral mediation." *Eur Cytokine Netw*, 5(3), 271-3.
- Dantzer, R., and Kelley, K. W. (2007). "Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior." *Brain Behav Immun*, 21(2), 153-60.
- Dantzer, R., and Wollman, E. E. (2003). "[Relationships between the brain and the immune system]." *J Soc Biol*, 197(2), 81-8.
- de Jonge, W. J., and Ulloa, L. (2007). "The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation." *Br J Pharmacol*, 151(7), 915-29.
- de Jonge, W. J., van der Zanden, E. P., The, F. O., Bijlsma, M. F., van Westerloo, D. J., Bennink, R. J., Berthoud, H. R., Uematsu, S., Akira, S., van den Wijngaard, R. M., and Boeckstaens, G. E. (2005). "Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway." *Nat Immunol*, 6(8), 844-51.
- de Munck, J. C., Goncalves, S. I., Faes, T. J., Kuijter, J. P., Pouwels, P. J., Heethaar, R. M., and Lopes da Silva, F. H. (2008). "A study of the brain's resting state based on alpha band power, heart rate and fMRI." *Neuroimage*, 42(1), 112-21.
- De Rosa, M. J., Esandi Mdel, C., Garelli, A., Rayes, D., and Bouzat, C. (2005). "Relationship between alpha 7 nAChR and apoptosis in human lymphocytes." *J Neuroimmunol*, 160(1-2), 154-61.
- de Rossi, L. W., Brueckmann, M., Rex, S., Barderschneider, M., Buhre, W., and Rossaint, R. (2004). "Xenon and isoflurane differentially modulate lipopolysaccharide-induced activation of the nuclear transcription factor KB and production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in monocytes." *Anesth Analg*, 98(4), 1007-12, table of contents.
- de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., and de Vries, J. E. (1991). "Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression." *J Exp Med*, 174(4), 915-24.
- Deby-Dupont, G., Grulke, S., Caudron, I., Mathy-Hartert, M., Benbarek, H., Deby, C., Lamy, M., and Serteyn, D. (1998). "Equine neutrophil myeloperoxidase in plasma: design of a radio-immunoassay and first results in septic pathologies." *Vet Immunol Immunopathol*, 66(3-4), 257-71.
- Dedeurwaerdere, S., Cornelissen, B., Van Laere, K., Vonck, K., Achten, E., Slegers, G., and Boon, P. (2005). "Small animal positron emission tomography during vagus nerve stimulation in rats: a pilot study." *Epilepsy Res*, 67(3), 133-41.

- Dietrich, S., Smith, J., Scherzinger, C., Hofmann-Preiss, K., Freitag, T., Eisenkolb, A., and Ringler, R. (2008). "[A novel transcutaneous vagus nerve stimulation leads to brainstem and cerebral activations measured by functional MRI]." *Biomed Tech (Berl)*, 53(3), 104-11.
- Drisdell, R. C., and Green, W. N. (2000). "Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers." *J Neurosci*, 20(1), 133-9.
- Eaden, J. A., Abrams, K. R., and Mayberry, J. F. (2001). "The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis." *Gut*, 48(4), 526-35.
- Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P., and Vizi, E. S. (2000). "The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system." *Pharmacol Rev*, 52(4), 595-638.
- Filippini, P., Cesario, A., Fini, M., Locatelli, F., and Rutella, S. (2012). "The yin and yang of non-neuronal proportional, variant7-nicotinic receptors in inflammation and autoimmunity." *Curr Drug Targets*.
- Fiocchi, C. (1998). "Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis." *Gastroenterology*, 115(1), 182-205.
- Flondor, M., Hofstetter, C., Boost, K. A., Betz, C., Homann, M., and Zwissler, B. (2008). "Isoflurane inhalation after induction of endotoxemia in rats attenuates the systemic cytokine response." *Eur Surg Res*, 40(1), 1-6.
- Freeman, H. J. (2003). "Natural history and clinical behavior of Crohn's disease extending beyond two decades." *J Clin Gastroenterol*, 37(3), 216-9.
- Friston, K. J., Harrison, L., and Penny, W. (2003). "Dynamic causal modelling." *Neuroimage*, 19(4), 1273-302.
- Friston, K. J., Holmes, A. P., and Worsley, K. J. (1999). "How many subjects constitute a study?" *Neuroimage*, 10(1), 1-5.
- Fritz, T., Niederreiter, L., Adolph, T., Blumberg, R. S., and Kaser, A. (2011). "Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge." *Gut*, 60(11), 1580-8.
