

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Neurosciences

Par

Chloë LEFÈVRE, née NÉNARD

Remodelage du système nerveux entérique et de la barrière épithéliale intestinale après lésion médullaire

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 12/12/2022

Unités de recherche : INSERM TENS U 1235, UIC20 du service universitaire de MPR Neurologique du CHU de Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Pierre Denys	PU-PH, Université de Versailles St Quentin en Yvelines / Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
Nathalie Vergnolle	Directrice de recherche, IRSD Toulouse

Composition du Jury :

Président :	Pierre Denys	PU-PH, UVSQ et APHP
Examineurs :	Pierre Denys	PU-PH, UVSQ et APHP
	Nathalie Vergnolle	Directrice de recherche, IRSD Toulouse
Dir. de thèse :	Michel Neunlist	Directeur de recherche, INSERM TENS
Co-dir. de thèse :	Brigitte Perrouin-Verbe	PU-PH, CHU de Nantes et INSERM TENS

Invité(s)	Isabelle Bonan	PU-PH, CHU de Rennes et INCR
------------------	----------------	------------------------------

Remerciements

A Monsieur le Professeur Michel Neunlist, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire TENS depuis le Master 2, pour la richesse de son enseignement scientifique, pour son encadrement, sa rigueur et ses conseils toujours avisés. Au plaisir de continuer à travailler avec vous.

A Madame le Professeur Brigitte Perrouin-Verbe, pour la richesse de son enseignement de médecine, la transmission de sa passion pour notre magnifique spécialité qu'est la Médecine Physique et Réadaptation, pour son encadrement dans tous les aspects de ma carrière, merci pour tout ce qui ne peut se résumer en quelques lignes.

A Madame le Professeur Nathalie Vergnolle, pour avoir accepté de juger cette thèse et d'en être Rapporteur. Vous me faites l'honneur d'apporter vos connaissances et votre expertise pour juger ce travail. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon respect.

A Monsieur le Professeur Pierre Denys, pour avoir accepté de juger cette thèse et d'en être Rapporteur. Vous me faites l'honneur de m'apporter vos connaissances et votre expertise pour la seconde fois, après ma Thèse de médecine. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon respect.

A Madame le Professeur Isabelle Bonan, pour avoir accepté de juger cette thèse, ainsi que pour votre proposition d'aide et de suivi dans le cadre du CNU. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon respect.

A toute l'équipe de l'unité TENS, en particulier Anne Bessard et Philippe Aubert, mais aussi Tony, Thibault, Catherine...et les autres, pour votre encadrement depuis le master 2, merci de m'avoir transmis un peu de votre savoir scientifique, et pour les nombreux coups de mains depuis toutes ces années. Merci aussi à tous mes compagnons du bureau des thésards, anciens et actuels. Au plaisir de continuer à travailler avec vous tous.

A Madame le Docteur Charlène Brochard, pour l'excellente année au laboratoire que nous avons passée ensemble, pour tes riches conseils concernant l'écriture des papiers, pour ton dynamisme et ta bonne humeur ! Au plaisir de te retrouver sur Rennes prochainement.

A toute l'équipe médicale du service de MPR Neurologique du CHU de Nantes, qui me soutient de manière indéfectible depuis le début de ce travail, supporte mes absences (me supporte !) et m'aide en toute circonstance. Merci à vous tous, je suis tellement ravie et chanceuse de travailler avec vous.

A Madame Marie-Lyne Tréhorel, pour m'avoir accompagnée et aidée sur le chemin de la recherche clinique, avec une grande compétence, un dynamisme à toute épreuve, et comme disent nos internes : « tu es la meilleure TEC ». Au plaisir de continuer à travailler avec toi !

Aux équipes paramédicales du service de MPR Neurologique, de toutes les unités et du plateau de rééducation, avec qui j'aime tant travailler au quotidien et qui me motivent pour l'avenir.

A tous mes amis et toute ma famille, qui comptent tellement pour moi qu'il m'est impossible de décrire en quelques mots l'attachement que je leur porte.

A Maxime, mon soutien de tous les jours. Sans toi, je ne pourrais y arriver. Ensemble, nous avons vu naître les quatre plus beaux yeux du monde. Je t'aime.

A Mathias et Élisabeth, mes amours.

A ma mère...

Table des matières

PARTIE 1 : La lésion médullaire	6
1 Généralités	6
1.1 Introduction	6
1.1.1 Définitions	6
1.1.2 Evaluation	9
1.2 Epidémiologie	11
1.3 Néophysiologie spinale	12
1.4 Conséquences neurovégétatives	13
2 Troubles digestifs des patients blessés médullaires	19
2.1 Typologie de l'atteinte	19
2.2 Conséquences cliniques	19
2.3 Retentissement sur la qualité de vie	21
2.4 Evaluation de ces troubles digestifs	22
2.4.1 L'anamnèse	22
2.4.2 L'examen clinique	23
2.4.3 Les scores et questionnaires	23
2.4.4 Les examens paracliniques	24
3 Traitements actuels des troubles digestifs chez les blessés médullaires	26
3.1 Algorithme de prise en charge	26
3.1.1 Les mesures conservatrices	27
3.1.2 Les mesures mini-invasives	28
3.1.3 Les mesures invasives	29
3.2 Focus sur les irrigations coliques antérogrades	30
3.3 Technique percutanée endoscopique	31

PARTIE 2 : Innervation digestive et barrière épithéliale intestinale	33
1 Anatomie et fonctions digestives	33
1.1 De l'œsophage à l'intestin grêle	33
1.2 Le côlon	35
1.3 L'anorectum	36
2 L'innervation colique et anorectale	37
2.1 L'innervation extrinsèque autonome	37
2.1.1 <i>Système sympathique</i>	37
2.1.2 <i>Système parasympathique</i>	38
2.2 L'innervation extrinsèque somatique	39
2.3 L'innervation intrinsèque : le système nerveux entérique	39
2.4 Liens entre innervation extrinsèque et intrinsèque	42
3 La barrière épithéliale intestinale	44
3.1 Anatomie et fonctions.....	44
3.2 Focus sur les cellules entéroendocrines et le rôle de la sérotonine dans la régulation de la motricité intestinale.....	47
4 Revue de littérature concernant les modifications connues du SNE et de la BEI après lésion médullaire	50
4.1 Modifications du système nerveux entérique	52
4.1.1 Atteinte motrice et réponse musculaire	52
4.1.2 Atteinte des neurones entériques, du phénotype neurochimique du SNE et des différents neurotransmetteurs.....	55
4.1.3 L'inflammation	58
4.2 Modifications de la barrière épithéliale intestinale.....	60
PARTIE 3 Travaux de recherche.....	63
1 Hypothèses et objectifs de recherche	63

Caractérisation du remodelage du SNE, de la BEI et des fonctions digestives afin d'identifier de nouveaux mécanismes physiopathologiques.	65
2 Article 1 - étude fondamentale.....	65
3 Résultats préliminaires sur modèle de souris spinalisée	78
3.1 Matériels et méthodes.....	78
3.1.1 Modèle animal : modèle murin de souris spinalisée en T3	78
3.2 Résultats.....	79
3.2.1 Classification des animaux selon leur statut moteur	79
3.2.2 Etude des paramètres anatomiques	81
3.2.3 Etude des fonctions digestives	82
3.2.4 Etude de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire	84
3.2.5 Etude de la motricité colique ex vivo	86
4 Article 2: étude translationnelle	91
Tester l'efficacité d'une nouvelle technique thérapeutique	124
5 Article 3 : étude clinique	124
DISCUSSION et PERSPECTIVES.....	148
Références.....	155

PARTIE 1 : La lésion médullaire

1 Généralités

1.1 Introduction

1.1.1 Définitions

Nous appellerons « *lésion médullaire* » au sens large tout ce qui constitue une atteinte du cordon médullaire, du cône médullaire ou des racines de la queue de cheval c'est à dire du *névraxe au sein du canal rachidien*.

Les lésions médullaires acquises peuvent être traumatiques ou non-traumatiques. Si elles sont traumatiques, les causes peuvent être une chute, un accident de la voie publique, un accident du travail, de loisir ou de sport, les actes de violence. Les lésions médullaires acquises non-traumatiques résultent de pathologies diverses sous-jacentes : inflammatoires, infectieuses, ischémiques, tumorales...(1)

Un autre groupe de pathologies sont les lésions congénitales de la moelle épinière, représentées par les dysraphismes spinaux, ouverts ou fermés c'est-à-dire des défauts de développement et/ou de fermeture du tube neural survenant au cours du développement de l'embryon.

Les symptômes de la lésion médullaire dépendent de l'étendue de la lésion, de son étiologie traumatique/non traumatique, et également du niveau neurologique de la lésion. Les symptômes sont la perte des afférences sensitives et/la paralysie motrice des quatre membres, ou exclusivement des membres inférieurs (selon le niveau neurologique de la lésion), du tronc, ainsi que la perte du contrôle supra spinal de l'ensemble des fonctions et organes (fonctions végétatives : respiration, pression artérielle, contrôle des fonctions vésico-sphinctériennes, intestinales et sexuelles), en dessous du niveau neurologique de la lésion.

Plus le niveau neurologique de la lésion sera élevé dans la moelle épinière, plus l'étendue des déficiences sera importante. La tétraplégie (2) (terme préféré à quadriplégie) correspond à un déficit ou à la perte des fonctions motrices et sensitives dans les segments cervicaux de la moelle épinière dû à une lésion du névraxe à l'intérieur du canal rachidien. La tétraplégie se

manifeste par un déficit de fonction des membres supérieurs aussi bien que du tronc, des membres inférieurs et des organes pelviens. Ceci n'inclut pas les lésions du plexus brachial et les traumatismes des nerfs en dehors du canal rachidien.

La paraplégie (2) correspond à un déficit ou perte des fonctions motrices et/ou sensitives dans les segments thoraciques, lombaires et sacrés, mais non cervicaux de la moelle épinière. Lors de la paraplégie, le fonctionnement des membres supérieurs est préservé, mais en fonction du niveau de la lésion, le tronc, les membres inférieurs et les organes pelviens peuvent être atteints. Le terme est utilisé dans le cadre des lésions de la queue de cheval et du cône terminal, et non lors d'atteintes du plexus lombo-sacré ou traumatismes des nerfs périphériques en dehors du canal rachidien.

Le schéma ci-dessous (figure 1) rappelle le décalage entre les niveaux médullaires et vertébraux, ainsi que les principales fonctions innervées par des segments médullaires cervicaux, thoraciques, lombaires et sacrés.

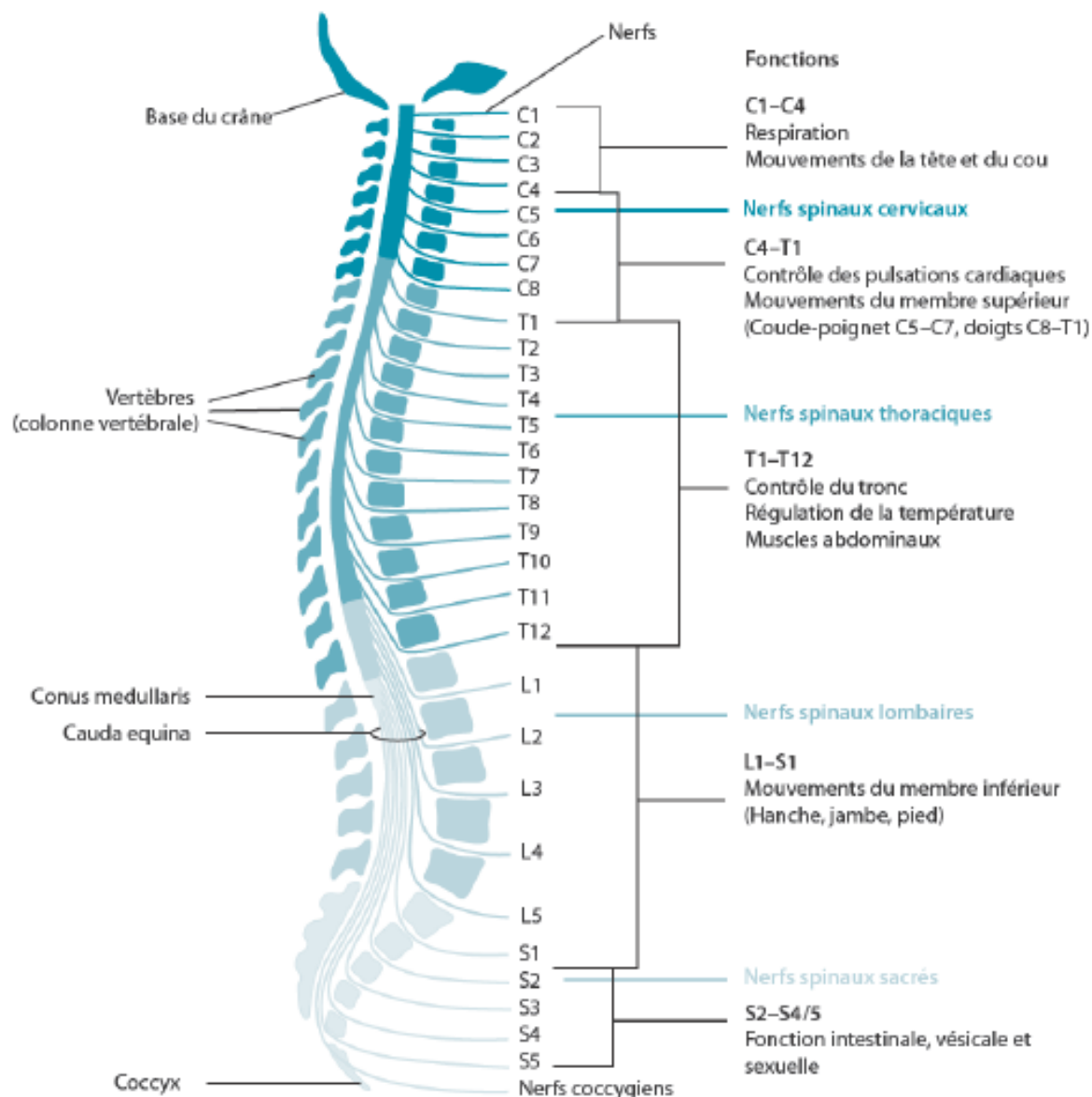


Figure 1 D'après (1): Organisation longitudinale de la moelle épinière (avec segments cervicaux, thoraciques, lombaires et sacrés en zone ombrée) ; vertèbres et nerfs spinaux et brève représentation des principales fonctions de la moelle épinière.

1.1.2 Evaluation

En vue de déterminer précisément l'atteinte neurologique des lésions de la moelle épinière, leur étendue, leur gravité et leur évolution (récupération ou détérioration), nous utilisons en pratique clinique l'« International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury » (ISNCSCI)(2,3) qui est une évaluation complète et standardisée, Gold Standard permettant de mesurer la gravité d'une lésion médullaire, observation standardisée internationale des lésions médullaires validée par l'American Spinal Injury Association (ASIA) et l'ISCOS (International spinal cord society) (Figure 2). Cette observation comprend un examen sensitif (évaluation du toucher léger et de la pique) de 28 points clés (zone d'innervation autonome) par côté, un examen moteur (10 muscles/fonctions clés par côté), permettant d'évaluer chaque métamère de C2 à S4-S5.

L'examen de la région sacrée (examen anorectal : recherche d'une sensibilité anale profonde et d'une contraction anale volontaire) est crucial pour déterminer si la lésion médullaire est complète ou incomplète.

Le grade B correspond à une lésion incomplète sur le plan sensitif uniquement, sans motricité en dessous du niveau neurologique. Les grades C et D correspondent à des lésions incomplètes sur le plan sensitif et moteur.

1.2 Epidémiologie

Parmi les lésions de la moelle épinière, il est habituel de distinguer les lésions traumatiques et les lésions non traumatiques. L'incidence mondiale des lésions médullaires traumatiques varie selon les études, les pays et les régions, mais est passée d'une estimation de 40 à 80 nouveaux cas par million d'habitants par an en 2013 (1,4,5), à plus de 100 nouveaux cas par million par an uniquement pour les lésions traumatiques (6) en 2018. Cela signifie que chaque année, rapporté à la population mondiale, environ 775 000 personnes subissent une lésion traumatique de la moelle épinière. En France, la dernière étude en date est celle d'Albert et al (7) qui retrouvaient en 2005 une incidence de 19,4 cas par millions d'habitants, soit rapporté au nombre actuel d'habitants en France, environ 1300 nouveaux cas par an pour les lésions traumatiques.

En ce qui concerne les lésions non traumatiques, l'étude de Noonan et al.(8) donne un ratio de 1,65/1 entre les lésions non traumatiques et les lésions traumatiques. Si l'on applique ce ratio à la France, il y aurait environ 2145 cas de lésions non traumatiques par an en France, soit la survenue de $2145 + 1300 = 3445$ cas par an de lésions médullaires toutes causes confondues...

La principale cause de ces lésions traumatiques reste les accidents de la route, mais depuis une vingtaine d'années, nous sommes confrontés à un changement dans l'épidémiologie avec un nombre croissant de lésions traumatiques dans la population âgée. Le taux d'incidence des lésions traumatiques est donc désormais constitué de deux pics associés à l'âge : chez les jeunes adultes et chez les personnes âgées. L'augmentation de l'incidence après 65 ans correspond à des lésions qui sont le plus souvent secondaires aux chutes, et qui dans la majorité des cas causent des tétraplégies incomplètes. Ces lésions traumatiques liées aux chutes pourraient devenir un problème de santé publique croissant.

La figure 3 montre la répartition en % des différentes étiologies et la répartition entre tétraplégies et paraplégies, aux Etats-Unis (9).

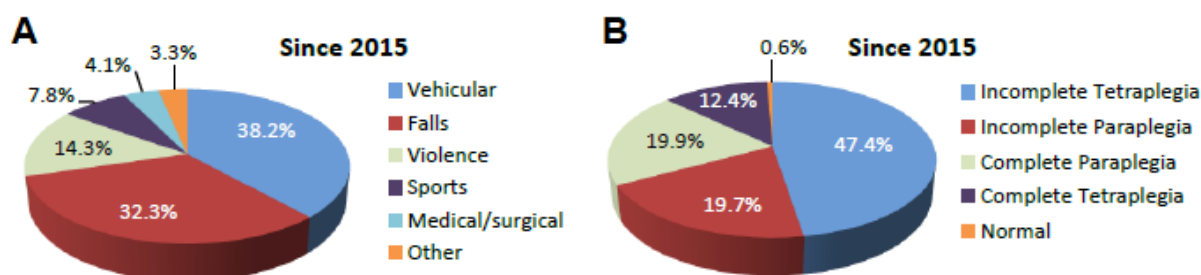


Figure 3 d'après (9): les différentes étiologies de lésion médullaire (A), et la répartition entre paraplégies et tétraplégies (B)

D'un point de vue socio-économique, les dépenses annuelles moyennes (coût des soins de santé) sont estimées, pour un patient tétraplégique (grade AIS A, B ou C), entre 840.000\$ et 1.160.000\$ la première année, et 200.000\$ chaque année suivante. Pour un patient paraplégique (AIS A, B ou C), 567 000 \$ la première année et 75 000 \$ chaque année suivante(9).

1.3 Néophysiologie spinale

Nous avons vu qu'une lésion médullaire, qu'elle soit traumatique ou non, entraîne des déficiences des fonctions motrices, sensibles et végétatives au-dessous du niveau neurologique de la lésion (5) et donc un tableau de déficiences multisystèmes. Non seulement tous les organes situés en dessous de ce niveau sont privés de leur contrôle supra-spinal, mais après la phase de choc spinal, des dysfonctionnements d'organes et de systèmes liés à une réflexivité spinale exacerbée s'installent.

A la phase initiale, le choc spinal correspond à une paralysie flasque temporaire survenant juste après la lésion, avec perte de toute activité réflexe (au-dessous du niveau neurologique de la lésion). Il s'agit d'une sidération transitoire des centres spinaux sous-lésionnels, résultat d'une perte soudaine de l'activité excitatrice supraspinale. Cette aréflexie initiale entraîne aussi un iléus digestif et une rétention vésicale aigue. Après une période de choc spinal, lors de lésion supracônale avec préservation de l'axe gris, la moelle épinière, véritable centre d'intégration réflexe, et privée des contrôles inhibiteurs supraspinaux, est le siège d'une réflexivité exacerbée. La réapparition de la réflexivité se fait dans le sens caudo-rostral, avec

classiquement, d'abord la récupération du réflexe anal (S4-S5) et du réflexe bulbo-caverneux (S3) (dans les 48 heures post lésion), puis apparition du signe de Babinski et des réflexes de triple flexion (réflexes à point de départ cutanés et postsynaptiques) enfin des réflexes ostéo-tendineux. La durée de ce choc spinal reste controversée, de quelques jours à 4 à 6 semaines(10).

Associés à la perte du contrôle supra-spinal, ces réflexes exacerbés viennent modifier ces dysfonctions d'organes et de systèmes, et cette néophysiologie spinale fait de la lésion médullaire une affection très complexe, à l'origine de complications souvent potentiellement dévastatrices. La prise en charge du patient blessé médullaire qui découle de cette néophysiologie est donc très spécifique et doit maîtriser tous les champs de ses déficiences, en prenant en compte leurs interactions potentielles.

1.4 Conséquences neurovégétatives

Au-delà de l'atteinte des fonctions sensibles ou motrices, l'atteinte végétative engendrée par la lésion médullaire cause des complications multi-systémiques telles que des anomalies du système cardiovasculaire et des troubles dysautonomiques, des troubles respiratoires, des troubles génito-sexuels, une atteinte vésico-sphinctérienne et également des troubles digestifs(11).

La déficience cardiovasculaire et circulatoire post-lésion médullaire est liée au déséquilibre entre les composantes parasympathiques et sympathiques de la régulation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque(10).

A la phase aigüe, les lésions médullaires hautes (cervicales) entraînent un choc neurogénique provoqué par la perte du contrôle sympathique supraspinal, qui entraîne une hypoactivité sympathique et une prédominance du contrôle parasympathique vagal qui lui, est intact. S'en suivent une bradycardie possible dans les atteintes cervicales (innervation sympathique du cœur T1-T5) et une hypotension majeure par vasoplégie sous lésionnelle, une perte de l'adaptabilité de la pression artérielle et un des voies efférentes du baroréflexe. Plus la lésion est haute, plus l'hypotension initiale est majeure. La bradycardie majeure dans les atteintes cervicales hautes peut conduire à des arrêts cardiaques, favorisés par des manœuvres

d'aspiration endotrachéale et l'hypoxie, liés à un réflexe vaso vagal parasympathique. Le traitement repose sur les amines vasopressives, l'atropine à la seringue électrique, éventuellement sur l'utilisation de sondes d'entraînement électrosystoliques transitoires.

A la phase chronique, la déafférentation des voies sympathiques médullaires, notamment dans les lésions au-dessus de T6 affecte la vasoconstriction à médiation barométrique qui se produit normalement pour maintenir la pression sanguine et la perfusion cérébrale. Cela entraîne une stase majeure de sang veineux dans le territoire splanchnique et des membres inférieurs (phénomène de pooling). De ce fait, l'hypotension orthostatique est fréquente et doit être traitée par utilisation de contentions efficaces et une reverticalisation progressive(5). La vasoplégie sous lésionnelle et l'hypercoagulabilité initiale entraînent aussi un sur-risque de thrombophlébite et d'embolie pulmonaire (12).