- Funakoshi, T., Yamashita, K., Ichikawa, N., Fukai, M., Suzuki, T., Goto, R., Oura, T., Kobayashi, N., Katsurada, T., Ichihara, S., Ozaki, M., Umezawa, K., and Todo, S. (2012). "A novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice." *J Crohns Colitis*, 6(2), 215-25.
- Galvis, G., Lips, K. S., and Kummer, W. (2006). "Expression of nicotinic acetylcholine receptors on murine alveolar macrophages." *J Mol Neurosci*, 30(1-2), 107-8.
- Gareau, M. G., Silva, M. A., and Perdue, M. H. (2008). "Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage." *Curr Mol Med*, 8(4), 274-81.
- Gaykema, R. P., Dijkstra, I., and Tilders, F. J. (1995). "Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion." *Endocrinology*, 136(10), 4717-20.
- George, M. S., Sackeim, H. A., Rush, A. J., Marangell, L. B., Nahas, Z., Husain, M. M., Lisanby, S., Burt, T., Goldman, J., and Ballenger, J. C. (2000). "Vagus nerve stimulation: a new tool for brain research and therapy." *Biol Psychiatry*, 47(4), 287-95.
- Ghia, J. E., Blennerhassett, P., and Collins, S. M. (2007). "Vagus nerve integrity and experimental colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293(3), G560-7.
- Ghia, J. E., Blennerhassett, P., and Collins, S. M. (2008). "Impaired parasympathetic function increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression." *J Clin Invest*, 118(6), 2209-18.
- Ghia, J. E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E. F., and Collins, S. M. (2006). "The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model." *Gastroenterology*, 131(4), 1122-30.
- Gray, M. A., Minati, L., Harrison, N. A., Gianaros, P. J., Napadow, V., and Critchley, H. D. (2009). "Physiological recordings: basic concepts and implementation during functional magnetic resonance imaging." *Neuroimage*, 47(3), 1105-15.

- Groves, D. A., and Brown, V. J. (2005). "Vagal nerve stimulation: a review of its applications and potential mechanisms that mediate its clinical effects." *Neurosci Biobehav Rev*, 29(3), 493-500.
- Guarini, S., Altavilla, D., Cainazzo, M. M., Giuliani, D., Bigiani, A., Marini, H., Squadrito, G., Minutoli, L., Bertolini, A., Marini, R., Adamo, E. B., Venuti, F. S., and Squadrito, F. (2003). "Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock." *Circulation*, 107(8), 1189-94.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., and Aebersold, R. (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." *Mol Cell Biol*, 19(3), 1720-30.
- Handforth, A., DeGiorgio, C. M., Schachter, S. C., Uthman, B. M., Naritoku, D. K., Tecoma, E. S., Henry, T. R., Collins, S. D., Vaughn, B. V., Gilmartin, R. C., Labar, D. R., Morris, G. L., 3rd, Salinsky, M. C., Osorio, I., Ristanovic, R. K., Labiner, D. M., Jones, J. C., Murphy, J. V., Ney, G. C., and Wheless, J. W. (1998). "Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial." *Neurology*, 51(1), 48-55.
- Hansen, M. K., O'Connor, K. A., Goehler, L. E., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2001). "The contribution of the vagus nerve in interleukin-1beta-induced fever is dependent on dose." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280(4), R929-34.
- Harding, A. (2004). "The serotonin and tachykinin systems", in G. Paxinos, (ed.), *The Rat Nervous System*. San Diego: Elsevier Academic Press, pp. 1205-1256.
- Haroon, E., Raison, C. L., and Miller, A. H. (2012). "Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior." *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 137-62.
- Heck, C., Helmers, S. L., and DeGiorgio, C. M. (2002). "Vagus nerve stimulation therapy, epilepsy, and device parameters: scientific basis and recommendations for use." *Neurology*, 59(6 Suppl 4), S31-7.
- Hofer, D., Puschel, B., and Drenckhahn, D. (1996). "Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(13), 6631-4.
- Hofstetter, C., Boost, K. A., Hoegl, S., Flondor, M., Scheller, B., Muhl, H., Pfeilschifter, J., and Zwissler, B. (2007). "Norepinephrine and vasopressin counteract anti-inflammatory effects of isoflurane in endotoxemic rats." *Int J Mol Med*, 20(4), 597-604.
- Hofstetter, C., Flondor, M., Boost, K. A., Koehler, P., Bosmann, M., Pfeilschifter, J., Zwissler, B., and Muhl, H. (2005). "A brief exposure to isoflurane (50 s) significantly impacts on plasma cytokine levels in endotoxemic rats." *Int Immunopharmacol*, 5(10), 1519-22.
- Hommel, D., van den Blink, B., Plasse, T., Bartelsman, J., Xu, C., Macpherson, B., Tytgat, G., Peppelenbosch, M., and Van Deventer, S. (2002). "Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease." *Gastroenterology*, 122(1), 7-14.
- Hotchkiss, R. S., and Karl, I. E. (2003). "The pathophysiology and treatment of sepsis." *N Engl J Med*, 348(2), 138-50.
- Huston, J. M., Ochani, M., Rosas-Ballina, M., Liao, H., Ochani, K., Pavlov, V. A., Gallowitsch-Puerta, M., Ashok, M., Czura, C. J., Foxwell, B., Tracey, K. J., and Ulloa, L. (2006). "Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis." *J Exp Med*, 203(7), 1623-8.
- Huston, J. M., Rosas-Ballina, M., Xue, X., Dowling, O., Ochani, K., Ochani, M., Yeboah, M. M., Chatterjee, P. K., Tracey, K. J., and Metz, C. N. (2009). "Cholinergic neural signals to the spleen down-regulate leukocyte trafficking via CD11b." *J Immunol*, 183(1), 552-9.
- Huston, J. M., and Tracey, K. J. (2011). "The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy." *J Intern Med*, 269(1), 45-53.



- Huston, J. M., Wang, H., Ochani, M., Ochani, K., Rosas-Ballina, M., Gallowitsch-Puerta, M., Ashok, M., Yang, L., Tracey, K. J., and Yang, H. (2008). "Splenectomy protects against sepsis lethality and reduces serum HMGB1 levels." *J Immunol*, 181(5), 3535-9.
- Irwin, M. R., and Cole, S. W. (2011). "Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems." *Nat Rev Immunol*, 11(9), 625-32.
- Jakubik, J., Janickova, H., Randakova, A., El-Fakahany, E. E., and Dolezal, V. (2011). "Subtype differences in pre-coupling of muscarinic acetylcholine receptors." *PLoS One*, 6(11), e27732.
- Jonsson, M., Norrgard, O., and Forsgren, S. (2007). "Presence of a marked nonneuronal cholinergic system in human colon: study of normal colon and colon in ulcerative colitis." *Inflamm Bowel Dis*, 13(11), 1347-56.
- Karimi, K., Bienenstock, J., Wang, L., and Forsythe, P. (2010). "The vagus nerve modulates CD4+ T cell activity." *Brain Behav Immun*, 24(2), 316-23.
- Kawashima, K., and Fujii, T. (2003). "The lymphocytic cholinergic system and its biological function." *Life Sci*, 72(18-19), 2101-9.
- Kees, M. G., Pongratz, G., Kees, F., Scholmerich, J., and Straub, R. H. (2003). "Via beta-adrenoceptors, stimulation of extrasplenic sympathetic nerve fibers inhibits lipopolysaccharide-induced TNF secretion in perfused rat spleen." *J Neuroimmunol*, 145(1-2), 77-85.
- Kim, M., Park, S. W., D'Agati, V. D., and Lee, H. T. (2012). "Isoflurane post-conditioning protects against intestinal ischemia-reperfusion injury and multiorgan dysfunction via transforming growth factor-beta1 generation." *Ann Surg*, 255(3), 492-503.
- Kostenis, E., Zeng, F. Y., and Wess, J. (1998). "Structure-function analysis of muscarinic acetylcholine receptors." *J Physiol Paris*, 92(3-4), 265-8.
- Kraal, G. (1992). "Cells in the marginal zone of the spleen." *Int Rev Cytol*, 132, 31-74.
- Kronenberg, M. (2005). "Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes." *Annu Rev Immunol*, 23, 877-900.
- Labar, D. (2004). "Vagus nerve stimulation for 1 year in 269 patients on unchanged antiepileptic drugs." *Seizure*, 13(6), 392-8.
- Lane, R. D., Waldstein, S. R., Chesney, M. A., Jennings, J. R., Lovallo, W. R., Kozel, P. J., Rose, R. M., Drossman, D. A., Schneiderman, N., Thayer, J. F., and Cameron, O. G. (2009). "The rebirth of neuroscience in psychosomatic medicine, Part I: historical context, methods, and relevant basic science." *Psychosom Med*, 71(2), 117-34.
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med*, 201(2), 233-40.
- Larauche, M., Mulak, A., and Tache, Y. (2011). "Stress-related alterations of visceral sensation: animal models for irritable bowel syndrome study." *J Neurogastroenterol Motil*, 17(3), 213-34.
- Lee, H. T., Ota-Setlik, A., Fu, Y., Nasr, S. H., and Emala, C. W. (2004). "Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo." *Anesthesiology*, 101(6), 1313-24.