A contrario, la perte du contrôle des voies descendantes sur les neurones sympathiques préganglionnaires (NSP), associée à des phénomènes de plasticité des NSP et de modification de la circuiterie spinale (phénomènes de « sprouting » des afférences primaires et notamment des fibres C) crée un état d'hyperexcitabilité, qui contribue à un réflexe aberrant d'activation des NSP en réponse à une stimulation afférente sous-lésionnelle le plus souvent nociceptive, à l'origine d'une décharge sympathique paroxystique sous lésionnelle : l'hypperflexie autonome (HRA)(10,13). L'HRA survient essentiellement dans les lésions thoraciques hautes > T6 et a fortiori cervicales. Plus de deux tiers de ces patients sont affectés par la survenue d'HRA. D'un point de vue clinique, l'HRA se définit comme une élévation de la Pression artérielle aigue > 20mm Hg par rapport à la pression systolique de base. Cette réaction hypertensive aigue peut être isolée (HRA silencieuse) ou accompagnée de signes et symptômes témoin de l'imprégnation sympathique et de la vasodilatation sus lésionnelle réactionnelle : céphalée pulsatile aigue, hypersudation et flush sus lésionnels, pilo-érection, nez bouché, vision brouillée et anxiété. Cette réaction hypertensive est souvent associée à des troubles du rythme cardiaque i.e. bradycardie réactionnelle ou tachyarythmies (lésion cervicale). D'un point de vue physiopathologique, cette réaction hypertensive est la conséquence de la vasoconstriction majeure de tout le lit vasculaire sous-lésionnel (splanchnique et des membres inférieurs) liés à cette décharge sympathique, et favorisée par

une hypersensibilité adrénérquique des vaisseaux sous lésionnels. Les signes associés sus lésionnels sont liés à une vasodilatation sus lésionnelle réactionnelle intéressant y compris les vaisseaux cérébraux. Le risque majeur est l'hypertension intracrânienne avec risque de convulsions, d'hémorragie intracérébrale ou méningée. La vasoconstriction sous lésionnelle des artères coronaires dans les lésions cervicales peut être à l'origine d'infarctus myocardique. Le traitement de l'HRA est surtout le traitement de la cause déclenchante, son traitement symptomatique repose sur les inhibiteurs calciques.

Les troubles respiratoires sont immédiats et dépendent du niveau neurologique. Le diaphragme étant innervé par le nerf phrénique (C3-C4), les lésions très hautes (tétraplégies C1 à C2) entraînent une paralysie diaphragmatique nécessitant une ventilation assistée à vie (sur trachéotomie avec respirateur ; ou via un stimulateur diaphragmatique si les réponses phréniques le permettent)(5,14). En dessous de ces niveaux, le syndrome respiratoire est un syndrome restrictif pur directement corrélé au niveau neurologique de la lésion (du fait de l'atteinte des intercostaux (innervation T1-T11), avec une diminution de tous les volumes mobilisables. La paralysie des intercostaux internes et des abdominaux (T6 à T12) est à l'origine d'une absence d'expiration active et de toux. Les décès liés à des complications respiratoires (pneumopathies, atélectasies, encombrement...) sont de l'ordre de 30 % dans la population des patients tétraplégiques et représentent aujourd'hui une des premières causes de décès de ces patients.

La dysfonction neuro-urologique va dépendre de la typologie de la lésion médullaire. Lors d'une lésion supra-cônale, le schéma de fonctionnement vésico-sphinctérien après la phase initiale de choc spinal, correspond à une reprise de réflectivité détrusorienne associée le plus souvent à une hyperactivité sphinctérienne dyssynergique (=neurovessie centrale). Ce fonctionnement vésical à haute pression est source de nombreuses complications potentielles : infections du haut appareil urinaire, reflux et dilatations de l'arbre urinaire sur hautes pressions intravésicales, et risque de dégradation de fonction rénale. En cas de lésion du 2^e motoneurone (=substance grise intra-cônale ou queue de cheval), la vessie est compliant et acontractile (=neurovessie périphérique). S'associe une incompétence sphinctérienne par dénervation striée. La dysurie et la rétention sont la règle en l'absence

prise en charge adaptée, associées à une incontinence d'effort par incompétence sphinctérienne.

Ces dysfonctions neuro-urologiques répondent à des traitements bien codifiés, visant à obtenir à la fois la continence et un fonctionnement vésical à basse pression. Le mécanisme des dysfonctions neuro-urologiques a été beaucoup étudié, probablement en raison des potentielles conséquences rapidement létales des complications neuro-urologiques(15). Aujourd'hui, nous disposons de stratégies thérapeutiques adaptées en fonction de la situation neurologique, présentées dans la figure 4 ci-dessous.

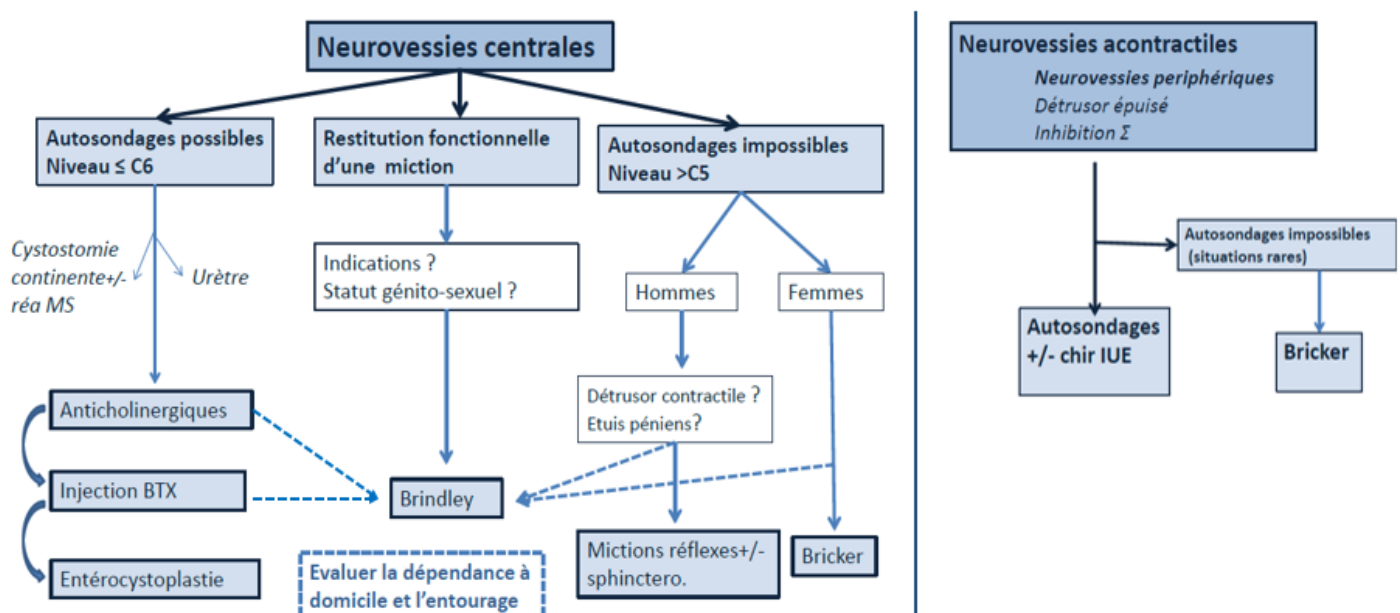


Figure 4 : D'après B. Reiss – 29^e Congrès de la Société Française de Médecine Physique et de Réadaptation, Marseille, 26-31 mai 2014. Abréviations : MS = Membres supérieurs ; BTX = Botox ; sphinctéro = sphinctérotomie ; Σ = sympathique ; IUE = incontinence urinaire d'effort.

Globalement le traitement des neurovesgies centrales passe par l'apprentissage des autosondages dès lors que le statut fonctionnel du patient (parfois après une chirurgie de réanimation du membre supérieur chez le tétraplégique) le permet, tout en maintenant une vessie à basse pression. Le traitement de l'hyperactivité du détrusor passe par de fortes doses d'anticholinergiques en première intention, puis en cas d'échec de ces thérapeutiques ou

d'intolérance, la deuxième ligne de traitement est représentée par les injections de toxine botulique intradétrusoriennes. En troisième intention, la chirurgie d'entérocystoplastie d'agrandissement permet d'obtenir un réservoir à basse pression. La chirurgie de Brindley (i.e. associant une déafférentation postérieure sacrée et une électrostimulation des racines antérieures sacrées) chez les patients complets, permet de restituer fonctionnellement la miction. En cas d'impossibilité de réaliser les autosondages, l'hyperactivité du détrusor peut chez l'Homme (à la condition d'un appareillage de la verge possible par étuis péniers) permettre des mictions réflexes non contrôlées, après réalisation d'une sphinctérotomie striée (+/- lisse) pour traiter une éventuelle dyssynergie vésico-sphinctérienne. Si l'amplitude des contractions détrusoriennes n'est pas suffisante pour des mictions réflexes, ou s'il s'agit d'une femme, une chirurgie de dérivation urinaire non continente de type Bricker associée à une cystectomie de propreté est proposée.

Le traitement des vessies périphériques repose essentiellement sur l'apprentissage des autosondages. Le réservoir vésical est déjà à basse pression. L'incontinence par incompétence sphinctérienne peut être traitée chirurgicalement, le cas échéant.

Les troubles génito-sexuels sont également différents selon le niveau de la lésion(16). S'il s'agit de lésions du premier motoneurone, chez l'homme les érections réflexes sont en général maintenues, mais ne permettent pas toujours un rapport, de plus l'éjaculation n'est présente que dans 15% des cas(17). En cas de lésion du second motoneurone, les érections psychogènes peuvent être maintenues dans la plupart des cas (90%), mais de la même façon elles ne permettent pas toujours les rapports de façon efficace. Le traitement repose sur l'utilisation des inhibiteurs des phosphodiésterases de type 5, puis en seconde intention des injections intra-caverneuses de prostaglandines, puis des systèmes tels que le vacuum(17). Chez la femme, la fertilité n'est pas atteinte, les orgasmes sont possibles dans la moitié des cas(18) même en cas de lésion complète, probablement via des voies extramédullaires comme le nerf vague(18,19).

Concernant les *dysfonctions neuro-gastroentérologiques*, les études ont été de manière générale plus rares, le clinicien est en général plus démuni et ne dispose que de

thérapeutiques basées sur l'expérience, organisées selon un algorithme pyramidal d'escalade des thérapeutiques, présenté ci-après.

2 Troubles digestifs des patients blessés médullaires

2.1 Typologie de l'atteinte

Globalement le dysfonctionnement neurologique de l'intestin après lésion médullaire comprend la perte de la sensation de besoin ainsi que du contrôle volontaire du réflexe d'exonération, et une constipation à 2 niveaux : 1) une constipation *de transit* concernant le côlon dans son ensemble, et 2) une constipation *terminale* ou dyschésie anorectale. De plus, les patients souffrent de troubles potentiels de la continence, que ce soit par regorgement et insuffisance sphinctérienne ou par déclenchement inopiné d'un réflexe de défécation(20,21).

La terminologie habituelle de lésion du 1^{er} motoneurone (supracônale) vs 2^{ème} motoneurone (cône/queue de cheval) est moins utilisée en ce qui concerne la dysfonction neurologique de l'intestin (22). Les patients présentant des lésions supracônales avec réflexes sacrés intacts ont tendance à avoir un tonus accru du muscle sphincter anal externe ainsi qu'un tonus et une contractilité accrus du rectum, pouvant provoquer une défécation réflexe, mais aussi une constipation et une rétention des selles par dyssynergie anorectale. En revanche, les patients présentant des lésions des segments sacrés du cône ou de la queue de cheval ont généralement un tonus réduit du muscle sphincter anal externe, ainsi qu'un tonus et une contractilité réduits du rectum, sources de rétention fécale et surtout d'incontinence.

C'est pourquoi les termes d'intestin « *réflexique* » et d'intestin « *aréflexique* » sont plus couramment utilisés(22,23), même si de nombreux patients présentant des lésions supracônales n'ont pas de signe d'intestin réflexique, et que certains présentant des lésions incomplètes au niveau du cône médullaire ou de la queue de cheval conservent des réflexes.

2.2 Conséquences cliniques

A la phase de choc spinal, l'intestin est d'abord aréflexique et les patients ont un temps de transit colique très allongé pendant les premières semaines. Puis à la phase chronique, la plupart ont toujours un transit colique globalement long (24). Néanmoins, les patients présentant un intestin réflexique ont tendance à avoir un temps de transit prolongé dans tout

le côlon, mais moins au niveau du rectum, tandis que les patients présentant un intestin aréflexique ont tendance à avoir un temps de transit plus prolongé au niveau du côlon descendant et du rectosigmoïde.

Les patients dont les lésions sont plus hautes (cervicales vs lombaires) auraient une plus forte tendance à la constipation(25), ainsi que les lésions complètes(26). Certaines études comme celle de Vallès (27) ont plutôt mis en évidence 3 patterns d'atteinte : 1) les lésions >T7 où la fréquence de la constipation est élevée (86%) mais où l'incontinence est rare ; 2) les lésions <T7 avec des réflexes sacrés préservés, qui ont une moins grande fréquence de constipation (50%) et peu d'incontinence ; et 3) les lésions <T7 avec une abolition des réflexes sacrés, 56% de constipation mais une sévérité plus importante de l'incontinence. Cela souligne en tout cas l'importance du niveau neurologique de la lésion, de son caractère complet ou non et surtout du caractère réflexique ou aréflexique de l'intestin. Le délai post-lésion semble également jouer un rôle car certaines études montrent une aggravation des troubles avec l'ancienneté de la lésion(28–30) : augmentation du taux de constipation, augmentation du temps passé pour l'exonération, augmentation de l'utilisation des laxatifs, à 10 ans post-lésion.

Globalement les études retrouvent toujours chez le patient blessé médullaire une fréquence très élevée (jusqu'à 80%) d'au moins un trouble digestif (22). Les plus fréquents sont la constipation et l'incontinence, dont les taux respectifs peuvent varier (constipation : 32 à 56% ; incontinence : 27 à 86%)(22,26,27,30). Dans l'étude de Tate, sur un grand échantillon de 291 patients blessés médullaires, la constipation et l'incontinence ont été rapportées par 38,5 % et 74,2 % des patients respectivement(31). Les autres symptômes sont la nécessité de réaliser des manœuvres intra-rectales pour l'exonération (66%), la distension ou l'inconfort abdominal (22 à 33%), les hémorroïdes (31 à 74%) (22,32), la fissure anale (9%) (33). Le temps moyen passé à la défécation est long, supérieur à 15 minutes dans 58,4 % des cas, entre 31 et 60 minutes dans 22 % des cas, et plus de 60 minutes dans 14 % des cas (34).

Les complications digestives représentent 11 % des cas de réhospitalisation chez le blessé médullaire(35).

De plus, les fécalomes et les manœuvres de défécation du programme intestinal sont une grande cause d'hyperréflexie autonome(26,36), avec tous les risques vitaux potentiels que cela implique. L'HRA a été décrite au paragraphe 1.4. Les troubles digestifs sont aussi considérés comme étant une épine irritative potentielle, source de désordres extra-digestifs

comme une exacerbation de la spasticité. La spasticité est une hyperexcitabilité de l'arc réflexe myotatique responsable d'une exagération vitesse dépendante, du réflexe d'étirement avec exagération des réflexes ostéotendineux(37), conséquence de la perte de l'inhibition centrale sur le territoire sous-lésionnel. Chez le blessé médullaire, au-delà de l'augmentation du réflexe d'étirement, l'hyperexcitabilité médullaire se manifeste par l'exagération des réflexes polysynaptiques à l'origine de spasmes musculaires (mouvements incontrôlés soit en extension ou en flexion). Une modification de la symptomatologie « spastique » doit en règle générale faire rechercher des épines irritatives potentielles, comme une aggravation des troubles digestifs.

2.3 Retentissement sur la qualité de vie

Le dysfonctionnement digestif est l'un des problèmes de santé secondaires les plus répandus qui affectent la qualité de vie des personnes atteintes d'une lésion médullaire. Les troubles digestifs représentent 10 à 30% des causes de ré-hospitalisation après une lésion médullaire(38,39). L'impact de ces troubles sur la santé et la qualité de vie des patients peut donc être majeur(40).

L'amélioration de la dysfonction digestive est considérée comme l'une des plus grandes priorités chez les personnes atteintes d'une lésion médullaire(41,42). La récupération d'une fonction digestive est priorisée par les patients par rapport à la récupération de la fonction de marche ou de la fonction urinaire(41). La perte du contrôle intestinal peut en tout cas avoir un impact plus important sur la qualité de vie que la perte des capacités de marche (43). Trente-neuf pourcent des patients blessés médullaires considèrent que les troubles digestifs sont plus difficiles à vivre que les troubles urinaires ou sexuels(20). Les plus sévèrement atteints de ces patients sont contraints de passer plus d'une heure aux toilettes pour chaque exonération (de 14% à 33% des blessés médullaires selon les auteurs)(26,42,44) et/ou présentent des fuites fécales hebdomadaires à mensuelles (>50% des spina bifida) (45), ce qui bien évidemment est extrêmement mal vécu.

La dysfonction digestive est une source d'anxiété et de détresse pour 54-62% des patients blessés médullaires(25,34,46,47). Elle est à l'origine de restrictions des activités sociales, interfère de manière significative avec l'éducation, le travail et la vie familiale de la personne

et représente un défi majeur pour la qualité de vie, l'indépendance et la réintégration dans la communauté après une lésion médullaire.

2.4 Evaluation de ces troubles digestifs

C'est une évaluation précise de la situation neurologique et digestive du patient qui va permettre de démarrer une prise en charge la plus adaptée possible.

2.4.1 L'anamnèse

L'anamnèse doit permettre de connaître la fréquence des selles, la quantité et la consistance des selles. L'échelle des selles de Bristol est d'une bonne aide pour cet élément (48), elle permet de graduer les selles selon leur consistance de 1 à 7, 1 correspondant aux selles dures, et 7 à la diarrhée liquide.

Le type de symptôme le plus fréquemment rencontré (constipation, incontinence...), leur fréquence, l'existence de douleurs abdominales, ou de complications locales (saignements...) ou générales (HRA lors des manœuvres ...) doivent être notés.

Les informations sur la perception ou non du besoin d'évacuer, sur la nécessité ou non d'utiliser des suppositoires ou des manœuvres digitales pour la défécation, la fréquence du programme d'exonération, sur le temps passé aux toilettes pour l'exonération, l'existence ou non de tentatives infructueuses d'évacuation, doivent être colligées.

On demande au patient s'il suit un régime alimentaire particulier ou s'il s'en impose un à cause du transit, quels sont ses médicaments de base, ceux déjà utilisés pour le transit (avec ou sans efficacité), pratique-t-il une activité physique ou non... Les antécédents chirurgicaux notamment de chirurgie digestive, ou bien urologique comme l'entérocystoplastie d'agrandissement doivent également être notés.

L'évolution des troubles au cours du temps est aussi une notion importante.

2.4.2 L'examen clinique

Puis l'examen clinique évalue le patient dans sa globalité, d'abord sur le plan neurologique, avec l'observation ISNCSCI qui permet de déterminer le niveau neurologique de la lésion.

L'ISNCSCI comprend ensuite un examen périnéal permettant une évaluation de la sensibilité péri-anale et anale profonde, ainsi que du tonus du sphincter au repos et après une contraction anale volontaire si présente (3). Ceci permet de déterminer le caractère complet ou incomplet de la lésion (cf 1.1.2).

Afin de déterminer la nature réflexique ou aréflexique de la dysfonction intestinale, le réflexe anal est réalisé en utilisant une aiguille pour piquer la marge anale et rechercher le déclenchement d'une contraction anale réflexe, qui signe l'intégrité du métamère S4-S5. Le réflexe bulbocaverneux ou clitorido-anal est également important à réaliser pour rechercher l'intégrité du métamère S3 : la piqûre du gland entraîne une contraction réflexe du muscle bulbocaverneux.

L'examen du contenu de l'ampoule rectale apporte aussi des informations sur la consistance des selles si elle est remplie, et sur la fiabilité du réflexe anal.

L'inspection du périnée et de la région périanale permet également d'évaluer l'état de la peau et identifier les complications locales décrites en 2.2, par exemple : fissures, marisques anales, thromboses hémorroïdaires.

La palpation abdominale recherche le déclenchement de spasmes abdominaux, une masse palpable au niveau colique, l'auscultation permet de repérer les bruits hydroaériques et d'identifier des zones de stase gazeuse, de même que la percussion abdominale.

2.4.3 Les scores et questionnaires

Certains scores cliniques peuvent aider à quantifier les troubles digestifs. Le plus connu parmi ceux qui sont validés chez les blessés médullaires est le NBD score (Neurogenic Bowel Dysfunction score)(49), qui évalue par une dizaine de questions la sévérité du trouble, en

s'intéressant au temps passé aux toilettes, à l'hyperréflexie autonome, à la nécessité des manœuvres digitales, la prise de laxatifs, aux complications périanales...

Le NBD score peut être aujourd'hui remplacé par l'utilisation des data set internationaux de l'ISCoS(50) qui sont également des questionnaires pratiques à utiliser et exhaustifs et dont la partie évaluant spécifiquement la dysfonction intestinale comprend le NBD score.

L'échelle des selles de Bristol a été décrite en 2.4.1 car elle fait partie de l'anamnèse globale.

Le score de Kess (51) et celui de Wexner ou Cleveland(52) sont des scores non spécifiques des lésions neurologiques mais qui peuvent tout de même aider à la quantification des troubles et à leur suivi, respectivement concernant la constipation et l'incontinence.

2.4.4 Les examens paracliniques

Il est courant, même si cela reste controversé du fait du caractère irradiant si répétitif, de pratiquer un Abdomen Sans Préparation (ASP) pour rechercher une stase stercorale et évaluer son importance et sa répartition sur le cadre colique, évaluer également la stase aérique. Les uroscanners prévus régulièrement dans le cadre du suivi neuro-urologique des blessés médullaires permettent également d'apprécier cette stase.

Le temps de transit aux pellets (53) est probablement un des examens complémentaires le plus facile à réaliser, ayant un bon rendement informatif sur le trouble du transit du patient : il permet de déterminer si la stase stercorale est pan-colique ou bien principalement aux dépens du côlon droit/ gauche/ sigmoïde avec un calcul possible du temps de transit de chaque partie ; et également de faire la part des choses entre des fausses diarrhées du constipé et une vraie accélération du transit par exemple en post-entérocystoplastie d'agrandissement(54), ou sous l'influence d'une prise excessive de laxatifs. Concrètement, selon la technique de Danchequin(53), il s'agit de prescrire la prise d'une gélule contenant 10 marqueurs radio-opaques (les pellets), tous les jours à la même heure pendant 6 jours, puis de réaliser à la même heure le 7^{ème} jour un ASP.