- Lees, R. K., Ferrero, I., and MacDonald, H. R. (2001). "Tissue-specific segregation of TCRgamma delta+ NKT cells according to phenotype TCR repertoire and activation status: parallels with TCR alphabeta+NKT cells." *Eur J Immunol*, 31(10), 2901-9.
- Libert, C. (2003). "Inflammation: A nervous connection." *Nature*, 421(6921), 328-9.
- Liu, W. C., Mosier, K., Kalnin, A. J., and Marks, D. (2003). "BOLD fMRI activation induced by vagus nerve stimulation in seizure patients." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74(6), 811-3.
- Lomarev, M., Denslow, S., Nahas, Z., Chae, J. H., George, M. S., and Bohning, D. E. (2002). "Vagus nerve stimulation (VNS) synchronized BOLD fMRI suggests that VNS in depressed adults has frequency/dose dependent effects." *J Psychiatr Res*, 36(4), 219-27.
- Lukas, R. J., Changeux, J. P., Le Novere, N., Albuquerque, E. X., Balfour, D. J., Berg, D. K., Bertrand, D., Chiappinelli, V. A., Clarke, P. B., Collins, A. C., Dani, J. A., Grady, S. R., Kellar, K. J., Lindstrom, J. M., Marks, M. J., Quik, M., Taylor, P. W., and Wonnacott, S. (1999). "International Union of

- Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits." *Pharmacol Rev*, 51(2), 397-401.
- Mamalaki, A., and Tzartos, S. J. (1994). "Nicotinic acetylcholine receptor: structure, function and main immunogenic region." *Adv Neuroimmunol*, 4(4), 339-54.
- Marubio, L. M., and Changeux, J. (2000). "Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function." *Eur J Pharmacol*, 393(1-3), 113-21.
- Matsuda, J. L., Mallevaey, T., Scott-Browne, J., and Gapin, L. (2008). "CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system." *Curr Opin Immunol*, 20(3), 358-68.
- Matsunaga, K., Klein, T. W., Friedman, H., and Yamamoto, Y. (2001). "Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine." *J Immunol*, 167(11), 6518-24.
- Matthay, M. A., and Ware, L. B. (2004). "Can nicotine treat sepsis?" *Nat Med*, 10(11), 1161-2.
- Mauguiere, F. (1996). "[Intermittent chronic stimulation of the vagus nerve: a last chance for palliative treatment of drug-resistant epileptic seizures?]." *Rev Neurol (Paris)*, 152(4), 231-3.
- Mebius, R. E., and Kraal, G. (2005). "Structure and function of the spleen." *Nat Rev Immunol*, 5(8), 606-16.
- Meregnani, J., Clarencon, D., Vivier, M., Peinnequin, A., Mouret, C., Sinniger, V., Picq, C., Job, A., Canini, F., Jacquier-Sarlin, M., and Bonaz, B. (2011). "Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease." *Auton Neurosci*, 160(1-2), 82-9.
- Miceli, P. C., and Jacobson, K. (2003). "Cholinergic pathways modulate experimental dinitrobenzene sulfonic acid colitis in rats." *Auton Neurosci*, 105(1), 16-24.
- Mitsuhata, H., Shimizu, R., and Yokoyama, M. M. (1995). "Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells." *Int J Immunopharmacol*, 17(6), 529-34.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., and Unwin, N. (2003). "Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore." *Nature*, 423(6943), 949-55.
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., and Wallace, J. L. (1989). "Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon." *Gastroenterology*, 96(3), 795-803.
- Mosmann, T. R., Schumacher, J. H., Street, N. F., Budd, R., O'Garra, A., Fong, T. A., Bond, M. W., Moore, K. W., Sher, A., and Fiorentino, D. F. (1991). "Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells." *Immunol Rev*, 123, 209-29.
- Mu, J., Xie, K., Hou, L., Peng, D., Shang, L., Ji, G., Li, J., Lu, Y., and Xiong, L. (2010). "Subanesthetic dose of isoflurane protects against zymosan-induced generalized inflammation and its associated acute lung injury in mice." *Shock*, 34(2), 183-9.
- Nahas, Z., Teneback, C., Chae, J. H., Mu, Q., Molnar, C., Kozel, F. A., Walker, J., Anderson, B., Koola, J., Kose, S., Lomarev, M., Bohning, D. E., and George, M. S. (2007). "Serial vagus nerve stimulation functional MRI in treatment-resistant depression." *Neuropsychopharmacology*, 32(8), 1649-60.
- Nance, D. M., and Sanders, V. M. (2007). "Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007)." *Brain Behav Immun*, 21(6), 736-45.
- Narayanan, J. T., Watts, R., Haddad, N., Labar, D. R., Li, P. M., and Filippi, C. G. (2002). "Cerebral activation during vagus nerve stimulation: a functional MR study." *Epilepsia*, 43(12), 1509-14.
- Naritoku, D. K., Terry, W. J., and Helfert, R. H. (1995). "Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve." *Epilepsy Res*, 22(1), 53-62.
- Nathan, C. (2002). "Points of control in inflammation." *Nature*, 420(6917), 846-52.
- Nikolaus, S., and Schreiber, S. (2007). "Diagnostics of inflammatory bowel disease." *Gastroenterology*, 133(5), 1670-89.

- Nizri, E., Hamra-Amitay, Y., Sicsic, C., Lavon, I., and Brenner, T. (2006). "Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors." *Neuropharmacology*, 50(5), 540-7.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." *Gastroenterology*, 98(3), 694-702.
- Ordelman, S. C., Kornet, L., Cornelussen, R., Buschman, H. P., and Veltink, P. H. (2010). "An indirect component in the evoked compound action potential of the vagal nerve." *J Neural Eng*, 7(6), 066001.
- Osharina, V., Bagaev, V., Wallois, F., and 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, Y. H., Zheng, C. Q., Yang, X. Z., and Zhang, W. J. (2007). "Increased expression and activation of IL-12-induced Stat4 signaling in the mucosa of ulcerative colitis patients." *Cell Immunol*, 248(2), 115-20.
- Pardo, J. V., Sheikh, S. A., Kuskowski, M. A., Surerus-Johnson, C., Hagen, M. C., Lee, J. T., Rittberg, B. R., and Adson, D. E. (2007). "Weight loss during chronic, cervical vagus nerve stimulation in depressed patients with obesity: an observation." *Int J Obes (Lond)*, 31(11), 1756-9.
- Parrish, W. R., Rosas-Ballina, M., Gallowitsch-Puerta, M., Ochani, M., Ochani, K., Yang, L. H., Hudson, L., Lin, X., Patel, N., Johnson, S. M., Chavan, S., Goldstein, R. S., Czura, C. J., Miller, E. J., Al-Abed, Y., Tracey, K. J., and Pavlov, V. A. (2008). "Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling." *Mol Med*, 14(9-10), 567-74.
- Pavlov, V. A., Ochani, M., Yang, L. H., Gallowitsch-Puerta, M., Ochani, K., Lin, X., Levi, J., Parrish, W. R., Rosas-Ballina, M., Czura, C. J., Larosa, G. J., Miller, E. J., Tracey, K. J., and Al-Abed, Y. (2007). "Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis." *Crit Care Med*, 35(4), 1139-44.
- Pavlov, V. A., and Tracey, K. J. (2005). "The cholinergic anti-inflammatory pathway." *Brain Behav Immun*, 19(6), 493-9.
- Pavlov, V. A., Wang, H., Czura, C. J., Friedman, S. G., and Tracey, K. J. (2003). "The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation." *Mol Med*, 9(5-8), 125-34.
- Peinnequin, A., Mouret, C., Birot, O., Alonso, A., Mathieu, J., Clarencon, D., Agay, D., Chancerelle, Y., and 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., Dantzer, C., Canini, F., Mathieu, N., and Bonaz, B. (2010). "Psychological adjustment and autonomic disturbances in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome." *Psychoneuroendocrinology*, 35(5), 653-62.
- Picq, C., Reyt, S., Sinniger, V., Clarencon, D., Bonaz, B., and David, O. (2010). "Dynamic Causal Modelling and physiological confounds: a functional MRI study of vagus nerve stimulation." *Neuroimage*, 52(4), 1456-64.
- Plachinta, R. V., Hayes, J. K., Cerilli, L. A., and Rich, G. F. (2003). "Isoflurane pretreatment inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rats." *Anesthesiology*, 98(1), 89-95.
- Porcher, C., Sinniger, V., Juhem, A., Mouchet, P., and Bonaz, B. (2004). "Neuronal activity and CRF receptor gene transcription in the brains of rats with colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287(4), G803-14.
- Powley, T. L., and Phillips, R. J. (2002). "Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? I. Morphology and topography of vagal afferents innervating the GI tract." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283(6), G1217-25.
- Randall, W. C., and Ardell, J. L. (1985). "Selective parasympathectomy of automatic and conductile tissues of the canine heart." *Am J Physiol*, 248(1 Pt 2), H61-8.

- Ratcliffe, E. M., Farrar, N. R., and Fox, E. A. (2011). "Development of the vagal innervation of the gut: steering the wandering nerve." *Neurogastroenterol Motil*, 23(10), 898-911.