La formule de calcul du temps de transit est :

TTC (global, ou dans chaque segment) en heures = $n \times \Delta t / N$,

avec la technique de Danchequin et al. **TTC** = $n \times 2,4$

n = le nombre de marqueurs présents dans l'aire évaluée sur l'ASP.

Δt = le temps séparant deux prises de marqueurs, ici 24 heures.

N = le nombre de marqueurs ingérés à chaque prise, ici 10

Pour délimiter les trois aires coliques sur l'ASP, il faut tracer une ligne verticale sur les apophyses vertébrales jusqu'à L5 et une ligne reliant l'apophyse de L5 aux toits des deux cotyles fémoraux (cf exemple ci-contre).



Figure 5 : Photo et ASP d'un temps de transit aux pellets : empruntés à la Société nationale française de colo-proctologie.

Les examens un peu plus avancés de la dysfonction intestinale neurogène comme la manométrie anorectale, l'examen proctologique et la coloscopie, sont réalisés en fonction de la vision clinique et individuelle de la situation, alors que les 2 précédents (ASP et temps de transit) peuvent être faits en routine.

La manométrie anorectale permet de bien identifier le type de trouble anorectal. Elle donne des informations détaillées sur la fonction anale (longueur du canal anal, pression de repos, existence d'une contraction anale volontaire et sa puissance), et rectale (sensibilité, tonus rectal de base, présence ou non du réflexe recto-anal inhibiteur et excitateur, compliance

rectale, survenue de contractions rectales), et enfin la capacité ou non à expulser de manière dynamique un ballonnet légèrement rempli (recherche d'une dyssynergie anorectale).

La coloscopie, précédée d'un bon examen proctologique, permet de s'assurer de l'absence d'obstacle organique pouvant expliquer les troubles digestifs. Elle repère les éventuelles distensions coliques ou « côlons longs » des patients ayant un lourd passé de troubles digestifs après lésion médullaire. L'examen recto-sigmoïdien recherche les hémorroïdes ou d'autres lésions sus-jacentes pouvant expliquer un saignement, par exemple.

3 Traitements actuels des troubles digestifs chez les blessés médullaires

L'objectif global de la prise en charge intestinale est de parvenir à une continence *secondaire et programmée* grâce à une évacuation régulière et suffisante des selles, dans un délai acceptable pour chaque patient et au bon moment, en fonction de son agenda. La gestion des selles est un processus cyclique.

3.1 Algorithme de prise en charge

Un algorithme empirique propose une approche par étapes du traitement de la dysfonction neurologique de l'intestin chez les patients atteints de lésions médullaires (Figure 6).

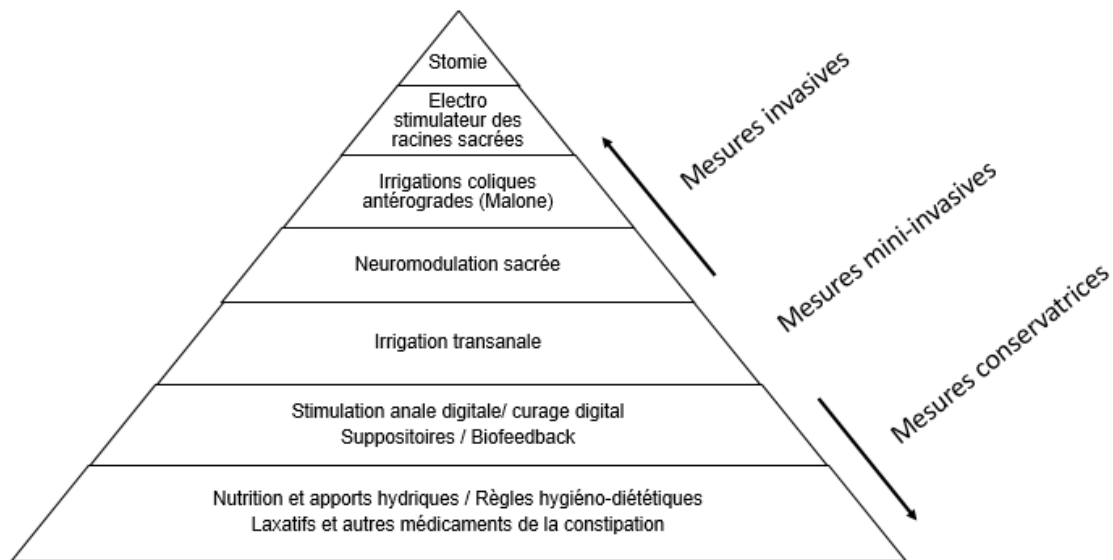


Figure 6 : Algorithme de prise en charge de la dysfonction neurologique de l'intestin, d'après (23,55)

3.1.1 Les mesures conservatrices

Cette première étape de l'algorithme combine le régime alimentaire et la gestion des apports liquidiens, l'exercice physique et des méthodes d'évacuation rectale. La méthode d'évacuation rectale dépend du schéma physiopathologique de la dysfonction neurogène intestinale, décrite plus haut (cf 2.1). Dans le cas d'un intestin *réflexique*, la stimulation digitale du rectum, associée à des suppositoires, active les réflexes anorectaux. En cas de dysfonctionnement intestinal *aréflexique*, en raison de l'absence des réflexes de défécation, l'évacuation digitale quotidienne (ou bi-quotidienne) des selles est recommandée. Les manœuvres d'exonération digitales (stimulation ou évacuation) sont nécessaires pour deux tiers des patients (56).

L'utilisation des laxatifs a une place importante pour la régulation de la consistance des selles. Un patient dont l'intestin est *réflexique* sera plus confortable avec des selles de type Bristol 3 ou 4, obtenues en utilisant des laxatifs (osmotiques, lubrifiants, laxatifs de lest...) ; tandis qu'un patient dont l'intestin est *aréflexique* sera plus facilement continent avec des selles de type Bristol 2 et n'aura que très peu besoin de laxatifs. Le suppositoire est utilisé pour déclencher

le réflexe d'exonération chez le patient spastique, alors que le patient flasque l'utilisera surtout pour lubrifier le canal anal et permettre une évacuation plus douce.

Les lavements standards (mini lavements ou grands lavements avec eau tiède et huiles lubrifiantes) peuvent également être utilisés de manière ponctuelle. L'évacuation spécifique des gaz en trop grande quantité peut se faire à l'aide de sondes rectales posées après mise en place de xylocaïne intra-rectale.

L'idéal pour le patient est d'obtenir grâce à ces techniques de base, une évacuation régulière des selles, tous les jours ou au moins trois fois par semaine(57).

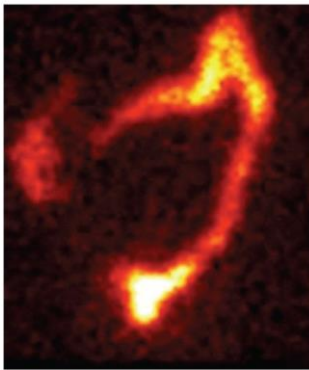
3.1.2 Les mesures mini-invasives

La deuxième étape, qualifiée de mini-invasive, est l'utilisation de l'irrigation trans-anale qui permet une vidange complète du rectum et du côlon gauche. Référence scintigraphie. Une étude randomisée-contrôlée a démontré l'efficacité des irrigations trans-anales (58). L'irrigation trans-anale améliore l'incontinence fécale, la constipation et la qualité de vie liée aux symptômes par rapport au traitement conservateur(55). Les figures 6 et 7 montrent le matériel nécessaire et l'efficacité évaluée par scintigraphie.



Figure 6 : Matériel pour réalisation des irrigations trans-anales (*Système Peristeen® Coloplast*)

Before defaecation



After defaecation

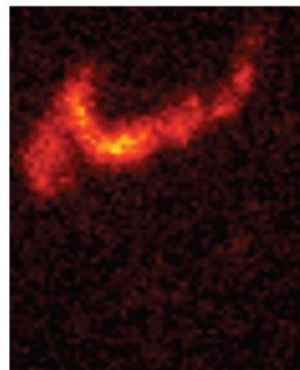


Figure 7 : Efficacité de l'irrigation transanale (59)

Deux études prospectives (58,60) avaient analysé les résultats à moyen et long terme chez les adultes. A 6 mois, un peu plus de la moitié des patients continuent les irrigations. Ils sont entre 51 et 63 % à ne plus être constipés et entre 57 et 68% à ne plus être incontinents. Les facteurs influençant le taux de poursuite étaient d'avoir une incontinence fécale initiale, un bon équilibre assis. Plus le score NBD était élevé initialement plus la diminution (et donc l'amélioration) était importante.

3.1.3 Les mesures invasives

Dans une troisième étape, l'irrigation colique antérograde peut être proposée aux patients présentant une constipation sévère et une impaction fécale plus haut située. Nous la décrivons plus en détail ci-après (cf 3.2).

La neuromodulation sacrée est rarement utilisée en pratique courante, parce qu'elle n'est efficace que chez des patients blessés médullaires très incomplets et bien sélectionnés(23,61).

La stimulation des racines antérieures sacrées, associée à une radicotomie postérieure sacrée (procédure de Brindley)(62,63) est utilisée en premier lieu dans l'algorithme de prise en charge urologique du patient blessé médullaire. L'intervention permet de s'affranchir de l'hyperéfectivité sacrée par la radicotomie postérieure sacrée, et de déclencher via la stimulation électrique des racines antérieures S2, S3 et S4, à la fois une miction électroinduite, mais aussi sur un 2^{ème} programme de stimulation, une défécation électroinduite. Cette intervention, dont l'indication première reste l'hyperactivité détrusorienne d'origine

neurologique réfractaire chez certains patients atteints d'une lésion médullaire complète, permet d'améliorer la dysfonction intestinale neurologique, avec une diminution spectaculaire du temps passé pour la défécation et une moindre utilisation de suppositoires, de mini lavements et de stimulation rectale digitale(64,65).

Enfin, en cas de dysfonction intestinale neurologique totalement réfractaire, une colostomie peut être discutée en dernier recours(66,67). La colostomie peut apporter du confort de vie(68) chez certains patients en grande difficulté, n'arrivant pas à s'équilibrer malgré l'essai de toutes les autres options thérapeutiques. L'intervention se fait cependant au détriment de l'image corporelle du patient qui se retrouve modifiée. Dans la pratique, il est tout de même peu fréquent de devoir poser une telle indication.

3.2 Focus sur les irrigations coliques antérogrades

A la troisième étape de l'algorithme, l'irrigation colique antérograde peut être proposée aux patients présentant une constipation sévère et une impaction fécale haut située. Les indications de base sont celles d'une stase stercorale (pancolique ou côlon droit) récidivante, résistante aux traitements laxatifs et ne s'équilibrant pas avec les irrigations transanales (ou bien non faisabilité technique de cette dernière).

Le but de cette intervention appelée chirurgie de Malone(69) est de créer, via l'appendice, une stomie continente cathétérisable. Cette technique a été historiquement décrite et beaucoup utilisée chez l'enfant dysgraphique(70). Elle est invasive, suppose une chirurgie abdominale avec des risques de complications non négligeables telles que la sténose de la stomie, les problèmes de cicatrisation et les fuites de liquide fécal, ce qui peut entraîner une révision chirurgicale ou une ablation définitive(71,72). Malgré cela, la chirurgie de Malone a montré son efficacité également dans une population adulte avec dysfonction intestinale neurologique(73).

3.3 Technique percutanée endoscopique

Le 3^{ème} article présenté dans cette thèse nous a permis d'évaluer l'efficacité de cette technique de pose endoscopique du « cathéter de Chait » (Trapdoor™ Cook medical), chez des patients blessés médullaires.

En effet, l'efficacité de la caecostomie percutanée endoscopique, qui est une technique beaucoup moins invasive que le Malone chirurgical et qui a l'avantage de pouvoir être réversible, avait été étudiée chez des patients constipés chroniques qu'ils soient neurologiques ou non (71,72), dans deux études rétrospectives. Chez le patient blessé médullaire, cette technique n'avait pas encore été évaluée. Seules quelques études ont comparé la technique endoscopique avec celle chirurgicale de Malone concernant l'intestin neurologique en général (74). Notre étude présentée ci-après dans la partie des résultats, était une étude prospective, randomisée et contrôlée (article 3) permettant de comparer l'efficacité des irrigations coliques pratiquées par le dispositif posé par voie endoscopique comparé à un traitement médical optimisé, sur la qualité de vie et la dysfonction neurologique de l'intestin.

L'avantage du « cathéter de Chait » est qu'il ne nécessite pas d'ouverture de la paroi abdominale puisque le dispositif se pose sous endoscopie. La coloscopie permet de repérer le caecum, puis le gastro-entérologue utilise la transillumination afin de repérer le point d'ancrage abdominal. Un trocart permet ensuite d'insérer le dispositif sous endoscopie, et de réaliser une caecopexie après cicatrisation grâce à une terminaison du cathéter en hélice à l'intérieur du caecum.

Le dispositif est utilisé tous les 2 jours en moyenne par les patients qui font une irrigation avec entre 750ml et 1L d'eau tiède (Figure 8).

C'est ce système d'attache souple qui permet au dispositif d'être retiré très facilement en cas d'échec ou d'arrêt d'utilisation et qui fait que nous pourrions la proposer désormais dans l'algorithme au niveau des techniques mini-invasives, par exemple juste après l'irrigation transanale.

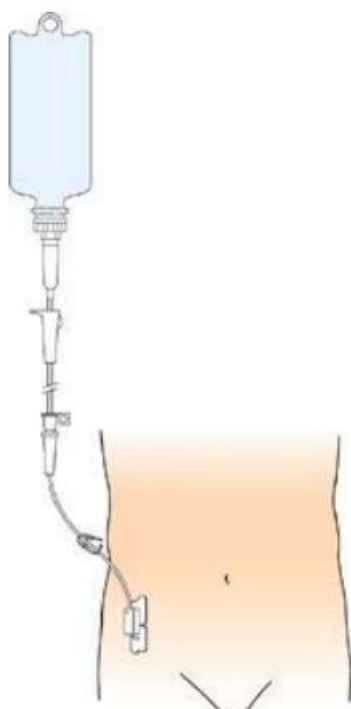


Figure 8 : Utilisation du cathéter de Chait Trapdoor™. Cathéter de Chait. Image de Cook medical®

PARTIE 2 : Innervation digestive et barrière épithéliale intestinale

1 Anatomie et fonctions digestives

1.1 De l'œsophage à l'intestin grêle

L'œsophage mesure environ 25cm de long, a 3 segments principaux (tiers supérieur, moyen et inférieur), et possède deux sphincters, un à chaque extrémité (supérieur et inférieur). Le sphincter œsophagien inférieur est situé à la jonction œsogastrique et forme lui aussi une zone de haute pression en deux parties principales : le sphincter interne (fibres musculaires du bas œsophage) et le sphincter externe (fibres musculaires du fundus gastrique). La musculature œsophagienne est organisée différemment selon que l'on se situe au niveau du tiers supérieur (prolongement de la musculature striée pharyngée) ou des deux tiers inférieurs (2 couches de muscle lisse interne circulaire et externe longitudinale comme dans le reste du tube). L'innervation extrinsèque est constituée du parasympathique véhiculé par le nerf vague, et du sympathique par les ganglions sympathiques cervicaux et thoraciques. L'innervation intrinsèque est surtout constituée du plexus myentérique car le plexus sous-muqueux est peu développé dans l'œsophage, qui a peu de fonctions de sécrétion.

L'estomac est la zone de passage et de transformation des aliments, est constitué du cardia, du fundus, du corps et de l'antrum, se termine ensuite par le pylore faisant office de valve entre estomac et duodénum. Son innervation parasympathique se fait via le nerf vague également, et le contrôle sympathique par les fibres issues du ganglion coélique principalement. L'innervation intrinsèque se fait comme dans le reste du tube, via les deux plexus sous-muqueux et myentérique.

L'intestin grêle est constitué de 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La totalité mesure 3 à 4m de long. Le duodénum démarre juste après le pylore, est enroulé autour du pancréas en 4 segments dont le dernier se termine 30cm plus loin environ au niveau de l'angle de Treitz. Puis le jéjunum correspond au 1^{er} tiers de grêle restant, l'iléon aux 2 derniers tiers.

La fonction principale de l'intestin grêle est d'absorber les nutriments, mais c'est aussi le plus grand organe endocrine du corps. Nous aborderons ces fonctions dans le paragraphe consacré à la barrière épithéliale intestinale.

Au niveau microscopique, l'intestin est organisé comme suit :

- la muqueuse est faite de cryptes et de villosités tapissées d'une monocouche de cellules épithéliales qui reposent sur la lamina propria et la muscularis mucosae.
- la sous-muqueuse est constituée de vaisseaux sanguins, lymphatiques et de nerfs (i.e. le plexus sous-muqueux).
- la musculuse est constituée de deux couches de muscle lisse : la couche musculaire interne qui est formée de fibres circulaires, et la couche musculaire externe qui est formée de fibres longitudinales. Entre les deux couches musculaires se situe le plexus myentérique.
- la séreuse est la couche la plus externe.

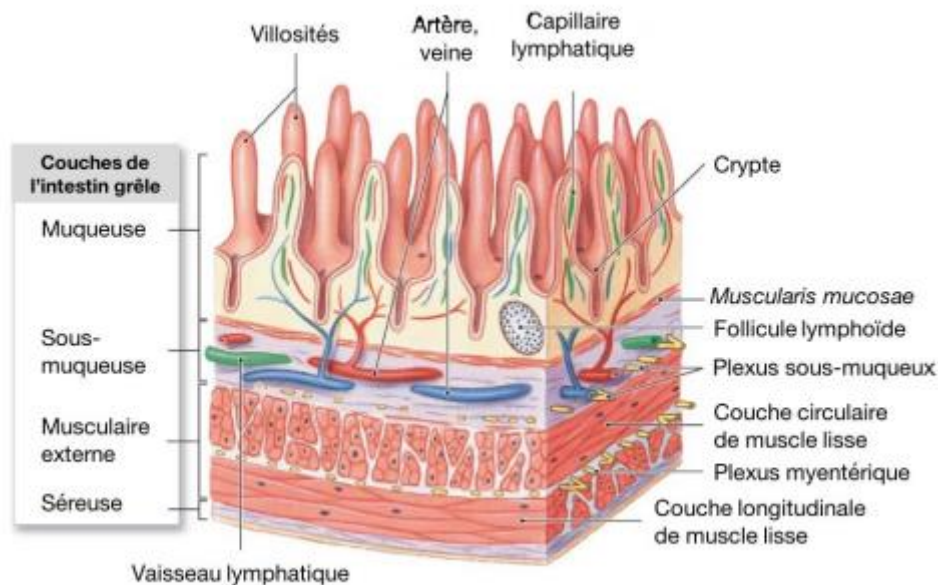


Figure 9 : D'après Martini et Ober(75): coupe transversale de la paroi de l'intestin grêle

1.2 Le côlon

Le côlon débute après la valvule iléo-caecale, est long d'environ 1m à 1,5m, et se termine à l'anus. Les différentes parties qui le composent sont le caecum, le côlon droit ou ascendant, le côlon transverse (de l'angle hépatique à l'angle splénique), le côlon gauche ou descendant, le sigmoïde et le rectum. Nous décrivons le rectum et l'anus au paragraphe suivant.

Les côlons droit et gauche font chacun entre 15 et 20 cm ; le côlon transverse est plus long, de 25 à 40 cm. La largeur colique est d'environ 5 à 8 cm, au-delà de 10 à 12 cm, on parle de mégacôlon. Le côlon droit est vascularisé par l'artère mésentérique supérieure, le côlon gauche par l'artère mésentérique inférieure. Le côlon transverse bénéficie des deux apports artériels qui sont en connexion grâce à l'artère marginale de Drummond. Les veines et vaisseaux lymphatiques suivent la vascularisation artérielle.

Au niveau microscopique, la paroi colique est constituée des mêmes différentes couches structurales que l'intestin grêle : muqueuse, sous-muqueuse (avec le plexus sous-muqueux), musculuse en 2 couches circulaire et longitudinale (avec le plexus myentérique entre les 2 couches), et la séreuse qui correspond au péritoine, qui recouvre une grande partie du côlon sauf la paroi postérieure du côlon ascendant et du côlon descendant, et une partie du rectum, qui sont donc extra-péritonéaux.

L'innervation colique et anorectale est décrite dans les paragraphes suivants.

Le côlon permet de compléter le travail d'absorption effectué par l'intestin grêle, en plus de permettre une ultime transformation des substances nutritives ayant échappé à l'absorption intestinale. L'activité motrice colique est constituée d'ondes contractiles à direction antérograde ou rétrograde sur de courts segments, pour assurer un mouvement de brassage favorisant l'absorption du contenu intestinal. La sommation de ces ondes péristaltiques assure un transport assez lent (de 1 à 3 jours) du contenu colique de proximal en distal. D'autres types de contraction de plus grande amplitude débutent du côlon transverse jusqu'au côlon gauche, 4 à 6 fois par jour (principalement après les repas, elles font partie du réflexe gastro-colique), pour propulser le bolus fécal jusqu'au rectum (76).

1.3 L'anorectum

Le rectum est le segment le plus distal du gros intestin, prolongeant le côlon sigmoïde. La jonction entre les deux est marquée par l'angle recto-sigmoïdien localisé à la hauteur de la vertèbre S3. Le rectum mesure une quinzaine de centimètres chez l'adulte. Il se prolonge en distal par le canal anal avec lequel il forme au repos un angle droit, ouvert en arrière et dont l'angulation dépend de la contraction du muscle pubo-rectal. Le rectum est extra-péritonéal dans son tiers inférieur et suit la concavité sacrée.

Le rectum haut est irrigué par l'artère rectale supérieure issue de la mésentérique inférieure, les artères rectales moyenne et inférieure qui vascularisent le reste du rectum sont issues des artères iliaques internes. Les veines et vaisseaux lymphatiques suivent la vascularisation artérielle.

Le rectum comprend les mêmes couches structurelles que le côlon : muqueuse, sous-muqueuse, musculuse (deux couches de muscle lisse : circulaire et longitudinale) et la séreuse n'est présente qu'au tiers supérieur (péritoine). Au niveau des deux tiers inférieurs le rectum est entouré du mésorectum.

Le rectum et l'anus ont pour fonctions d'assurer la continence et l'évacuation du contenu endoluminal. Ceci est permis par la modulation des relations établies entre une zone de basse pression qui fait fonction de réservoir (le rectum) et une zone de haute pression ayant fonction de résistance (l'anus).

Ce sont les couches musculaires lisses du rectum avec le sphincter anal interne qui en émane et les muscles striés du pelvis qui assurent à la fois la continence et l'évacuation du flux fécal colique. Le rectum possède une enveloppe musculaire lisse anatomiquement et fonctionnellement homogène(77). La motricité du rectum est caractérisée par la survenue d'ondes d'amplitude et de durée plus faibles que celles du canal anal(76).

Le canal anal mesure 3 cm environ, il est la partie terminale du tractus digestif. Il est limité en haut par la ligne anorectale et en bas par la marge anale située au niveau du périnée postérieur. Le complexe sphinctérien se compose d'un muscle lisse interne (sphincter anal interne) et d'un muscle strié externe (sphincter anal externe) unis par un réseau fibromusculaire (couche longitudinale complexe).