- Reber, S. O., Obermeier, F., Straub, R. H., Falk, W., and Neumann, I. D. (2006). "Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration." *Endocrinology*, 147(10), 4968-76.
- Reichlin, S. (1993). "Neuroendocrine-immune interactions." *N Engl J Med*, 329(17), 1246-53.
- Rizvi, S. J., Donovan, M., Giacobbe, P., Placenza, F., Rotzinger, S., and Kennedy, S. H. (2011). "Neurostimulation therapies for treatment resistant depression: a focus on vagus nerve stimulation and deep brain stimulation." *Int Rev Psychiatry*, 23(5), 424-36.
- Roederer, M. (2001). "Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats." *Cytometry*, 45(3), 194-205.
- Roosevelt, R. W., Smith, D. C., Clough, R. W., Jensen, R. A., and Browning, R. A. (2006). "Increased extracellular concentrations of norepinephrine in cortex and hippocampus following vagus nerve stimulation in the rat." *Brain Res*, 1119(1), 124-32.
- Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Parrish, W. R., Ochani, K., Harris, Y. T., Huston, J. M., Chavan, S., and Tracey, K. J. (2008). "Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(31), 11008-13.
- Rosas-Ballina, M., Olofsson, P. S., Ochani, M., Valdes-Ferrer, S. I., Levine, Y. A., Reardon, C., Tusche, M. W., Pavlov, V. A., Andersson, U., Chavan, S., Mak, T. W., and Tracey, K. J. (2011). "Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit." *Science*, 334(6052), 98-101.
- Rosas-Ballina, M., and Tracey, K. J. (2009). "The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity." *Neuron*, 64(1), 28-32.
- Saeed, R. W., Varma, S., Peng-Nemeroff, T., Sherry, B., Balakhaneh, D., Huston, J., Tracey, K. J., Al-Abed, Y., and Metz, C. N. (2005). "Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation." *J Exp Med*, 201(7), 1113-23.
- Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., and Yamamoto-Furusho, J. K. (2008). "Role of cytokines in inflammatory bowel disease." *World J Gastroenterol*, 14(27), 4280-8.
- Saper, C. B. (2002). "The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation." *Annu Rev Neurosci*, 25, 433-69.
- Saper, C. B. (2004). "Central autonomic system", in G. Paxinos, (ed.), *The Rat Nervous System*. San Diego: Elsevier Academic Press, pp. 761-796.
- Sartor, R. B. (2006). "Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis." *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 3(7), 390-407.
- Sato, K. Z., Fujii, T., Watanabe, Y., Yamada, S., Ando, T., Kazuko, F., and Kawashima, K. (1999). "Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines." *Neurosci Lett*, 266(1), 17-20.
- Saubermann, L. J., Beck, P., De Jong, Y. P., Pitman, R. S., Ryan, M. S., Kim, H. S., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P., Hagen, S. J., Kanauchi, O., Motoki, K., Sakai, T., Terhorst, C., Koezuka, Y., Podolsky, D. K., and Blumberg, R. S. (2000). "Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice." *Gastroenterology*, 119(1), 119-28.
- Schlaepfer, T. E., Frick, C., Zobel, A., Maier, W., Heuser, I., Bajbouj, M., O'Keane, V., Corcoran, C., Adolfsson, R., Trimble, M., Rau, H., Hoff, H. J., Padberg, F., Muller-Siecheneder, F., Audenaert, K., Van den Abbeele, D., Stanga, Z., and Hasdemir, M. (2008). "Vagus nerve stimulation for depression: efficacy and safety in a European study." *Psychol Med*, 38(5), 651-61.
- Schultz, M., Tonkonogy, S. L., Sellon, R. K., Veltkamp, C., Godfrey, V. L., Kwon, J., Grenther, W. B., Balish, E., Horak, I., and Sartor, R. B. (1999). "IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation." *Am J Physiol*, 276(6 Pt 1), G1461-72.

- Schweinhardt, P., Fransson, P., Olson, L., Spenger, C., and Andersson, J. L. (2003). "A template for spatial normalisation of MR images of the rat brain." *J Neurosci Methods*, 129(2), 105-13.
- Sharma, P., Makharia, G. K., Ahuja, V., Dwivedi, S. N., and Deepak, K. K. (2009). "Autonomic dysfunctions in patients with inflammatory bowel disease in clinical remission." *Dig Dis Sci*, 54(4), 853-61.
- Shibolet, O., Kalish, Y., Klein, A., Alper, R., Zolotarov, L., Thalenfeld, B., Engelhardt, D., Rabbani, E., and Ilan, Y. (2004). "Adoptive transfer of ex vivo immune-programmed NKT lymphocytes alleviates immune-mediated colitis." *J Leukoc Biol*, 75(1), 76-86.
- Sinniger, V., Mouchet, P., and 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(23), 2927-41.
- Skok, M., Grailhe, R., Agenes, F., and Changeux, J. P. (2006). "The role of nicotinic acetylcholine receptors in lymphocyte development." *J Neuroimmunol*, 171(1-2), 86-98.
- Snoek, S. A., Verstege, M. I., van der Zanden, E. P., Deeks, N., Bulmer, D. C., Skynner, M., Lee, K., Te Velde, A. A., Boeckstaens, G. E., and de Jonge, W. J. (2010). "Selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists worsen disease in experimental colitis." *Br J Pharmacol*, 160(2), 322-33.
- Steiniger, B., and Barth, P. (2000). "Microanatomy and function of the spleen." *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 151, III-IX, 1-101.
- Sternberg, E. M. (1997). "Neural-immune interactions in health and disease." *J Clin Invest*, 100(11), 2641-7.
- Sternberg, E. M. (2006). "Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens." *Nat Rev Immunol*, 6(4), 318-28.
- Strober, W., Fuss, I. J., and Blumberg, R. S. (2002). "The immunology of mucosal models of inflammation." *Annu Rev Immunol*, 20, 495-549.
- Sucholeiki, R., Alsaadi, T. M., Morris, G. L., 3rd, Ulmer, J. L., Biswal, B., and Mueller, W. M. (2002). "fMRI in patients implanted with a vagal nerve stimulator." *Seizure*, 11(3), 157-62.
- Tang, L. Y., Nabalamba, A., Graff, L. A., and Bernstein, C. N. (2008). "A comparison of self-perceived health status in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome patients from a Canadian national population survey." *Can J Gastroenterol*, 22(5), 475-83.
- Tateishi, H., Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Tomoyose, M., and Tanikawa, K. (1997). "Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability." *Digestion*, 58(3), 271-81.
- Taylor, C. T., and Keely, S. J. (2007). "The autonomic nervous system and inflammatory bowel disease." *Auton Neurosci*, 133(1), 104-14.
- Thayer, J. F., and Sternberg, E. M. (2010). "Neural aspects of immunomodulation: focus on the vagus nerve." *Brain Behav Immun*, 24(8), 1223-8.
- Tracey, K. J. (2002). "The inflammatory reflex." *Nature*, 420(6917), 853-9.
- Tracey, K. J. (2007). "Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway." *J Clin Invest*, 117(2), 289-96.
- Tracey, K. J. (2009). "Reflex control of immunity." *Nat Rev Immunol*, 9(6), 418-28.
- Tracey, K. J., Morgello, S., Koblin, B., Fahey, T. J., 3rd, Fox, J., Aledo, A., Manogue, K. R., and Cerami, A. (1990). "Metabolic effects of cachectin/tumor necrosis factor are modified by site of production. Cachectin/tumor necrosis factor-secreting tumor in skeletal muscle induces chronic cachexia, while implantation in brain induces predominantly acute anorexia." *J Clin Invest*, 86(6), 2014-24.
- Tschaikowsky, K., Ritter, J., Schroppel, K., and Kuhn, M. (2000). "Volatile anesthetics differentially affect immunostimulated expression of inducible nitric oxide synthase: role of intracellular calcium." *Anesthesiology*, 92(4), 1093-102.
- Ulloa, L. (2005). "The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway." *Nat Rev Drug Discov*, 4(8), 673-84.

- Ulloa, L., and Tracey, K. J. (2005). "The "cytokine profile": a code for sepsis." *Trends Mol Med*, 11(2), 56-63.
- Van Assche, G., and Rutgeerts, P. (2000). "Anti-TNF agents in Crohn's disease." *Expert Opin Investig Drugs*, 9(1), 103-111.
- van der Zanden, E. P., Snoek, S. A., Heinsbroek, S. E., Stanisor, O. I., Verseijden, C., Boeckxstaens, G. E., Peppelenbosch, M. P., Greaves, D. R., Gordon, S., and De Jonge, W. J. (2009). "Vagus nerve activity augments intestinal macrophage phagocytosis via nicotinic acetylcholine receptor alpha4beta2." *Gastroenterology*, 137(3), 1029-39, 1039 e1-4.
- Van Kaer, L. (2007). "NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions." *Curr Opin Immunol*, 19(3), 354-64.
- Van Kaer, L., Parekh, V. V., and Wu, L. (2011). "Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity." *Cell Tissue Res*, 343(1), 43-55.