Le sphincter anal interne a un tonus permanent, qui assure la plus grande partie de la pression de repos enregistrée au niveau du canal anal. Il n'y a pas de commande volontaire de ce muscle lisse.

Le sphincter anal externe est à l'inverse un muscle strié à commande volontaire, constitué de deux faisceaux, superficiel et profond.

2 L'innervation colique et anorectale

Le système nerveux autonome comprend classiquement le système végétatif extrinsèque avec ses contingents sympathique et parasympathique, et le système nerveux entérique (SNE).

On parle de système sympathique lorsque les fibres pré et post ganglionnaires font relais dans un ganglion situé en dehors de l'organe, proches de la moelle épinière, et de système parasympathique lorsque le relais synaptique se fait au niveau de l'organe.

Le tube digestif possède à la fois une innervation extrinsèque comprenant au niveau du pelvis, l'innervation somatique et l'innervation autonome sympathique et parasympathique ; et à la fois une innervation intrinsèque ou intramurale, c'est-à-dire le SNE. Nous détaillons ci-après la partie concernant le côlon et l'anorectum.

2.1 L'innervation extrinsèque autonome

2.1.1 *Système sympathique*

L'innervation sympathique du tube digestif supérieur est assurée par les neurones pré ganglionnaires sympathiques, localisés dans le segment spinal thoracique supérieur (T1-T5). L'intestin grêle et le côlon sont contrôlés par les neurones pré ganglionnaires sympathiques localisés dans les segments spinaux T6-T12, via le nerf grand splanchnique. Plus particulièrement pour le côlon, les efférences sympathiques proviennent du centre sympathique thoraco-lombal situé entre T9 et T12 via les nerfs coliques lombaires, pour l'anorectum il s'agit plutôt des segments T12 à L2 via le nerf hypogastrique.

Le système sympathique a pour rôle principal de relâcher les parois digestives et rectales, et d'assurer le tonus du sphincter anal interne (lisse).

2.1.2 Système parasympathique

L'innervation extrinsèque parasympathique du côlon se fait via le nerf vague pour toute la partie proximale du côlon, jusqu'à l'angle splénique et au reste du côlon et du rectum par l'intermédiaire des nerfs pelviens émergeant du centre parasympathique sacré situé de S2 à S4. Ces deux systèmes parasympathiques sont interconnectés. Le rôle de l'activité parasympathique est de favoriser le péristaltisme et la sécrétion tout en relaxant le sphincter anal interne (lisse).

Le schéma suivant (figure 10) montre l'innervation extrinsèque colique.

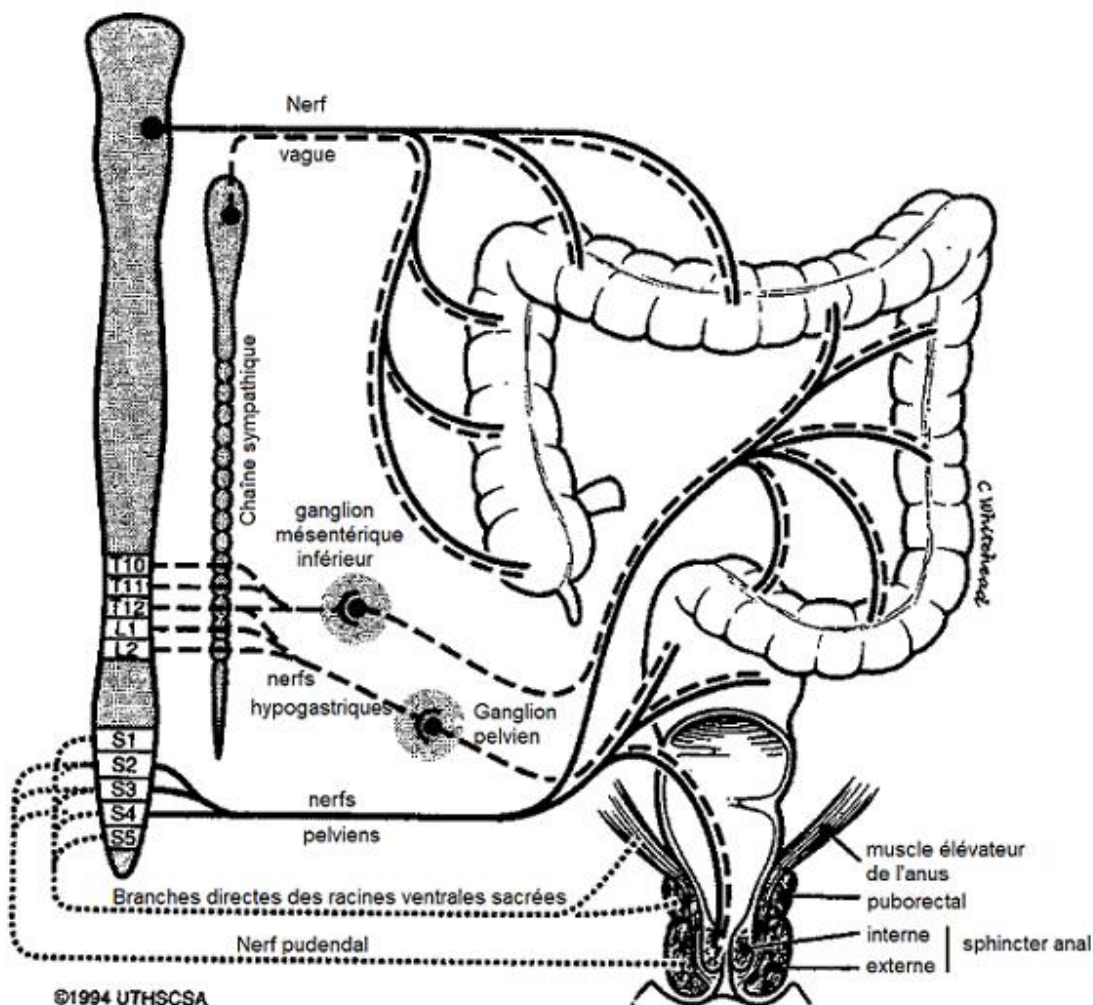


Figure 10 : D'après(78), innervation extrinsèque colique.

2.2 L'innervation extrinsèque somatique

L'innervation extrinsèque somatique des muscles striés du périnée assure la continence volontaire via le contrôle volontaire du sphincter strié externe. Elle provient des dernières racines sacrées, via les nerfs pudendaux. Les corps cellulaires des motoneurones se situent dans les segments médullaires de S1 à S3 et dans la partie ventrale de la corne antérieure, cette zone correspond au noyau d'Onuf chez l'Homme(79). La partie la plus périphérique de la musculature pelvienne reçoit une innervation, directement de la moelle épinière, par une branche issue des racines ventrales sacrées S3 et S4.

2.3 L'innervation intrinsèque : le système nerveux entérique

Le système nerveux entérique (SNE) constitue l'innervation intrinsèque du tube digestif. Il a la particularité de pouvoir régir certaines fonctions digestives indépendamment du système nerveux central extrinsèque(80). Il est composé de réseaux neuronaux, comprenant environ 100 millions de neurones et 400 millions de cellules gliales. Il se compose majoritairement de deux plexus ganglionnaires, qui ont des fonctions différentes : le plexus myentérique (anciennement d'Auerbach) et le plexus sous-muqueux (anciennement de Meissner)(81). La figure 11 représente l'organisation anatomique du système nerveux entérique (SNE) chez les grands mammifères (D'après (82)).

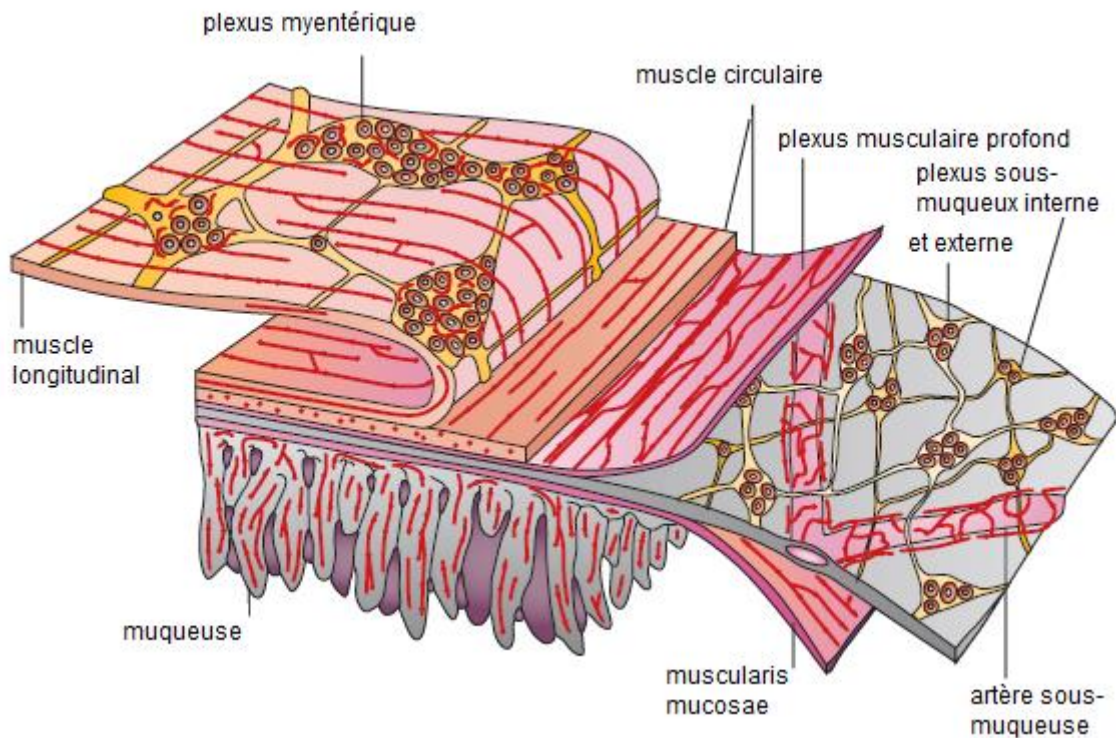


Figure 11 d'après (82): Organisation du SNE en deux plexus : le plexus myentérique situé entre les deux couches de muscle lisse (longitudinale et circulaire), et le plexus sous-muqueux situé comme son nom l'indique, sous la muqueuse. Les faisceaux de fibres nerveuses relient les ganglions entre eux en innervant le muscle longitudinal, circulaire, la muscularis mucosae, les artères intrinsèques et la muqueuse. Les axones des neurones extrinsèques viennent aussi jusque dans ces faisceaux de fibres nerveuses.

Le SNE contrôle les principales fonctions digestives : la motricité en coordonnant le péristaltisme intestinal, la perméabilité, la prolifération cellulaire épithéliale, la sécrétion de mucus, et le contrôle du flux sanguin dans la région sous muqueuse en modulant les fonctions de la barrière épithéliale intestinale.

De manière physiologique, le plexus myentérique contrôle plutôt la motricité gastro-intestinale, tandis que le plexus sous-muqueux régule la barrière épithéliale, les phénomènes de vasomotricité, d'absorption et de sécrétion(83). Il existe 14 sous-types(84) de neurones identifiés selon leur fonction et leur profil neurochimique, que l'on peut classer en trois grandes classes de neurones entériques : les neurones sensitifs intrinsèques ou IPAN (Intrinsic Primary Afferent Neurons), les interneurons et les neurones moteurs effecteurs.

En ce qui concerne l'activité motrice du côlon et du rectum, dans le plexus myentérique les neurones effecteurs sont soit des motoneurones excitateurs produisant majoritairement de l'acétylcholine (ACh), soit des neurones inhibiteurs sécrétant principalement de l'oxyde nitrique (NO) ou du peptide intestinal vasoactif (VIP). Ainsi, un message chimique ou mécanique déclenché par le contenu luminal active les IPAN, qui, par le biais des interneurones, activent les neurones cholinergiques en amont du contenu luminal pour contracter le muscle lisse colique et les neurones nitrergiques pour relaxer le muscle lisse en aval et permettre la propulsion du contenu du tube digestif(85). Dans le plexus sous-muqueux, les neurones effecteurs sont des neurones sécrétomoteurs produisant de l'ACh et/ou du VIP en majorité. Ces neurones peuvent également réguler des fonctions telles que les processus de perméabilité paracellulaire ou transcellulaire et de réparation de la BEI (86), mais aussi la migration des cellules immunitaires(87). Les plexus sous-muqueux et myentérique forment un circuit intégré synchronisant notamment la motricité colique avec la sécrétion muqueuse afin de permettre la progression du contenu luminal(88).

La figure 12 d'après Spencer et al., explique les circuits neuronaux entériques.

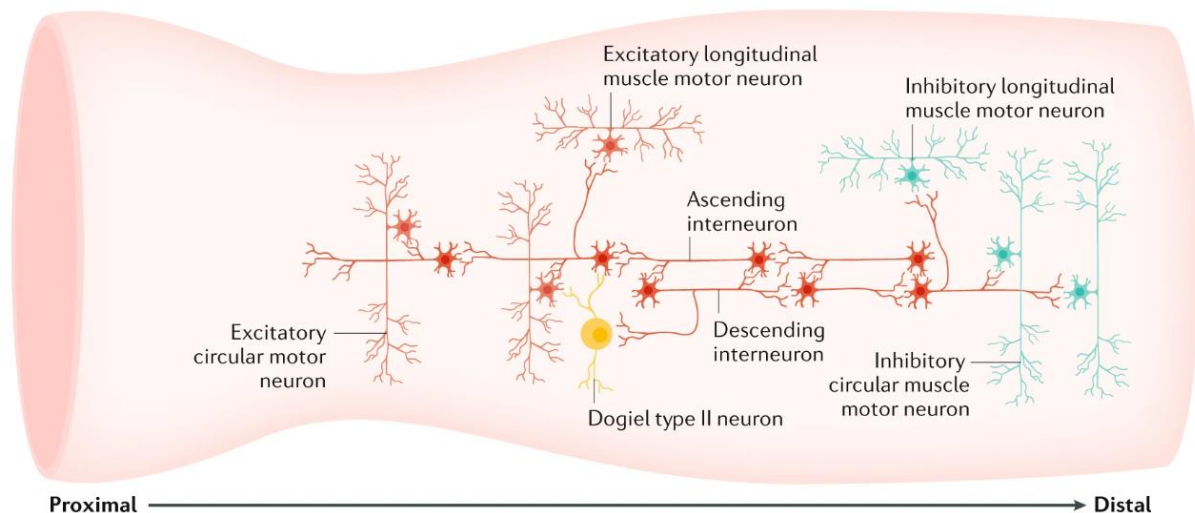


Figure 12 : d'après Spencer et al (85) : Ce réseau implique la convergence synaptique des interneurones ascendants et descendants, de sorte qu'une activation accrue des voies ascendantes entraîne une activation accrue correspondante des voies inhibitrices descendantes. Le déclenchement coordonné dans le temps des interneurones ascendants et descendants active simultanément les motoneurones excitateurs cholinergiques en amont et les motoneurones inhibiteurs nitrergiques en aval. Ces voies sous-tendent les principaux schémas de motilité neurogène dans le gros intestin.

2.4 Liens entre innervation extrinsèque et intrinsèque

Dans les conditions physiologiques, les fonctions du tube digestif sont à la fois régulées par l'action coordonnée du système nerveux végétatif extrinsèque, sympathique et parasympathique, ainsi que du SNE. Nous savons que la motricité colique dépend du SNE pour la propulsion du contenu colique puisque cette motricité colique n'existe plus lorsque le SNE du côlon gauche et du rectum est absent de manière congénitale, comme dans la maladie de Hirschsprung (89), ou lorsqu'il dégénère comme dans la maladie de Chagas(90). De plus, il est possible d'enregistrer un péristaltisme conservé sur segments de côlons isolés donc après dénervation extrinsèque totale (85), suggérant l'indépendance totale du SNE pour la genèse de la motricité colique.

Mais il existe une modulation du SNE par les systèmes végétatifs extrinsèques sympathiques et parasympathiques, qui activent respectivement les neurones inhibiteurs et excitateurs, noradrénergiques et cholinergiques.

Le schéma de Furness(82) (Figure 13) ci-dessous illustre les interactions entre SNE et SNC.

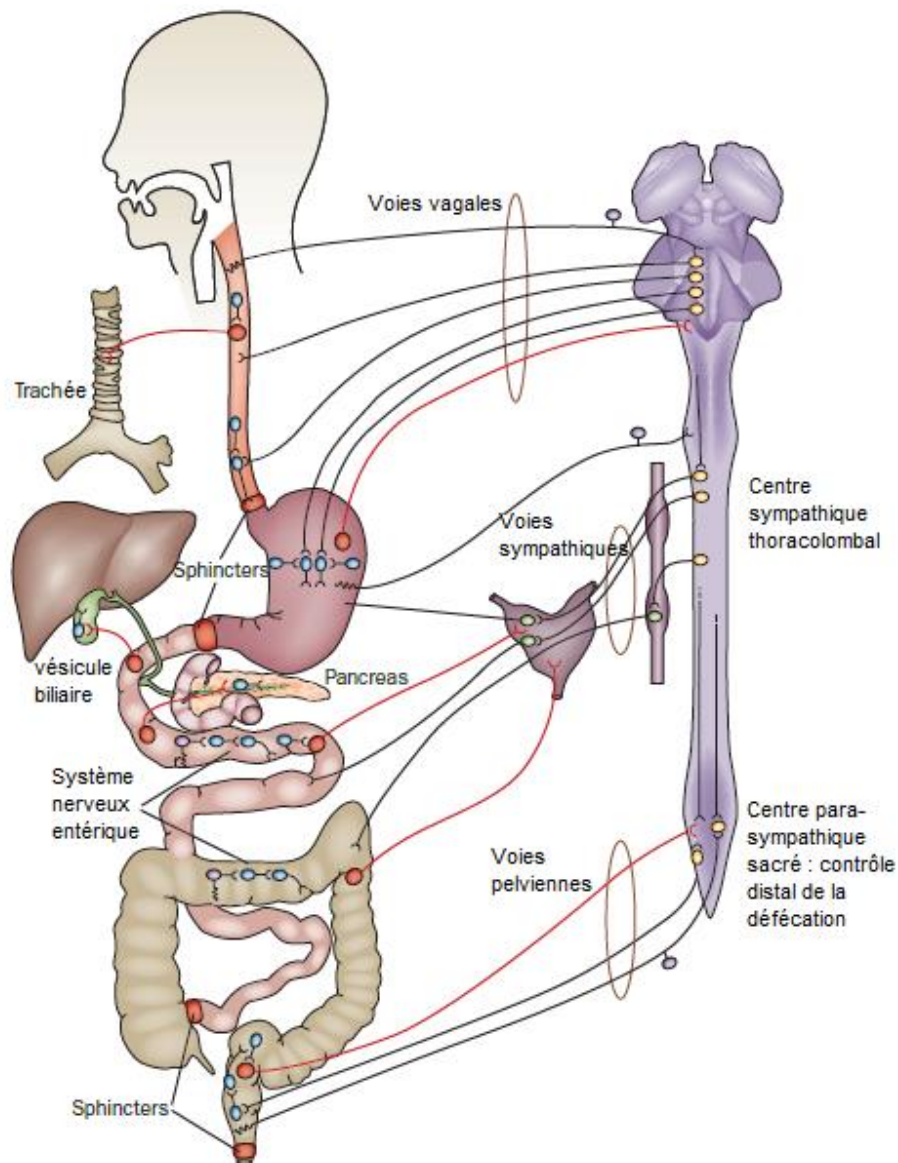


Figure 13 : L'innervation du tractus gastro-intestinal. D'après (82)

Schéma représentant les connexions neuronales entre le système nerveux entérique (SNE) et le système nerveux central (SNC), et les connexions neuronales entre les organes gastro-intestinaux. Le système digestif comprend les circuits réflexes complets du SNE (neurones moteurs et interneurons en bleu, neurones sensoriels en violet). Les voies du tractus gastro-intestinal se projettent vers l'extérieur, via les neurones intestino-fuges (rouges), vers le SNC (neurones en jaune), les ganglions sympathiques, la vésicule biliaire et le pancréas. Les neurones des ganglions prévertébraux sympathiques (en vert) reçoivent à la fois des entrées du SNC et du SNE. Les informations sensorielles vont à la fois vers le SNE, via les neurones afférents primaires intrinsèques (sensoriels) (en violet) et vers le SNC via les neurones afférents primaires extrinsèques (également en violet) qui suivent les voies afférentes spinales et vagues. Les voies du SNC atteignent le SNE et les tissus effecteurs gastro-intestinaux par des voies vagues, sympathiques et pelviennes.

3 La barrière épithéliale intestinale

3.1 Anatomie et fonctions

La barrière épithéliale intestinale (BEI) est formée d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales, qui tapissent le tube digestif depuis l'estomac jusqu'au rectum. Cet épithélium est organisé en une succession de villosités, qui fournissent une vaste surface d'absorption et de cryptes. Les cellules souches épithéliales sont situées dans le fond de ces cryptes. Les cellules épithéliales sont issues de ces cellules souches, et sont en constant renouvellement. Elles se différencient en différents sous-types (entérocytes, cellules caliciformes (= cellules à mucus), cellules enteroendocrines, cellules de Paneth (iléales et non coliques, cellules immunitaires situées au fond des cryptes), cellules tufts (impliquées dans la réponse immune de type 2 (parasites, allergies)), tout en migrant vers la surface de ces cryptes(91). La figure 14 reprend ces éléments.

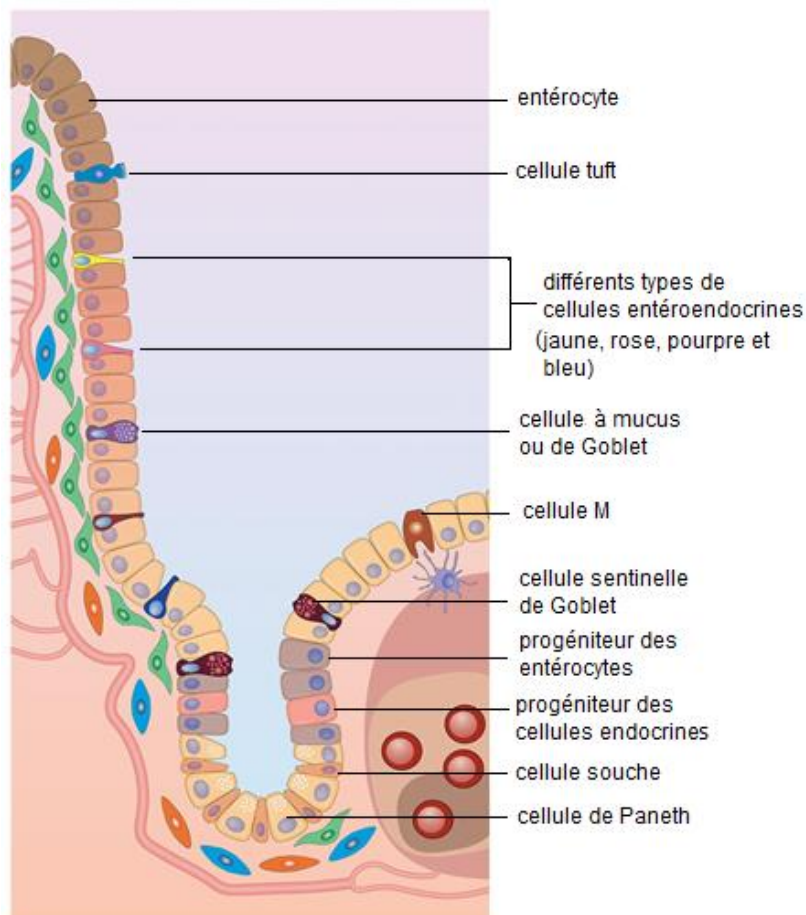


Figure 14 d'après (92) : les différentes cellules épithéliales intestinales et leur organisation au sein des cryptes et villosités.