- Van Limbergen, J., Wilson, D. C., and Satsangi, J. (2009). "The genetics of Crohn's disease." *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 10, 89-116.
- van Westerloo, D. J., Giebelen, I. A., Florquin, S., Bruno, M. J., Larosa, G. J., Ulloa, L., Tracey, K. J., and van der Poll, T. (2006). "The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice." *Gastroenterology*, 130(6), 1822-30.
- Veltkamp, C., Anstaett, M., Wahl, K., Moller, S., Gangl, S., Bachmann, O., Hardtke-Wolenski, M., Langer, F., Stremmel, W., Manns, M. P., Schulze-Osthoff, K., and Bantel, H. (2011). "Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNFalpha treatment." *Gut*, 60(10), 1345-53.
- Vida, G., Pena, G., Deitch, E. A., and Ulloa, L. (2011). "alpha7-cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine." *J Immunol*, 186(7), 4340-6.
- Villiger, Y., Szanto, I., Jaconi, S., Blanchet, C., Buisson, B., Krause, K. H., Bertrand, D., and Romand, J. A. (2002). "Expression of an alpha7 duplicate nicotinic acetylcholine receptor-related protein in human leukocytes." *J Neuroimmunol*, 126(1-2), 86-98.
- Wang, H., Liao, H., Ochani, M., Justiniani, M., Lin, X., Yang, L., Al-Abed, Y., Metz, C., Miller, E. J., Tracey, K. J., and Ulloa, L. (2004). "Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis." *Nat Med*, 10(11), 1216-21.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J., and Tracey, K. J. (2003). "Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation." *Nature*, 421(6921), 384-8.
- Watkins, L. R., Goehler, L. E., Relton, J. K., Tartaglia, N., Silbert, L., Martin, D., and Maier, S. F. (1995a). "Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication." *Neurosci Lett*, 183(1-2), 27-31.
- Watkins, L. R., Maier, S. F., and Goehler, L. E. (1995b). "Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms." *Life Sci*, 57(11), 1011-26.
- Weber, R., Ramos-Cabrer, P., Wiedermann, D., van Camp, N., and Hoehn, M. (2006). "A fully noninvasive and robust experimental protocol for longitudinal fMRI studies in the rat." *Neuroimage*, 29(4), 1303-10.
- Wheeler, M., De Herdt, V., Vonck, K., Gilbert, K., Manem, S., Mackenzie, T., Jobst, B., Roberts, D., Williamson, P., Van Roost, D., Boon, P., and Thadani, V. (2011). "Efficacy of vagus nerve stimulation for refractory epilepsy among patient subgroups: a re-analysis using the Engel classification." *Seizure*, 20(4), 331-5.
- Wirtz, S., Finotto, S., Kanzler, S., Lohse, A. W., Blessing, M., Lehr, H. A., Galle, P. R., and Neurath, M. F. (1999). "Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens." *J Immunol*, 162(4), 1884-8.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., and Neurath, M. F. (2007). "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." *Nat Protoc*, 2(3), 541-6.

- Wise, R. G., Ide, K., Poulin, M. J., and Tracey, I. (2004). "Resting fluctuations in arterial carbon dioxide induce significant low frequency variations in BOLD signal." *Neuroimage*, 21(4), 1652-64.
- Wong, M. L., Rettori, V., al-Shekhlee, A., Bongiorno, P. B., Canteros, G., McCann, S. M., Gold, P. W., and Licinio, J. (1996). "Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation." *Nat Med*, 2(5), 581-4.
- Wu, L., and Van Kaer, L. (2009). "Natural killer T cells and autoimmune disease." *Curr Mol Med*, 9(1), 4-14.
- Wu, L., and Van Kaer, L. (2011). "Natural killer T cells in health and disease." *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, 236-51.
- Wyatt, J., Oberhuber, G., Pongratz, S., Puspok, A., Moser, G., Novacek, G., Lochs, H., and Vogelsang, H. (1997). "Increased gastric and intestinal permeability in patients with Crohn's disease." *Am J Gastroenterol*, 92(10), 1891-6.
- Xu, F., and Frazier, D. T. (1995). "Medullary respiratory neuronal activity modulated by stimulation of the fastigial nucleus of the cerebellum." *Brain Res*, 705(1-2), 53-64.
- Yoshikawa, H., Kurokawa, M., Ozaki, N., Nara, K., Atou, K., Takada, E., Kamochi, H., and Suzuki, N. (2006). "Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7." *Clin Exp Immunol*, 146(1), 116-23.
- Young, H. M. (2005). "Neural stem cell therapy and gastrointestinal biology." *Gastroenterology*, 129(6), 2092-5.