La barrière épithéliale intestinale a la double fonction 1) d'assurer l'absorption des nutriments et électrolytes du contenu luminal(93,94) et 2) d'empêcher la pénétration de molécules et de micro-organismes du contenu luminal, potentiellement pathogènes. Ces fonctions complexes et apparemment opposées nécessitent la présence de cellules et de structures très spécialisées situées stratégiquement le long du tube digestif et agissant en synergie pour maintenir l'intégrité de la barrière. La barrière épithéliale intestinale est une barrière d'abord physique (l'épithélium), mais aussi biochimique (électrolytes, mucus, peptides antimicrobiens) et immunologique hautement intégrés.

Les cellules épithéliales sont reliées les unes aux autres par des jonctions serrées(95). Ce sont les processus de perméabilité transcellulaire et paracellulaire qui régulent en partie cette

fonction de barrière physique(96). Les voies de la perméabilité sont bien résumées dans la figure 15 ci-dessous(97).

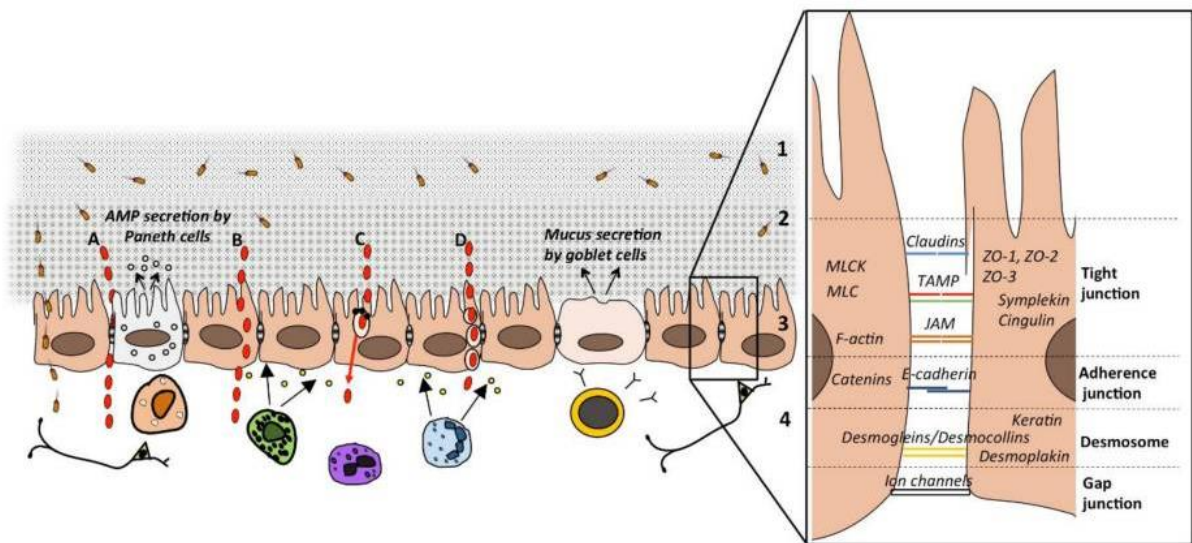


Figure 15 d'après(97) : Voies de passages à travers l'épithélium. (A) voie paracellulaire (gros solutés hydrophiles) ; (B) voie transcellulaire (petits solutés hydrophiles et lipophiles) (C) ; voie transcellulaire via les pores aqueux (petits solutés hydrophiles) ou absorption active médiée par un transporteur (nutriments) ; ou (D) endocytose, suivie de transcytose et d'exocytose (grosses particules, peptides et protéines).

De nombreuses études ont montré que l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale est essentielle pour la santé(98). Les défauts de la fonction de barrière peuvent conduire à une activation immunitaire chronique contribuant à des maladies locales et systémiques, notamment la maladie coéliquaue, le cancer colorectal, les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) et les troubles métaboliques tels que l'obésité et le diabète(99–103). Mais la perte de l'intégrité de la barrière semble avoir des conséquences néfastes bien au-delà de l'intestin puisque des études ont mis en évidence qu'un dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale contribue aussi à la survenue de troubles du système nerveux central comme par exemple la maladie de Parkinson(104,105), la maladie d'Alzheimer(106), la sclérose en plaques(107)...

La BEI a également une fonction de réparation qui permet d'assurer l'intégrité et la protection de l'organisme. La réparation met en jeu des processus de migration, étalement, prolifération et différenciation des cellules épithéliales(108) dont l'intégrité est indispensable au maintien de la santé.

3.2 Focus sur les cellules entéroendocrines et le rôle de la sérotonine dans la régulation de la motricité intestinale.

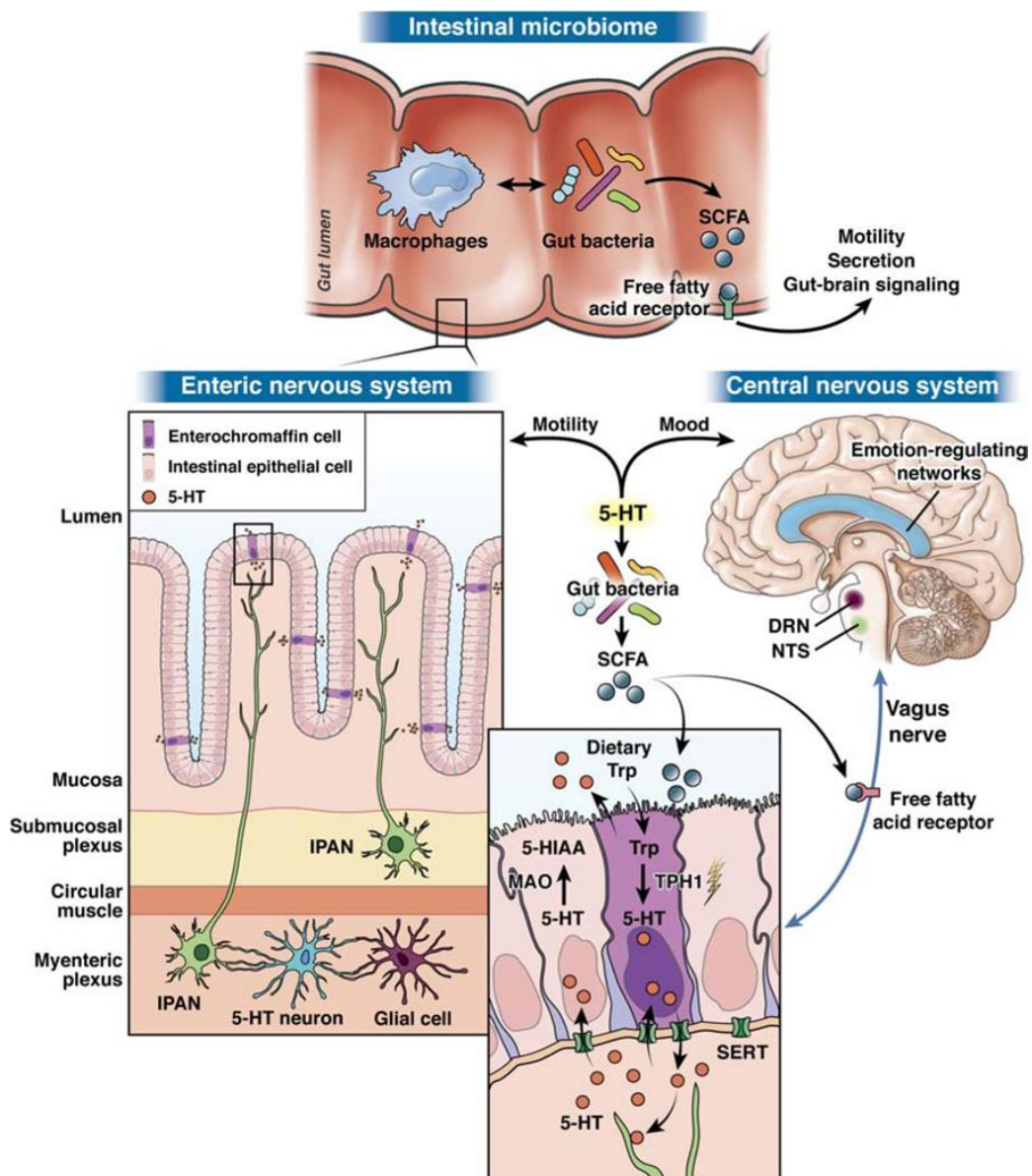
La sérotonine [5-hydroxytryptamine (5-HT)] est un neurotransmetteur et une hormone ayant diverses fonctions biologiques, dont la modulation de la sécrétion et de la motricité intestinales. La grande majorité de la 5-HT (>90 %) présente dans le corps humain est produite par les cellules entérochromaffines (CEC) de l'intestin(88), qui sont un sous-type des cellules entéroendocrines (CEE), où elle est synthétisée par l'enzyme tryptophane hydroxylase 1 (TPH1), dont le taux en détermine la production, et stockée dans des granules sécrétoires avant d'être libérée. Les CEE sont dispersées le long de l'épithélium digestif et sont identifiées par les peptides et transmetteurs qu'elles contiennent dans leurs granules sécrétoires. La plupart sécrètent une pro-hormone, la Chromogranine A, considérée comme un marqueur général des CEE(109). Dans les pathologies motrices digestives comme le syndrome de l'intestin irritable (SII), il existe une atteinte de ce système avec une dysrégulation des voies de signalisation de la sérotonine digestive (110). L'atteinte de la BEI et la microinflammation locale retrouvées dans ces maladies pourraient être consécutives ou associées à cette dysrégulation entéroendocrine(111).

Les CEC fonctionnent comme des senseurs luminaux, et l'augmentation de la pression dans la lumière du côlon entraîne une modification du niveau de la 5-HT endogène luminale (112). Le rôle de la sérotonine dérivée des CEC dans la modulation de la motilité gastro-intestinale a été bien décrit(113). Elle est un neurotransmetteur phare dans la physiologie digestive notamment dans la régulation de la motricité, l'un des stimuli chimiques des IPAN du SNE, permettant la régulation du péristaltisme (85). Il existe des récepteurs à la sérotonine (récepteurs 5-HT₃) sur les IPAN du SNE, qui lorsqu'ils sont activés par la 5-HT, vont activer la motricité (114). Il est décrit dans la littérature qu'une concentration faible de 5-HT ne permet pas l'activation des IPAN (114) ; et à l'inverse une augmentation de la concentration de 5-HT (par exemple par perte de la fonction de recapture via le récepteur de la sérotonine (SERT) ou par surproduction, peut aussi entraîner à l'inverse une désensibilisation du récepteur 5-HT₃ et entraîner un défaut de motricité colique et donc une constipation (115). Par exemple, dans l'étude de Costedio (116), le syndrome de constipation chronique était directement associé à

une augmentation de la transcription de TPH1, de la teneur en 5-HT et de la libération de 5-HT, alors que le nombre de cellules entéroendocrines et les niveaux de transcription du récepteur de la 5-HT (SERT) n'étaient pas modifiés.

Le récepteur de la sérotonine 5-HT₄ est présent sur un grand nombre de neurones et libère l'acétylcholine (ACh) présynaptique pour activer l'ensemble du réseau neuronal du SNE. L'administration luminale d'agonistes du récepteur 5-HT₄ (le prucalopride par exemple) accélère la motilité propulsive dans les modèles animaux(117) et a été testée chez l'homme y compris le blessé médullaire (118) avec efficacité sur la motricité digestive, mais son autorisation de mise sur le marché (Resolor®) reste restrictive en raison des effets secondaires (cardiaques notamment).

La sérotonine (5-HT) est aussi considérée comme un régulateur-clé (119) de la signalisation de l'axe intestin-cerveau-microbiome. En effet les bactéries du microbiote intestinal produisent des acides gras à chaîne courte (AGCC), en particulier le butyrate (120) qui stimulent directement la tryptophane hydroxylase 1 (TPH1), ce qui entraîne la synthèse et la sécrétion de 5-HT dans les CEC intestinales. La 5-HT libérée par la membrane basale des CEC intestinales interagit ensuite avec les récepteurs (5-HT₃ et 5-HT₄) des neurones du système nerveux entérique pour moduler la motricité digestive. Les afférences vagales envoient des signaux aux noyaux du tractus solitaire (NTS) et du raphé dorsal (DRN), abritant la majorité des neurones 5-HT du cerveau. Ces zones interagissent ensuite avec les réseaux cérébraux régulateurs des émotions qui influencent l'humeur. Ces éléments sont repris dans la figure 16.



La figure 16 (119) montre la sérotonine comme un régulateur critique de l'axe intestin-cerveau-microbiome.

4 Revue de littérature concernant les modifications connues du SNE et de la BEI après lésion médullaire

Les altérations du fonctionnement colique et anorectal après une lésion médullaire ne sont pas encore complètement comprises. Les recherches menées à ce jour ont plus fréquemment porté sur la perte de régulation supraspinale des circuits somatiques (121,122) et autonomes de la moelle épinière (121,123). Mais au-delà de la régulation supraspinale des réflexes intestinaux, des preuves récemment apparues suggèrent que la dysrégulation colique s'accompagne d'un remodelage du SNE.

Ce remodelage pourrait d'une part être la conséquence directe des effets de l'interruption des entrées supraspinales sur les neurones préganglionnaires autonomes extrinsèques, *associée* aux dommages causés aux circuits intrinsèques par l'inflammation locale et systémique comme le suggèrent White et Holmes (124) (figure 17). Mais ils pourraient d'autre part être une conséquence *indirecte* de l'interruption des influx supraspinaux qui entraîne une cascade inflammatoire, qui elle-même va moduler le SNE.

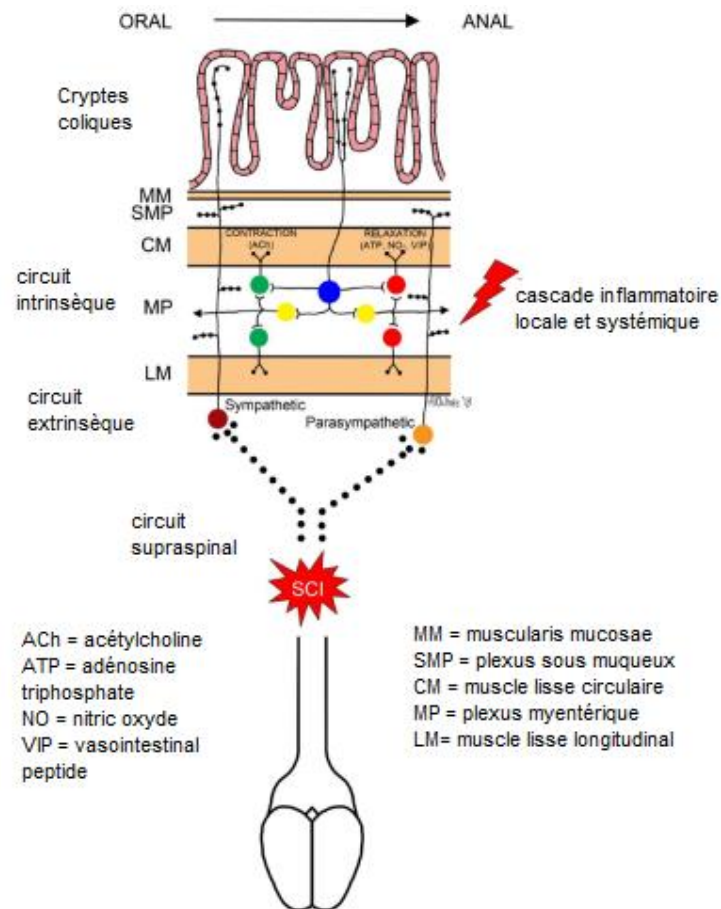


Figure 17 : D'après White and Holmes (124)

Schéma simplifié du circuit neuronal entérique impliqué dans les contractions coliques. Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN pour « intrinsic primary afferent neuron » ; bleu) du plexus myentérique (MP) transforment les stimuli mécaniques (étirement) ou chimiques de la lumière colique. Les IPAN font synapse à des interneurones (jaunes) qui se projettent de façon proximale (orale, en amont) et distale (caudale ou anale, en aval). Les interneurones se projetant en amont font synapse sur des motoneurones excitateurs (verts) qui utilisent l'acétylcholine (ACh) comme neurotransmetteur primaire pour provoquer la contraction des muscles lisses circulaires et longitudinaux (CM et LM, respectivement pour circular muscle et longitudinal muscle). Les interneurones se projetant en aval font synapse sur des motoneurones inhibiteurs (rouges) qui utilisent la neurotransmission purinergique (ATP) rapide ou la neurotransmission nitrergique (NO-) plus lente pour provoquer la relaxation des muscles lisses circulaires et longitudinaux, générant ainsi un gradient de pression pour le mouvement du contenu du côlon. Le peptide intestinal vasoactif (VIP) est également impliqué dans la neurotransmission inhibitrice. Ces circuits neuronaux intrinsèques sont modulés par l'innervation extrinsèque par les fibres des systèmes nerveux sympathique et parasympathique qui se projettent également dans le plexus sous-muqueux (SMP) attenant à la muscularis mucosae (MM).

Par ailleurs, le remodelage du SNE en réponse à l'inflammation est reconnu comme un facteur conduisant à la dysmotilité colique dans d'autres modèles physiopathologiques d'atteinte motrice comme le syndrome de constipation chronique, le SII, la maladie de Hirschsprung (89,125,126). D'autre part, des atteintes du SNE et de la BEI ont été observées dans d'autres pathologies du système nerveux central (maladie de Parkinson, troubles du spectre autistique...) et sont considérées comme des acteurs majeurs des comorbidités digestives dans ces pathologies (127).

Nous nous sommes donc intéressés aux études principales qui ont regardé les modifications du SNE et de la BEI après une lésion médullaire.

4.1 Modifications du système nerveux entérique

Concernant les modifications du SNE après lésion médullaire, les éléments retrouvés dans la littérature concernaient : 1) l'atteinte motrice et les modifications de la réponse musculaire et au niveau des récepteurs neuromusculaires, avec des différences entre côlon proximal et distal et entre lésion aigüe ou chronique dans les modèles expérimentaux ; 2) l'atteinte du phénotype du SNE avec de la même manière des différences entre les segments proximaux et distaux et une évolution au cours du temps, 3) les paramètres de l'inflammation.

4.1.1 Atteinte motrice et réponse musculaire

Sur la partie haute du tube digestif, une étude a montré que la vidange gastrique était significativement réduite (128), dans un modèle de rats mâles spinalisés en T3, pendant 3 semaines après la lésion et tend à revenir à la normale 6 semaines après, suggérant une variation temps-dépendante.

En ce qui concerne le côlon, une étude(129) dans un modèle de rats mâles spinalisés en T10 en période aigüe (1 semaine) a montré que la réponse contractile (motricité *ex vivo*) à l'ACH dans le côlon proximal était augmentée chez les rats spinalisés, mais pas dans le côlon distal (figure 18), suggérant une éventuelle régionalisation des modifications de contractilité colique.

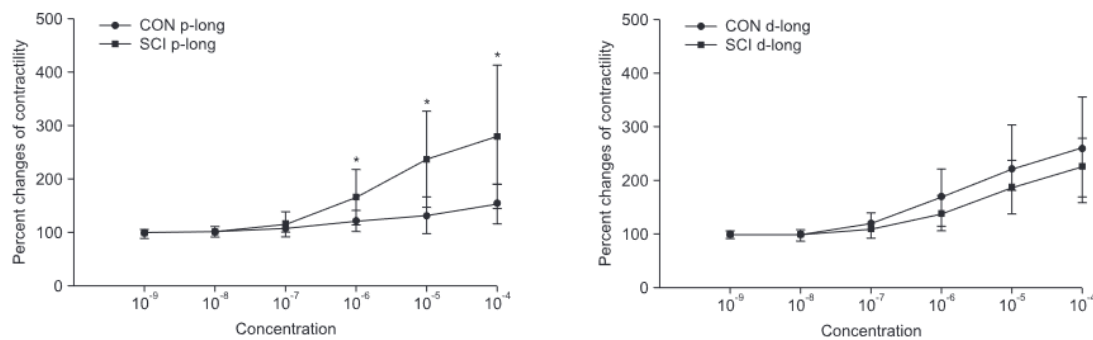


Figure 18 : Joo et al.(129), Motricité *ex vivo*. Etude de la contractilité du muscle lisse colique en réponse à des doses croissantes d'ACh, à gauche dans le côlon proximal, à droite dans le côlon distal.

Cette donnée semble contre-intuitive, car l'on s'attendrait préférentiellement à une diminution de la réponse contractile... D'autres études ont trouvé des modifications dans ce sens, à savoir l'équipe de Bai et al.(130) même si l'accès à cet article entier était impossible, la motricité colique (*ex vivo* ?) semblait diminuée dans le côlon des rats spinalisés (hauteur de la lésion non connue) selon le résumé de l'étude.

On peut éventuellement suggérer que la hauteur de la lésion, en T10 pour Joo(129), et son caractère aigu, peuvent expliquer la différence de résultat avec d'autres études comme celle de Frias(131) qui retrouvait chez des rats spinalisés en thoracique haut (T3), et à 4 semaines d'évolution, à la fois un ralentissement du transit total (fecal pellets output) avec impaction fécale dans le côlon distal (figure 19) et, en motricité *ex vivo*, une réduction de la contractilité du côlon, plus importante dans le côlon distal que proximal (à la différence de Joo).

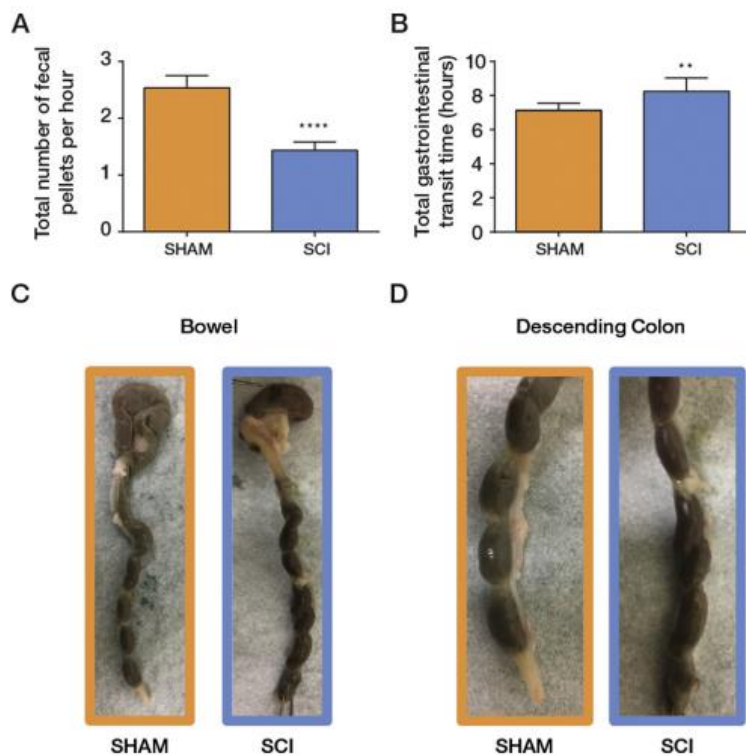


Figure 19 : Frias(131). Nombre de selles sur 1h, réduit après SCI (A), temps de transit total allongé chez les SCI (B), et impaction de selles sévère dans le côlon distal (D), moins évidente dans le côlon proximal (C) des rats spinalisés (en T3).

L'hypothèse soulevée dans cette étude(131) serait le manque de sensibilité des récepteurs muscariniques M3. Ces récepteurs muscariniques M2 et M3 ont aussi été étudiés par Joo (129) mais ils retrouvaient à l'inverse une réponse augmentée des récepteurs M3 dans le côlon proximal pouvant expliquer l'augmentation de la réponse contractile *ex vivo* dans le côlon proximal, alors que dans le côlon distal ils observaient plutôt une réduction de la contractilité colique distale (*ex vivo*) liée à une réponse réduite des récepteurs M2.

Une autre étude dans le côlon(124) a montré *in vivo* (sur rat anesthésié, spinalisé en T3) une diminution des contractions spontanées coliques proximales et distales mais prédominant dans le côlon distal, visibles uniquement à 3 semaines post-lésion dans le côlon proximal, et dès 3 jours puis à 3 semaines post-lésion dans le côlon distal, suggérant là encore une régionalisation de l'atteinte et une évolution au cours du temps.

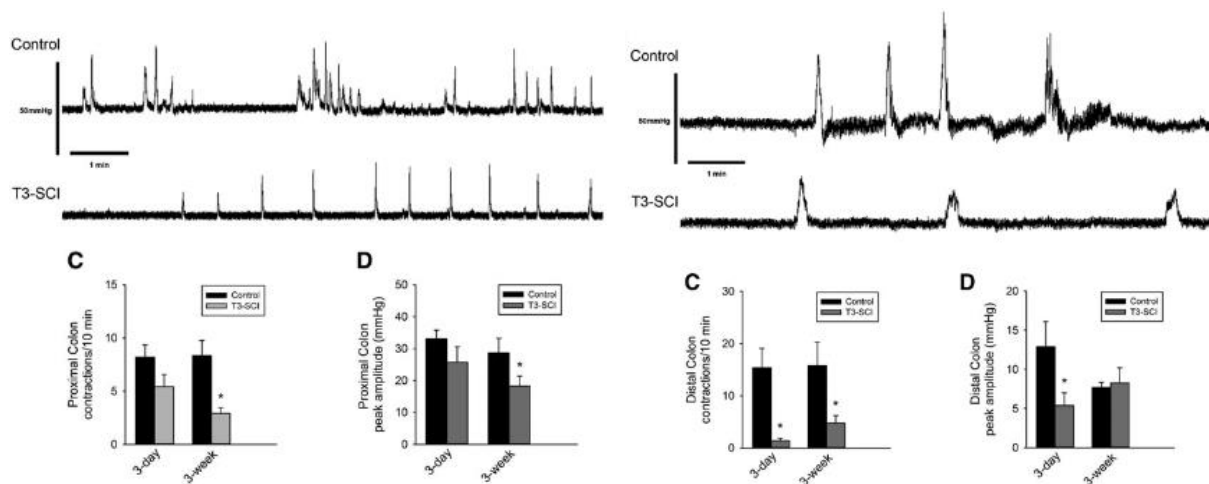


Figure 20 : d'après White (124): à gauche, contractions spontanées dans le côlon proximal, à droite dans le côlon distal : la diminution est observée dans les deux côlons proximal et distal mais prédomine dans le côlon distal.

4.1.2 Atteinte des neurones entériques, du phénotype neurochimique du SNE et des différents neurotransmetteurs

1) Plusieurs études ont retrouvé une diminution du nombre total de neurones entériques dans le côlon sur modèle de rat spinalisé. La quantité de neurones entériques marqués PGP9.5 était diminuée dans le côlon proximal et distal des rats spinalisés en T10 par rapport aux rats contrôles, à 1 semaine post-lésion(129). L'étude de White et Holmes(124) montrait également une diminution globale des neurones entériques marqués HuC/D, avec une aggravation au cours du temps puisque la diminution était plus importante à 3 semaines qu'à 3 jours post-lésion (figure 21).

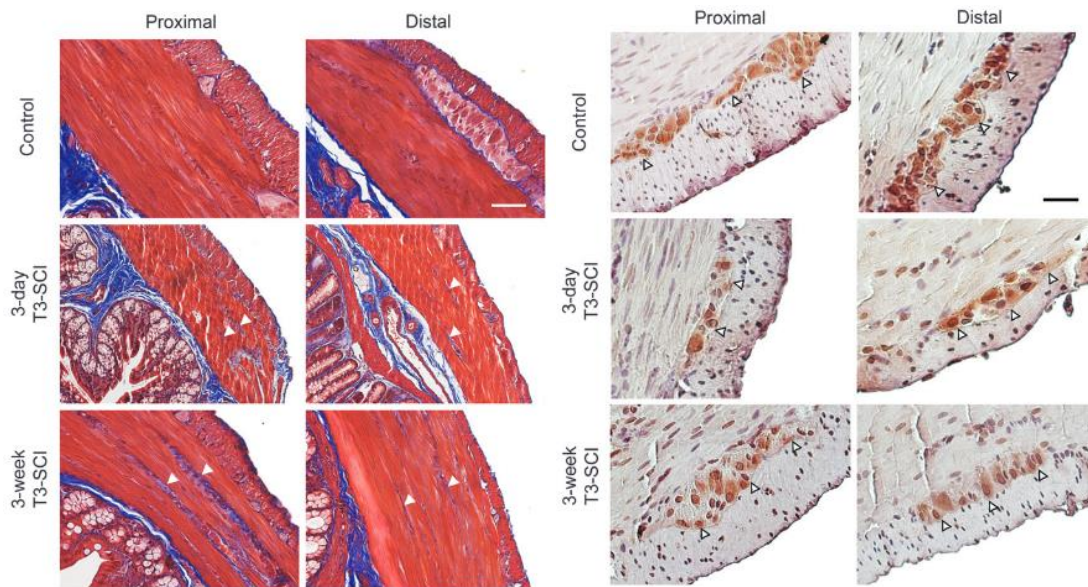


Figure 21 : d'après White(124): altération de l'épaisseur musculaire du côlon proximal et distal avec infiltration collagène (à gauche), et diminution du nombre de neurones entériques marqués HuC/D (à droite) à 3 jours et 3 semaines post-lésion T3.

La seule étude qui existe chez l'homme (132) a de la même façon montré une diminution du nombre de neurones entériques dans le plexus myentérique colique (mais pas dans le plexus sous-muqueux), ainsi qu'une perturbation du réseau de cellules de Cajal autour du plexus myentérique, une diminution de la densité de la glie myentérique chez les patients blessés médullaires comparés aux contrôles, sachant que les pièces coliques étudiées étaient issues de cohortes rétrospectives de résections coliques anciennes subies pour des causes variées.

2) Concernant le type de neurones atteints et l'expression des neurotransmetteurs, une étude chez des rats mâles spinalisés en T3(133), a mis en évidence une diminution de la densité des neurones nNOS et ChaT dans le plexus myentérique du côlon distal, sur des coupes histologiques marquées, 3 semaines après la lésion (figure 22).

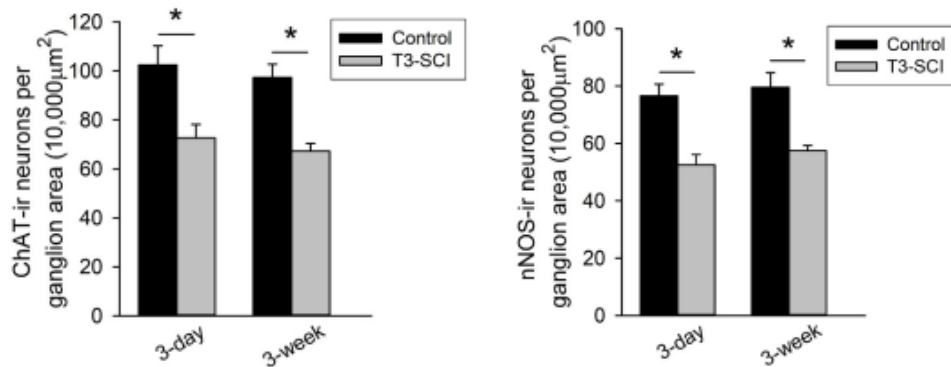


Figure 22 d'après (133) : Diminution des neurones marqués ChaT et nNOS dans le côlon distal après 3 jours et 3 semaines d'une lésion médullaire T3 chez le rat.

De la même manière dans l'étude de Kabatas(134), sur un modèle de rat femelle spinalisée en T10-T11, il n'y avait pas d'étude sur le côlon, mais l'étude a montré la réduction de la transmission purinergique dans l'antré et le duodénum, une réduction des neurones marqués VIP et nNOS à 48h et à 4 semaines post lésion sur des coupes histologiques (figure 23), dans tous les segments depuis l'estomac jusqu'à l'iléon.

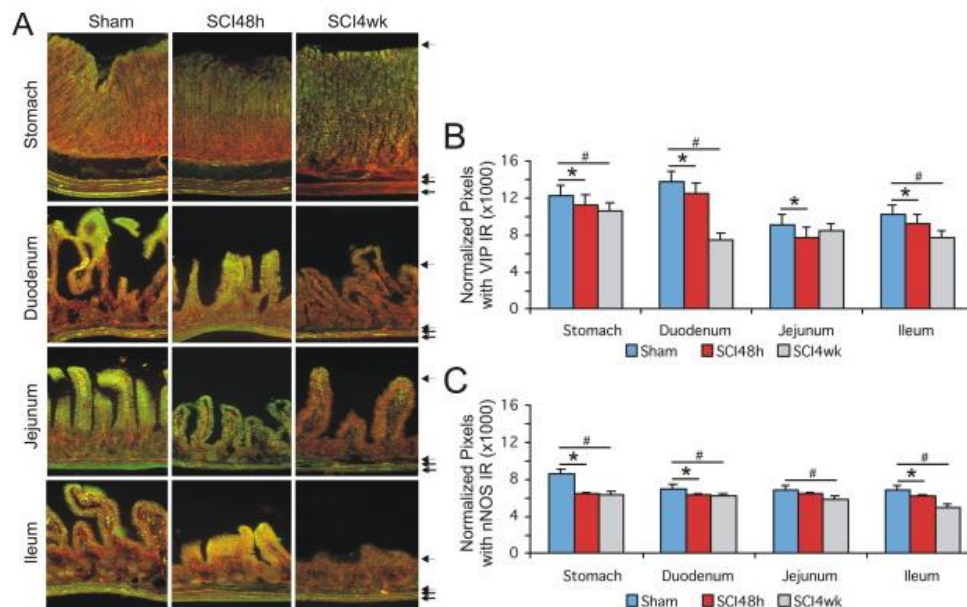


Figure 23 d'après(134) : diminution VIP et nNOS à 48h et 4 semaines post lésion médullaire T10 chez le rat dans tous les segments, de l'estomac à l'iléon.

Une autre étude(130) aurait trouvé de façon concordante que l'expression de la substance P et du VIP étaient diminuée dans le côlon de rats spinalisés (pas d'accès à la revue).

3) concernant les composantes des différents neurotransmetteurs, le potentiel de membrane au repos des cellules de muscle lisse non traitées (*ex vivo*) ne se modifiait pas chez des rats spinalisés en T3(133) ; par contre après différents traitements, ils mettaient en évidence que la composante nitrergique de la transmission neuromusculaire (inhibitrice) était diminuée, la composante purinergique de la transmission neuromusculaire (inhibitrice) restait similaire, et que la composante cholinergique de la transmission neuromusculaire (excitatrice) était également diminuée après lésion médullaire, à 3 jours et à 3 semaines post-lésion.

4.1.3 L'inflammation

Il n'y a que très peu d'études qui ont recherché spécifiquement des modifications au niveau de l'expression des marqueurs inflammatoires du côlon. Une des études précédemment citées (124) a montré que l'expression des marqueurs d'inflammation (Icam1, Ccl2, Ccl3) dans le côlon augmentait pendant la première semaine de lésion, puis diminuait à 3 semaines post lésion, suggérant à nouveau une évolution au cours du temps.

Dans l'intestin grêle, quelques études(135,136) montrent de façon concordante une inflammation digestive (expression des marqueurs d'inflammation Icam1, IL-12, TNF α) en période aigüe ou subaigüe post-lésion médullaire avec ensuite une atténuation du phénomène au cours du temps. (Figures 23 et 24)

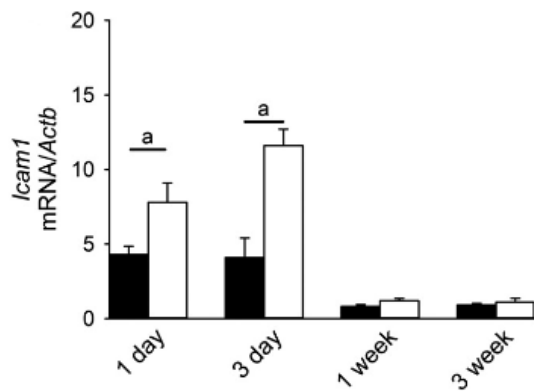


Figure 24 d'après (135) : l'inflammation duodénale (expression de Icam1 dans la paroi duodénale) augmente de façon aigüe puis diminue progressivement.

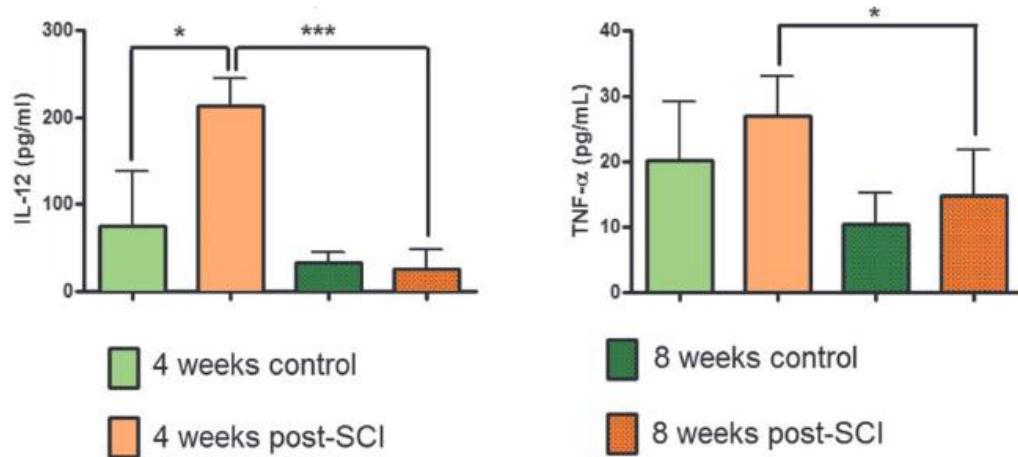


Figure 25 d'après(136) : dans l'intestin grêle, les cytokines de l'inflammation IL-12 et TNF α sont augmentées à 4 semaines post lésion médullaire puis diminuent à 8 semaines.

Les autres études ont surtout fait le lien entre inflammation et dysbiose colique, par exemple en montrant que les patients blessés médullaires étaient porteurs de dysbiose avec augmentation du pool de bactéries potentiellement pro-inflammatoires et pathogènes(137), ou que des similitudes de profil microbiotique (138) pouvaient être mis en évidence entre patients blessés médullaires et patients atteints de maladies inflammatoires digestives, seulement à la phase aigüe.

D'autres études sur le profil inflammatoire du microbiote après lésion médullaire vont globalement dans le même sens (139,140) en ce qui concerne l'évolution dans le temps.

Ce qui semble donc être une constante concernant l'atteinte du SNE après lésion médullaire, est qu'il y aurait bien des modifications du compartiment neuro-musculaire, de la neurotransmission entérique, de l'inflammation après lésion médullaire, avec potentiellement une régionalisation de l'atteinte entre côlon proximal et distal, ainsi qu'une évolutivité des troubles observés au cours du temps.

4.2 Modifications de la barrière épithéliale intestinale

Les études sont encore moins nombreuses concernant les modifications des fonctions de barrière épithéliale après lésion médullaire.

Sur le plan architectural, il existe des modifications au niveau de la muqueuse gastro-intestinale, jusqu'à l'iléon (134) (figure 26), mais je n'ai pas retrouvé d'étude montrant une atrophie muqueuse colique après lésion médullaire.

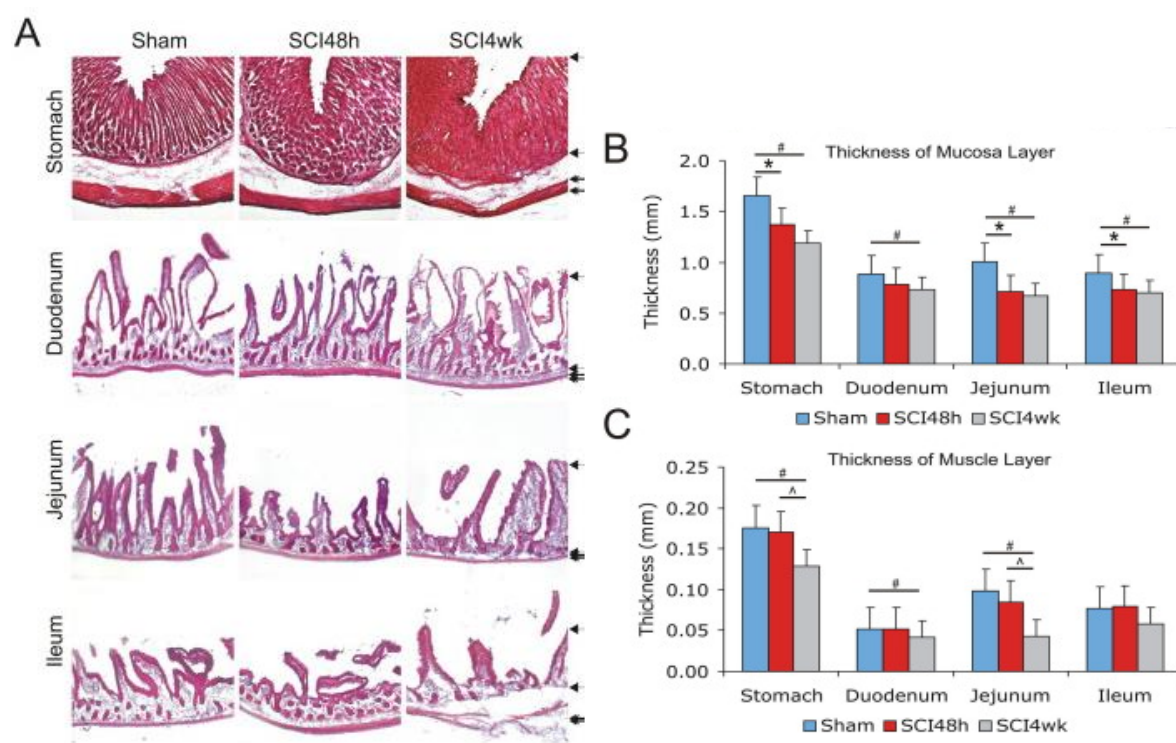


Figure 26 d'après (134) : à 48h et 4 semaines post lésion T10, atrophie muqueuse (B) et musculaire (C) visible sur coupes d'estomac, duodenum, jejunum et iléon (A).

Sur le plan de la perméabilité intestinale, quelques études (141–143) (Liu X (2020 et 2021) et Liu J 2004) se sont intéressées aux modifications du jéjunum après lésion médullaire T10 dans un modèle de rat, d'un point de vue de la perméabilité (augmentée), la translocation bactérienne (augmentée) (figure 27), et l'expression des molécules de jonctions (diminuée) (figure 28). Leur but était de montrer un effet positif de l'oxygénothérapie hyperbare sur ces paramètres après lésion médullaire.

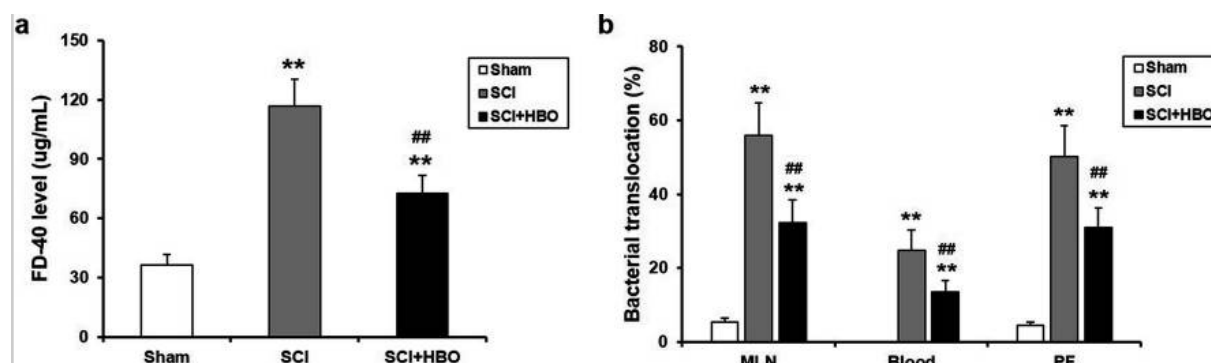


Figure 27 d'après (142) : la lésion médullaire induit une perméabilité jéjunale plus importante (a) et une translocation bactérienne plus importante (b) chez les rats spinalisés. L'oxygénothérapie hyperbare (HBO) améliore ces paramètres.

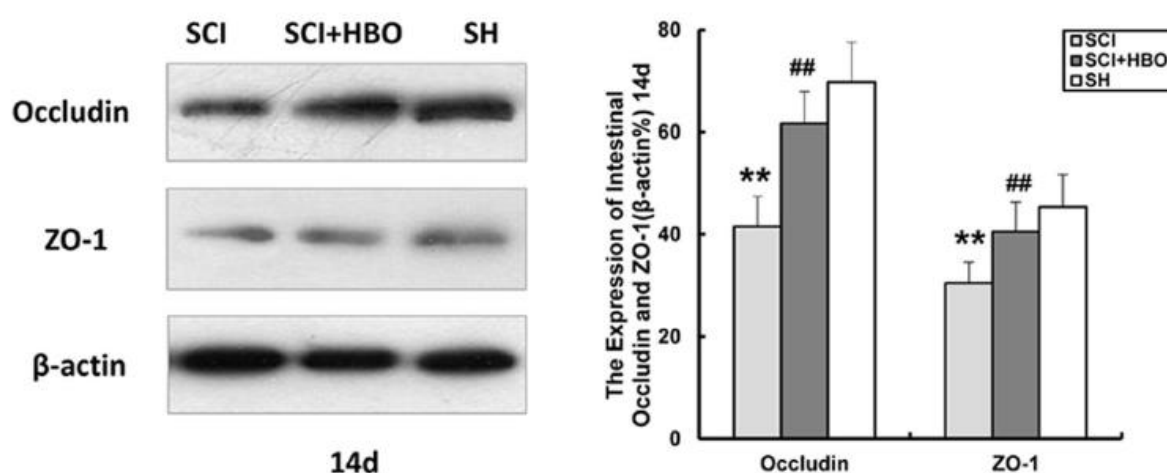


Figure 28 d'après (141) : l'expression des protéines de jonction Occludin, ZO-1 est diminuée dans le jéjunum 14 jours après lésion médullaire T10 dans un modèle de rat. L'oxygénothérapie hyperbare améliore cette expression.

Trois études (130,144,145) auxquelles je n'ai pas accès totalement, auraient montré que la lésion médullaire entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale (sur quel segment étudié ?) car elle induirait des dommages muqueux, détruirait certaines jonctions serrées de l'épithélium, augmenterait la translocation bactérienne et le taux d'endotoxine dans le sang.

Sur les fonctions entéroendocrines de la BEI, je n'ai pas trouvé d'étude s'intéressant spécifiquement au système entéroendocrine après lésion médullaire. Le système entéroendocrine et son rôle notamment dans la régulation de la motricité, de la fonction barrière et son interaction avec le système immunitaire en fait pourtant une piste physiopathologique intéressante.

PARTIE 3 Travaux de recherche

1 Hypothèses et objectifs de recherche

Au total, les patients blessés médullaires présentent des troubles digestifs très pourvoyeurs de morbi-mortalité et qui impactent largement leur qualité de vie. La prise en charge thérapeutique de ces troubles digestifs reste à améliorer et il s'agit d'un enjeu majeur sur le plan clinique et thérapeutique des blessés médullaires. Cette impasse thérapeutique dans laquelle le clinicien se trouve régulièrement concernant les troubles du transit du blessé médullaire, est une conséquence de la méconnaissance du mécanisme exact de l'atteinte colique, de sa physiopathologie et de son évolution au cours du temps, en particulier la méconnaissance des acteurs responsables des troubles.

Après analyse de la littérature, les hypothèses que nous pouvons formuler sont d'une part, que les segments digestifs les plus dysfonctionnels semblent être le colon et le rectum ; et d'autre part que le SNE, de par son rôle-clé dans la régulation des fonctions digestives et en particulier de la fonction motrice, est probablement le siège d'un remodelage dont la nature n'est pas encore identifiée. Chez l'animal, des études ont montré qu'il existerait une différence de sensibilité à l'acétylcholine entre le colon proximal et le colon distal. Il existerait une diminution de VIP et NOS, au moins dans l'intestin grêle. Nous manquons en revanche d'information sur le colon, sur le taux d'acétylcholine ou le nombre de neurones cholinergiques. Il n'existe que peu d'information sur modèle animal de souris spinalisée. Chez l'Homme, une seule étude a porté sur les modifications du système nerveux entérique après lésion médullaire, montrant une perte de neurones entériques mais sans information sur le phénotype neuronal entérique. Enfin, aucune étude n'a été faite sur la composante endéroendocrine et les voies sérotoninergiques que ce soit dans un modèle animal ou humain.

C'est donc dans ce contexte général que s'est inscrit ce travail de thèse qui est organisé en 2 parties principales :

- 1) Caractériser le remodelage du SNE, de la BEI et des fonctions digestives afin d'identifier de nouveaux mécanismes physiopathologiques

→ Dans des études précliniques, dans un modèle de rat (Article 1) ; et dans un modèle de souris (données préliminaires)

→ Dans une étude translationnelle chez l'Homme blessé médullaire (Article 2)

2) Valider l'efficacité thérapeutique de la caecostomie endoscopique dans une étude randomisée contrôlée (Article 3), avec un premier objectif d'amélioration de la qualité de vie du patient blessé médullaire. Dans un second temps, l'utilisation de ce dispositif pourrait nous permettre d'administrer directement dans le côlon les substances d'intérêt visant à restituer la fonction colique, dont nous avons montré les altérations dans la première partie.

Caractérisation du remodelage du SNE, de la BEI et des fonctions digestives afin d'identifier de nouveaux mécanismes physiopathologiques.

2 Article 1 - étude fondamentale

Le premier article présenté dans ce manuscrit est une étude fondamentale, sur modèle de rat spinalisé, publiée dans Neurotrauma Reports en décembre 2020. Cette étude nous a permis d'initier l'identification du remodelage du SNE après une lésion médullaire en T8 chez le rat, en mettant en évidence les diminutions sur les neurotransmetteurs excitateurs du SNE du type ACh, en plus d'une moins bonne réponse à ces médiateurs dans des expériences *ex vivo*. Elle a permis ensuite de poursuivre nos recherches sur le modèle murin de souris spinalisée que nous avons ensuite mis en place dans l'unité TENS (cf 2).

La version publiée est directement insérée ci-après.

Enteric Nervous System Remodeling in a Rat Model of Spinal Cord Injury: A Pilot Study

Chloë Lefèvre,^{1,2} Anne Bessard,¹ Philippe Aubert,¹ Charles Joussain,³ François Giuliano,³ Delphine Behr-Roussel,⁴ Marie-Aimée Perrouin-Verbe,^{1,5} Brigitte Perrouin-Verbe,^{1,2} Charlène Brochard,^{1,6} and Michel Neunlist^{1,*}

Abstract

The physiopathology of digestive disorders in patients with spinal cord injury (SCI) remains largely unknown, particularly the involvement of the enteric nervous system (ENS). We aimed in a rat model of chronic thoracic SCI to characterize (1) changes in the neurochemical coding of enteric neurons and their putative consequences upon neuromuscular response, and (2) the inflammatory response of the colon. *Ex vivo* motility of proximal and distal colon segments of SCI and control (CT) rats were studied in an organ chamber in response to electrical field stimulation (EFS) and bethanechol. Immunohistochemical analysis of proximal and distal segments was performed using antibodies against Hu, neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and choline acetyltransferase. Colonic content of acetylcholine and acetylcholinesterase was measured; messenger RNA (mRNA) expression of inflammatory cytokines was measured using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) approaches. Compared with the CT rats, the contractile response to bethanechol was significantly decreased in the proximal colon of SCI rats but not in the distal colon. The proportion of nNOS immunoreactive (IR) neurons was significantly reduced in the proximal but not distal colon of SCI rats. No change in proportion of choline acetyltransferase (ChAT)-IR was reported; the tissue concentration of acetylcholine was significantly decreased in the proximal colon of SCI rats. The expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was significantly reduced in the proximal and distal colon of SCI rats. This study demonstrates that functional motor and enteric neuroplastic changes affect preferentially the proximal colon compared with the distal colon. The underlying mechanisms and factors responsible for these changes remain to be discovered.

Keywords: digestive disorders; enteric neurons; neuromuscular response; spinal cord injury

Introduction

Spinal Cord Injury (SCI) causes multiple functional impairments. The severity and the extent of the deficiencies depend on several factors including the level of injury, the completeness of the injury, and whether or not it is flaccid or spastic.^{1–3} Bowel dysfunction, also known as neurogenic bowel, is one of the most

prevalent comorbidities associated with SCI.⁴ Symptoms of bowel dysfunction such as constipation, dyschezia, or fecal incontinence have a significant impact on the quality of life of the patient.⁵ In particular, more than one-third of patients with SCI consider digestive disorders to be a more significant disability than walking loss.⁶ Consistently, the recovery of digestive functions is

¹UMR Inserm 1235, Research Unit, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases (TENS), University of Nantes, Nantes, France.

²Neurological Physical and Rehabilitation Medicine Department, ³Urology Unit, University Hospital of Nantes, Nantes, France.

³UMR Inserm 1179, Research Unit, Neuromuscular Disability, Physiopathology, Biotherapy, and Applied Pharmacology (END-ICAP), ⁴Pelvipharm, University of Versailles-St-Quentin-en-Yvelines, Montigny-le Bretonneux, France.

⁶Digestive Physiology Unit, University Hospital of Rennes, Rennes, France.

*Address correspondence to: Michel Neunlist, PhD, Inserm U1235, Faculté de Médecine, 4^{ème} étage, 1 Boulevard Gaston Veil, 44000 Nantes, France, E-mail: michel.neunlist@univ-nantes.fr



one of the most frequent wishes among patients with SCI.^{5,7–11} In contrast to well-established treatments for urological disorders, efficient treatments for bowel dysfunction are still lacking for patients with SCI. Such lack of results is due in large part to the still largely unknown pathophysiological basis responsible for GI dysfunction in patients with SCI.

Several mechanisms have been proposed to explain digestive disorders in patients with SCI. In physiological conditions, bowel function is the result of coordinated actions between the sympathetic, parasympathetic, and enteric nervous systems (ENS). In particular, the colon receives sympathetic innervation from the hypogastric nerve (spinal level T10–L2) and parasympathetic innervation from the pelvic nerve (spinal level S2–4). Damage of the supraspinal regulation of somatic and autonomic circuitry of the spinal cord was long thought to explain bowel dysfunction in patients with SCI.^{2,3,12} However, the involvement of the ENS in these dysfunctions has been largely overlooked. Indeed, the ENS is an integrative neuronal network comprising more than 100 million neurons and 400 million enteric glial cells, which are distributed along the digestive tract and organized into two major ganglionated plexi—the myenteric plexus (or Auerbach's plexus) and the submucosal plexus (or Meissner's plexus).¹³ Neurons of the myenteric plexus control the motor activity of the gut, such as propulsive movement of colonic contents, even independently of the central nervous system.

As human studies aimed at characterizing ENS in patients with SCI are difficult to design for evident ethical reasons, recent scarce studies have characterized changes in the ENS in animal models of SCI and their impact on gut functions. In particular, preliminary studies have shown alterations of the ENS and bowel function after SCI, such as alteration of gastric emptying and decrease in marked nNOS neurons in the small intestine,¹⁴ alteration of acetylcholine-mediated contractile response after acute injury,¹⁵ decrease in the number of enteric neurons, and alterations of colonic motility *in vivo* after chronic high T3 injury.¹⁶ However, to our knowledge, no study has currently characterized the ENS remodeling in the colon and its impact upon neuromuscular transmission in a model of chronic or semi-chronic low thoracic lesion (T8–12). However, this model allows direct lesion of the thoracolumbal sympathetic center and is relevant for the analysis of long-term modification in the ENS and its functional impact as these lesions are the most frequent in patients with SCI.^{17,18}

Therefore, we used a rat model of chronic thoracic SCI to (1) characterize ENS remodeling in the proximal as well as distal colon, (2) determine its *ex vivo* consequences upon neuromuscular contractile response, and (3) characterize the inflammatory response of the colon.

Methods

Animals

Female Sprague-Dawley rats (Janvier Laboratories, Le Genest Saint Isle, France), 9 weeks of age and weighting 280 g were housed for 6–7 days in their definitive animal facility, in a controlled environment with free access to food and water before experiments. The experiments were carried out in strict accordance with the European Communities Council Directives 2010/63/UE on the use of laboratory animal and care regulation in force in France (Ministry of Agriculture, Authorization Agreement No. A78-322-3, December 2013 and B78-423-1, July 2017) on a total of nine control (CT) rats and nine spinalized rats, 21 days after they had undergone a T8–9 spinal cord transection.

Spinalization

The rats were spinalized as described¹⁹ by the Pelvipharm company and the Inserm research unit U1179 (Neuromuscular Disability: Physiopathology, Biotherapy, and Applied Pharmacology [END-ICAP]; Faculty of Medicine of the University of Versailles-St-Quentin-en-Yvelines, Montigny-Le-Bretonneux, France). Rats were anesthetized with isoflurane (1.2%; Centravet SA, Plancoët, France) and body temperature was maintained at 37°C using a heating pad. A laminectomy was then performed to expose the spinal cord and a segment (T9) was transected with fine scissors under local anesthesia (0.2 mL lidocaine; Centravet SA). A sterile gelform sponge (Gelita-Spon, Gelita Medical BV, Amsterdam, The Netherlands) was inserted between cut ends of the spinal cord to ensure completeness of the section, then the overlying muscles and skin were sutured. The bladder was manually emptied by Credé's maneuver 3 times a day until the rat recovered efficient micturition reflex. Antibiotic prophylaxis consisted of: (1) cefovecin (20 mg/kg; Centravet SA) subcutaneous injection after spinal cord section, (2) oral enrofloxacin (20 mg/kg/day; Centravet SA) during the first and third week post-section, and (3) oral sulfamethoxazole/trimethoprim (50/10 mg/kg/day; Centravet SA) during the second week post-section.



Twenty-one days after spinal cord transection, animals were anesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation. The colon was immediately placed in cold oxygenated (5% CO₂ and 95% O₂) Krebs solution containing (in mM) 117.0 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 25.0 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, and 11.0 glucose.

Evaluation of colonic motility during ENS stimulation

The samples placed in cold oxygenated Krebs solution were transferred to the laboratory (Inserm research unit U1235, TENS, University of Nantes, Nantes, France). Segments of distal and proximal colon were placed in the longitudinal direction in an organ chamber (Radnoti, California, USA) with 15 mL of Krebs solution at 37°C, continuously bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. The contractile response of colonic segments was continuously recorded using isometric force transducers (No. TRI202PAD, Panlab, Cornellà, Spain) coupled to a computer equipped with the PowerLab 8/30 System and Labchart data analysis software (AD Instruments, Spechbach, Germany). Segments were stretched with a pre-load of 1 gram, which was maintained during an equilibration period of 60 min.

Then, the segments were subjected to electrical field stimulation (EFS) using an STG 4008 MCS electrical stimulator (Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany) to stimulate the ENS. EFS parameters were as follows: train duration, 10 sec; pulse frequency, 20 Hz; pulse duration, 400 μ sec; and pulse amplitude, 11 V. This procedure was repeated 3 times spaced for 10 min.

Then, 15 μ L of the following drugs were added in the baths and after a 30-min incubation period the same EFS stimulation protocol was repeated: (1) nitric oxide synthase synthase (NOS) inhibitor, *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 50 mM, Sigma); and (2) atropine (10⁻⁶ M, Sigma), an antagonist of cholinergic muscarinic receptors. Contractile activity was evaluated by measuring the area under the curve (AUC). Spontaneous contractile activity was evaluated by measuring AUC during 2 min before the first EFS. The EFS-induced response was evaluated by measuring the AUC during the EFS period (EFS 10 sec) and the AUC 1 min after stimulation (EFS 60 sec), in basal, L-NAME, and L-NAME+atropine conditions. For each segment, the nitrenergic component of the response to EFS (10 sec or 60 sec) was calculated by the formula: (AUC EFS L-NAME – AUC EFS control)/AUC EFS control and

was named L-NAME sensitive AUC. For each segment, the cholinergic component of the EFS response (10 sec or 60 sec) was calculated by the formula: (AUC EFS L-NAME+atropine – AUC EFS L-NAME)/AUC EFS L-NAME and was named Atropine-sensitive AUC.

Concentration-response effects of bethanechol were analyzed by performing a Friedman test followed by a Dunn test. Concentrations for which bethanechol significantly modified the contractility of the tissue compared with the control situation are indicated by # (CT group) or Φ (SCI group). The effects of spinalization were statistically compared with their respective CT groups by performing a two-way analysis of variance (ANOVA) repeated measure; when the difference was significant between the groups, a Bonferroni test was performed to identify the concentrations at which the effects were significantly different (indicated by *). Data were normalized to tissue weight. A value of $p \leq 0.05$ was considered significant.

Immunofluorescence staining

Samples of proximal colon (1 cm adjacent to the cecum) and distal colon (1 cm, directly above the segment used in motility studies) were fixed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (PFA) for 3 h at room temperature. The circular muscle and the mucosa were removed under a dissection microscope to expose the myenteric plexus. The myenteric plexus was then permeabilized for 3 h at room temperature with PBS, 0.1% sodium azide, 4% horse serum, and 0.5% Triton X-100. Tissue was then incubated with the following primary antibodies for 24 h: goat anti-choline acetyltransferase (ChAT; 1:200; Millipore, Billerica, MA, USA), rabbit anti-neuronal NOS (nNOS; 1:1000; Alexis Laboratories, San Diego, CA, USA), and mouse anti-HuC/HuD (1:200, Invitrogen). The preparation was then washed with PBS and incubated for 3 h with the appropriate secondary antibodies: anti-goat Cy3 (carboxymethylindocyanine; 1:500; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK), anti-rabbit Cy5 (7-amino-4-indodicarbocyanin; 1:500, Jackson ImmunoResearch), and anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC; 1:500; Jackson ImmunoResearch). After washes with PBS, specimens were viewed and pictures were acquired with a fluorescent microscope (AxioZoom.V16; Zeiss, Marly le Roi, France) associated with Zen 2012 software (Zeiss) and fitted with adequate filter cubes. Finally, pictures were analyzed with Image J software.



Myenteric ganglion and neurochemical phenotype analysis

Myenteric ganglia were defined under the microscope as entities containing Hu-IR cells separated by a gap clearly distinguishable (about the size of one neuron or even smaller). Structures not clearly identified as ganglia were not analyzed. The numbers of Hu-, ChAT- and nNOS-immunoreactive (IR) myenteric neurons were counted (at least 20 ganglia per condition). To determine the neurochemical phenotype, data were expressed as the number of myenteric neurons per ganglion and as a percentage of ChAT-IR or nNOS-IR neurons normalized to the total number of Hu-IR neurons per ganglion.

Acetylcholine and acetylcholinesterase assay

Samples of distal colon placed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Millipore) and frozen at -80°C were used. Those whole-mount samples were lysed using a Precellys 24-tissue homogenizer (Bertin Technologies, France) and sonication followed using a Vibracell 75186 device (Sonics, Newton, CT, USA). Total protein was quantified using a Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (ThermoFisher, USA). Acetylcholine concentration was then determined in tissue homogenates, prepared and diluted at $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (protein), with an Amplex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (Invitrogen).

Quantitative PCR analysis

The samples of colonic tissues placed in RA1 buffer were used. Total RNA were extracted from these samples using a NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France, Cat.# 740966) according to the manufacturer's instructions. Once μg purified, messenger RNA (mRNA) was denatured and processed for reverse transcription using Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France, Cat.#18080044). PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR Green Fluorescein Kit (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France, Cat.# AB4166B) and run on a StepOnePlus system (Life Technologies, Cat.# 4376600). The following primers were used:

- TNF- α # NM_012675.3, forward: 5'-GAGGAG AAGTTCCCAAATGGGCT-3'; reverse: 5'-TTGG TGGTTTGCTACAGACGTG-3'
- interleukin (IL)-1 β # NM_031512.2, forward: 5'-CAGCTTTCGACAGTGAGGAGA -3'; reverse: 5'-TTGTCGAGATGCTGCTGTGA-3'

- IL-7 # NM_013110.2, forward: 5'-CTGGATGCC TCCTGGTCAAA-3'; reverse: 5'-TGCAGATGA CAG GGTGCTT-3'
- IL-10 # NM_012854.2, forward: 5'-TGCGACGCT GTCATCGATTT-3'; reverse: 5'-GTAGATGCC GGGTGGTTCAA -3'
- IFN γ # NM_138880.2, forward: 5'-GCAAAAGG ACGGTAACACGA -3'; reverse: 5'-TTGTTTCC CTTGAACTTGGC-3'
- intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 # NM_012967.1, forward: 5'-CGGACTTTCGATCTTC CGACTA-3'; reverse: 5'-TTTGTGCTCTCCAG GGTCAG-3'

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism V6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Data were expressed in medians (extremes). Comparisons between CT and SCI rats were performed using non-parametric Mann-Whitney test or ANOVA. A value of $p \leq 0.05$ was considered significant.

Results

SCI and CT rats were comparable for age and weight. No deaths occurred during surgery or follow-up.

Impact of spinal cord injury on neuromuscular transmission

In this part of the study we aimed to study *ex vivo* the induced contractile response during ENS stimulation and to identify the neuromediators potentially involved.

EFS-induced contractile response were sequentially analyzed in basal condition and after addition of L-NAME and atropine to determine the contribution of nitrergic and cholinergic components, respectively, in EFS-induced response (Fig. 1A). Under basal condition and with drugs, the area under the curve (AUC) of the response induced during EFS was comparable between SCI and CT rats in proximal (basal: $p=0.30$; L-NAME: $p=0.30$; L-NAME+atropine: $p=0.41$) and distal colon (basal: $p=0.41$; L-NAME: $p=0.66$; L-NAME+atropine: $p=0.80$) (Fig. 1B). The AUC of post-EFS responses (i.e., 60 sec post-EFS) were also comparable between the two groups, in proximal and distal colon segments in basal condition (distal colon: $p=0.80$; proximal colon: $p=0.15$) and after addition of L-NAME (distal colon: $p=0.53$; proximal colon: $p=0.41$). In distal colon, post-EFS response was similar between the two groups in L-NAME+atropine condition ($p=0.41$).



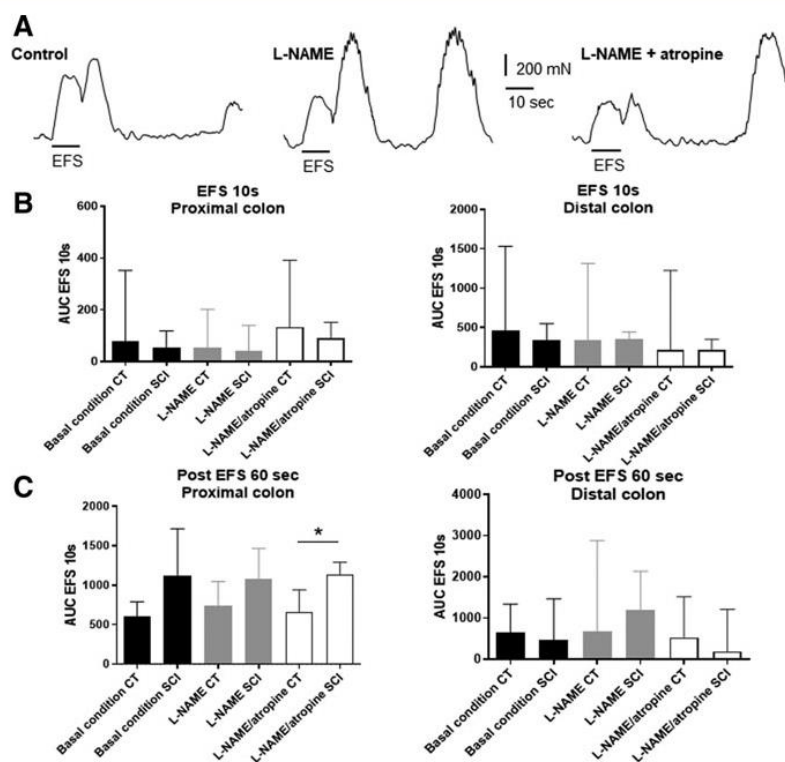


FIG. 1. Impact of spinal cord injury (SCI) on neuromuscular transmission assessed *ex vivo*. Proximal and distal colonic longitudinal muscle segments were stimulated by electrical field stimulation (EFS). The area under the curve (AUC) of EFS-induced contractile response was analyzed in absence or in presence of *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or atropine (examples, **A**). In basal condition and with drugs, the EFS 10 sec-response was comparable between SCI and control (CT) rats in proximal (basal $p=0.30$; L-NAME $p=0.30$; L-NAME+atropine $p=0.41$) and distal colon (basal $p=0.41$; L-NAME $p=0.66$; L-NAME+atropine $p=0.80$) (**B**). Post-EFS responses (60 sec post-stimulation) were comparable between the two groups, in proximal and distal colon segments in basal condition ($p=0.80$ distal colon; $p=0.15$ proximal colon) and after addition of L-NAME ($p=0.53$ distal colon; $p=0.41$ proximal colon). In distal colon only, EFS 60 sec was similar between the two groups in L-NAME+atropine condition ($p=0.41$). However, in the proximal colon, EFS 60 sec was lower in the SCI group ($p=0.03$) in L-NAME+atropine condition (**C**).

However, in the proximal colon, post-EFS response was lower in the SCI group in L-NAME+atropine condition (Fig. 1C) ($p=0.03$).

In the proximal colon, the amplitude of L-NAME-sensitive AUC was comparable between the two groups ($p=0.41$) (Fig. 2A) and the amplitude of the atropine-sensitive AUC tended to be decreased ($p=0.09$) in SCI rats compared with CT (Fig. 2B). In the distal colon of SCI rats, the amplitude of L-NAME sensitive AUC (Fig. 2C) and atropine-

sensitive AUC (Fig. 2D) were similar compared with CT ($p=0.67$ and $p=0.53$, respectively).

Impact of SCI on neurochemical phenotype of myenteric neurons

In this part of the study we aimed to determine whether SCI induced changes in the neurochemical phenotype of myenteric neurons in proximal and distal colon (Fig. 3).



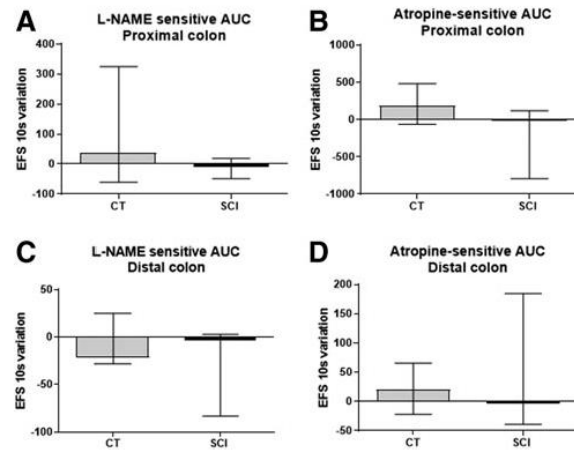


FIG. 2. Impact of spinal cord injury (SCI) on neuromuscular transmission assessed *ex vivo*. Proximal and distal colonic longitudinal muscle segments were stimulated by electrical field stimulation (EFS). The area under the curve (AUC) of EFS-induced contractile response was analyzed in absence or in presence of *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or atropine. The amplitude of L-NAME-sensitive AUC was similar in the SCI group compared with control (CT) rats in proximal (**A**) ($p=0.41$) and distal colon (**C**) ($p=0.66$). The amplitude of the atropine-sensitive AUC tended to be decreased only in the proximal colon in the SCI group (**B**) ($p=0.09$) but not in the distal colon (**D**) ($p=0.53$).

First, using the general neuronal marker HU, we showed that the number of myenteric neurons per ganglion was comparable in the proximal colon between SCI animals (Fig. 3B) and CT (Fig. 3A) (44.5 ± 7.5 vs. 44.4 ± 13.2 Hu-IR neurons/ganglion, respectively; $p=0.84$) (Fig. 3G). The number of myenteric neurons per ganglion was also comparable in the distal colon between SCI animals and CT (44.9 ± 4.7 vs. 42.9 ± 8.4 Hu-IR neurons/ganglion, respectively; $p=0.84$) (Fig. 3H).

Next, we determined the proportion of ChAT-IR and nNOS-IR neurons in the myenteric plexus of SCI and CT animals. In the proximal colon, the proportion of ChAT/Hu myenteric neurons per ganglion tended to be increased in SCI (Fig. 3D) compared with CT (Fig. 3C) (52.1% and 49.0%, respectively; $p=0.09$) (Fig. 3I). The proportion of nNOS/Hu neurons was significantly reduced in SCI animals (Fig. 3F) compared with CT (Fig. 3E) (25.8% and 32.1%, respectively; $p=0.03$) (Fig. 3K).

In the distal colon, the proportion of ChAT/Hu myenteric neurons per ganglion was comparable between SCI and CT (53.3% and 53.8%, respectively; $p=0.99$) (Fig. 3J). In addition, the proportion of nNOS/Hu neu-

rons was also comparable between SCI animals and CT (28.1% and 29.8%, respectively; $p=0.55$) (Fig. 3L).

Impact of SCI on the colonic concentration of acetylcholine

Although the proportion of ChAT/Hu myenteric neurons per ganglion was comparable between the SCI and CT animals, we aimed to determine whether acetylcholine levels in proximal and distal colon were affected or not by SCI. Using an acetylcholine/acetylcholinesterase assay, we measured in the proximal and distal colon of SCI rats, a significantly lower acetylcholine concentration than in CT rats ($p=0.008$ for both) (Fig. 4A,B). In addition, the acetylcholinesterase activity was lower in SCI in the distal colon ($p=0.001$) (Fig. 4D) and tended to be lower in the proximal colon ($p=0.06$) (Fig. 4C) compared with CT.

Impact of the spinal cord injury on the colonic muscle response

Finally, we aimed to determine whether the sensitivity of the muscle response to muscarinic receptor agonist was altered in SCI compared with CT. We stimulated *ex vivo* the digestive tract segments with



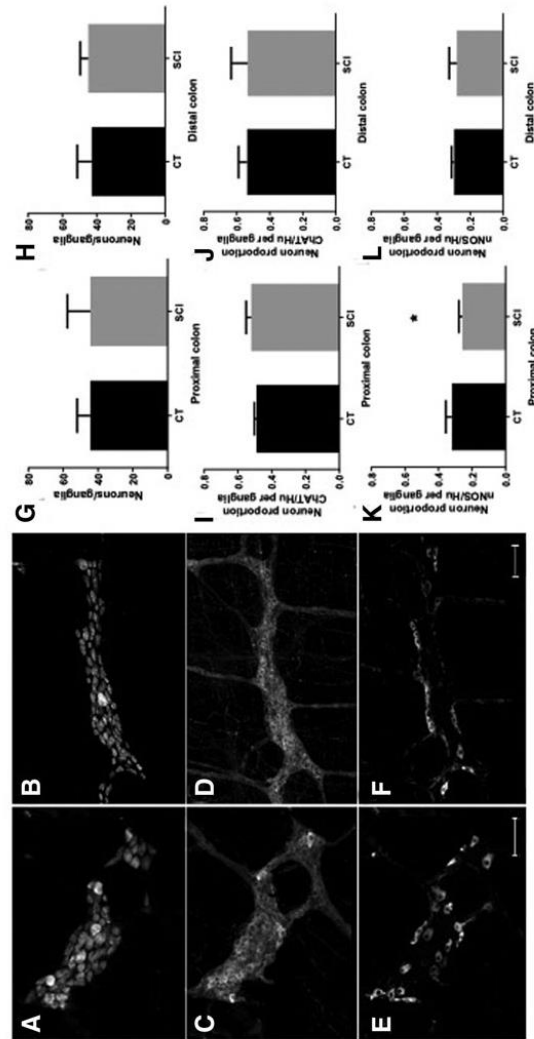


FIG. 3. Impact of spinal cord injury (SCI) on neurochemical coding of myenteric neurons in the proximal and distal colon. Triple immunohistochemical staining of whole-mount preparations of myenteric plexus and longitudinal muscle layer using antibodies against Hu (A,B), choline acetyltransferase (ChAT; C,D) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS; E,F) in the proximal colon. SCI (B and C) did not modify the number of neurons per ganglia as compared with controls (CT) (sham enemas) in the proximal and distal colon (G and H, respectively). SCI did not change the proportion of ChAT-immunoreactive (IR) neurons per ganglia compared with CT in the proximal and distal colon (D and F). Finally, SCI reduced the proportion of nNOS-IR neurons per ganglia in the proximal and distal colon compared with CT (G and I); (* $p < 0.05$) (scale bar = 100 μm).

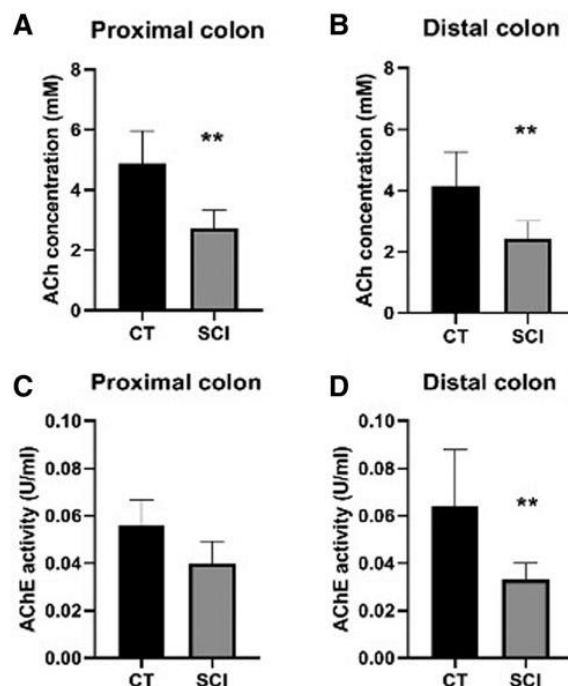


FIG. 4. Impact of spinal cord injury (SCI) upon acetylcholine (ACh) concentration and acetylcholinesterase (AChE) activity on the proximal and distal colon. Concentration of ACh was significantly reduced in both the proximal (**A**) and distal (**B**) colon compared with control (CT) ($p=0.0008$ for both). In addition, AChE activity was decreased in the distal colon (**C**) compared with CT ($p=0.0001$).

increasing doses of bethanechol in the proximal and distal colon (Fig. 5A,B).

In the proximal colon, bethanechol induced a significant increase in the contractile response for the concentrations of 10^{-4} and 10^{-3} M compared with CT (i.e., absence of bethanechol; Friedman test: $p<0.001$), in CT (Dunn test, $p<0.05$ #) but not in SCI rats. In addition, the AUC at bethanechol 10^{-4} and 10^{-3} M concentrations was lower in the SCI rats compared with the CT rats (two-way ANOVA repeated measure [RM], $p<0.0001$, Bonferroni test, $p<0.05^*$) (Fig. 5C).

In the distal colon, bethanechol induced a significant increase in the contractile response for the concentrations of 10^{-3} and 10^{-2} M compared with CT (i.e., absence of bethanechol) (Friedman test: $p<0.0001$) in CT (Dunn test, $p<0.05$ #) and in the SCI group (Dunn test, $p<0.05^*$). In addition, the AUC at bethanechol 10^{-4} and 10^{-3} M concentrations was similar in the SCI and CT rats (two-way ANOVA MR, $p>0.05$, Bonferroni's test, $p>0.05$) (Fig. 5D).

Impact of spinal cord injury on colonic inflammation

In the last part of the study, we aimed to determine whether changes in ENS and colonic motor responses were associated with changes in inflammatory cytokines in the different colonic segments.

In particular, we found that mRNA expression of TNF- α and ICAM-1 was significantly reduced in SCI rats compared with CT ($p=0.005$ and $p=0.002$, respectively) in the proximal colon (Fig. 6A). No changes in IL-1, IL-7, IL-10, or interferon gamma (IFN γ) occurred. In the distal colon, mRNA expression of TNF- α and ICAM-1, but also IL-1, was significantly lower in SCI rats compared with CT ($p=0.005$, $p=0.007$, and $p=0.007$, respectively), whereas no change in IL-7, IL-10, or IFN γ was measured (Fig. 6B).

Discussion

This study was designed to characterize the impact of SCI on the potential remodeling of the ENS and its



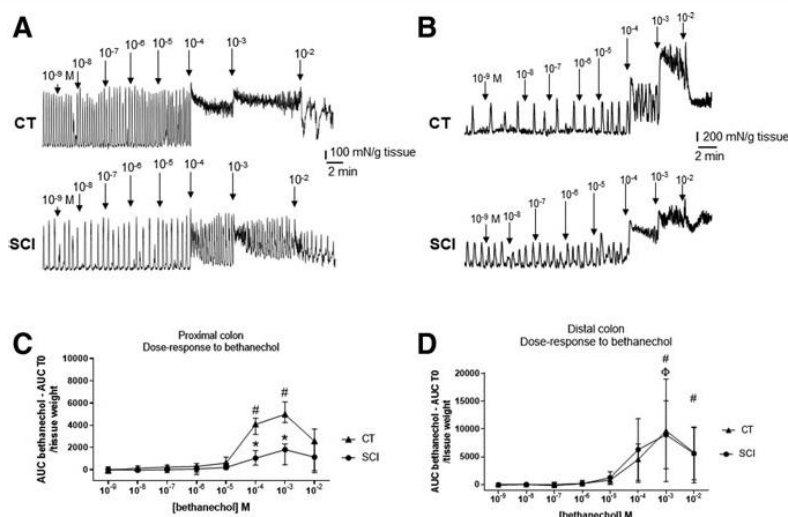


FIG. 5. Example of evolution of spontaneous contractions under increasing concentrations of bethanechol in proximal (A) and distal (B) colon, in the two groups, spinal cord injury (SCI) and control (CT). Evolution of the area under the curve (AUC) at the different concentrations of bethanechol, in the proximal colon of the two groups. AUC T0 = area under the initial curve, before drug application (# and Φ for response significantly different from the initial AUC and * for significantly different response between SCI and CT groups) (C). Evolution of the AUC at the different concentrations of bethanechol, in the distal colon of the two groups. AUC T0 = area under the initial curve, before drug application (# and Φ for response significantly different from the initial AUC and * for significantly different response between SCI and CT groups) (D). Example of dose-response to bethanechol in proximal colon of CT and SCI rats.

functional consequences on *ex vivo* colonic motor function in rats. Using a rat model of chronic thoracic SCI, we described a region-specific neurochemical remodeling of the ENS characterized by a significant decrease in the proportion of nitrergic neurons in the proximal but not distal colon compared with CT. Further, we also showed a significant reduction in the tissue acetylcholine concentration (but not in the proportion of ChAT neurons) in the proximal but not distal colon. In addition, *ex vivo*, we showed a statistical trend toward changes in contractile response induced by ENS activation affecting the proximal but not distal colon and characterized by a tendency to reduce its cholinergic but not nitrergic component. Finally, we showed that the sensitivity of the muscle to bethanechol was reduced in spinalized rats compared with CT. This work highlights a remodeling of the ENS and the muscle of the proximal colon versus distal colon that may contribute to the digestive disorders associated with SCI.

One of the main results of this study is the selective involvement (contractile response, phenotypic modification) of the proximal colon after spinalization compared with the distal colon. Our results are different from those of Joo and colleagues.²⁰ Indeed, they showed that the contractility was significantly higher in the proximal colon of the SCI rats than that in the proximal colon of the CT rats.

One possible hypothesis to explain these differences is that changes reported occurred after 1 week post-SCI, whereas changes reported in our model occurred after 4 weeks post-SCI. The mechanisms underlying the region-specific modification of the proximal versus distal colon after spinalization could be related to the anatomical properties of the innervation of the colon by the extrinsic nervous system. Indeed, in our model, rats were spinalized into T8, with a metameric spinal cord transection and upper motor neuron lesion (presence of all sublesional reflexes). This leaves intact the sacral parasympathetic center (from L6 to S1 in rats) and



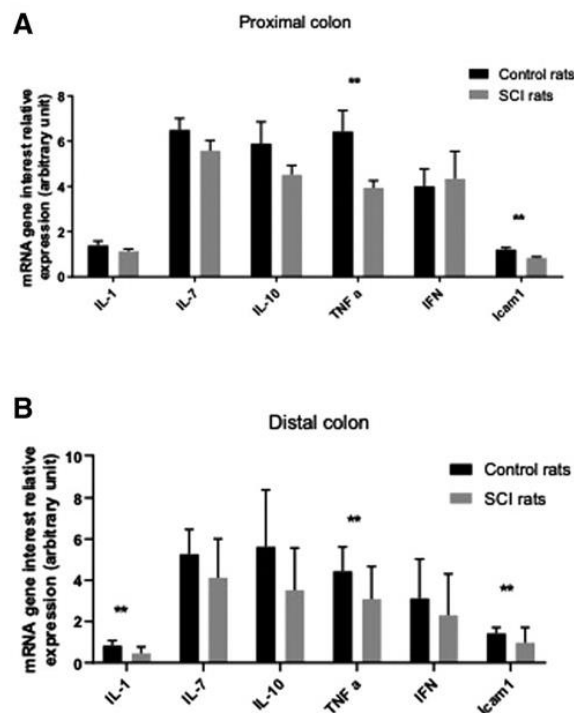


FIG. 6. Expression of interleukin (IL)-1, IL-7, IL-10, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon (IFN), and intercellular adhesion molecule (ICAM) messenger RNA (mRNA) in proximal (A) and distal colon (B).

its afferences toward the distal colon. The thoracolumbal sympathetic center is much closer to the lesion (in rats theoretically from T10 to L2, as in humans). Further, Ferrero and associates²¹ showed that spinalization of rats above T7 was a safer way to have a rapid recovery of bladder reflexes, that is, a lesion below this level would probably reach at least the thoracolumbal sympathetic center. Because the extrinsic sympathetic innervation comes from the thoracolumbal center in the proximal colon, it might explain that the proximal colon is more affected than the distal part of the colon.

A major finding of our study was the significant reduction in acetylcholine concentration in the proximal but not distal colon. Although no change in the proportion of cholinergic neurons was observed, one cannot exclude that a reduction in neuronal ChAT concentration (to a level still allowing detection by immunohistochemical methods) or a reduction in ChAT activity could occur. Conversely, besides neurons, ChAT expression has also been reported in other cell types such as epithelial and immune cells, and reduction in

tissue acetylcholine concentration could therefore reflect changes in these cells.²² Besides reduced acetylcholine expression in the proximal colon, we also observed a reduced sensitivity of the colonic muscle to the muscarinic agonist bethanechol. These modifications could also be due to altered expression of muscarinic receptors present on smooth muscle cells or downstream alterations of signaling pathways and effectors activated by these receptors.²³ Surprisingly, this significant decrease in tissue acetylcholine concentration and the decrease in muscle sensitivity to acetylcholine did not lead to change in EFS-induced contractile response in SCI animal compared with CT. This suggests that SCI induces a remodeling in the ENS of other excitatory mediators such as substance P. This putative remodeling could counteract the functional impairment in the cholinergic component following EFS.

Interestingly, the proportion of nitrergic neurons in the ENS is decreased after SCI. These results are in agreement with a previous study that also found a decrease in IR for nNOS at 48 h and 7 days of spinalization in the



stomach and small intestine,¹⁴ but no data on the colon were provided in the study. In our study, we reported no change in the nitrergic component of the EFS-induced contractile response. This could result from the fact that we studied neuromuscular transmission in the longitudinal muscle that has been shown to be mainly innervated by cholinergic neurons.¹³ *In vivo*, the changes could also contribute to digestive tract disorders in SCI, as various studies have shown that a decrease in the expression of nNOS slows intestinal transit.²⁴

Among factors explaining changes in the phenotype of the ENS-induced SCI, various hypotheses can be suggested. First, spinalization could result in a loss of innervation of enteric neurons by extrinsic fibers that could in turn impact upon modulation in enteric neuronal activity. The latter could contribute to changes in neurotransmitter expression of enteric neurons, as neuronal activity was shown to increase neurotransmitter gene expression in the ENS.²⁵ Other factors such as the intestinal microbiota may also be involved. Indeed, SCI has been shown to induce changes in microbiota composition and metabolites expression.²⁶ These changes in bacterial composition could be a consequence of changes in digestive function (induced by SCI). Conversely, microbiota and bacterial metabolites can modulate the phenotype of the ENS, in particular nitrergic and/or cholinergic neurons.^{27,28} In particular, it has been shown that expression of ChAT/acetylcholine is modulated by bacterial metabolites such as butyrate.²⁹

In conclusion, our study highlights that SCI leads to a remodeling of the ENS and functional consequences that may be consistent with clinical findings. The identification of these mechanisms may lead to improved management of digestive dysfunctions in SCI. Further, studies are needed to confirm these results in animals and then in humans.

Acknowledgments

Thanks to all in Team U1235 for their help and advice.

Authors' Contributions

Chloe Lefevre obtained funding, performed experiments and statistical analysis, and wrote a first draft of the article. Anne Bessard, Michel Neunlist, and Charlene Brochard reviewed the article. Philippe Aubert and Charles Joussain performed experiments. François Giuliano, Marie-Aimée Perrouin-Verbe, Brigitte Perrouin-Verbe, and Michel Neunlist supervised the work. Michel Neunlist, Brigitte Perrouin-Verbe, and Chloé Lefèvre designed the study.

Funding Information

Our research was supported by IRME (Institut de Recherche sur la Moelle et l'Encéphale) and GENULF (Groupe d'étude de Neuro-Urologie de Langue Française).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Brading, A.F., and Ramalingam, T. (2006). Mechanisms controlling normal defecation and the potential effects of spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 152, 345–358.
- Chung, E.A.L., and Emmanuel, A.V. (2006). Gastrointestinal symptoms related to autonomic dysfunction following spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 152, 317–333.
- Enck, P., Greving, I., Klosterhalfen, S., and Wietek, B. (2006). Upper and lower gastrointestinal motor and sensory dysfunction after human spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 152, 373–384.
- Coggrave, M., and Norton, C. (2013). Management of faecal incontinence and constipation in adults with central neurological diseases. *Cochrane Database Syst. Rev.* 18, CD002115.
- Burns, A.S., St-Germain, D., Connolly, M., Delparte, J.J., Guindon, A., and Hitzig, S.L. (2015). Phenomenological study of neurogenic bowel from the perspective of individuals living with spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 96, 49–55.
- Hanson, R.W., and Franklin, M.R. Sexual loss in relation to other functional losses for spinal cord injured males. (1976). *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 57, 291–293.
- Anderson, K.D. Targeting recovery: priorities of the spinal cord-injured population. (2004). *J. Neurotrauma* 21, 1371–1383.
- Bloemen-Vrencken, J.H.A., de Witte, L.P., and Post, M.W.M. Follow-up care for persons with spinal cord injury living in the community: a systematic review of interventions and their evaluation. (2005). *Spinal Cord* 43, 462–475.
- Snoek, G.J., IJzerman, M.J., Hermens, H.J., Maxwell, D., and Biering-Sorensen, F. Survey of the needs of patients with spinal cord injury: impact and priority for improvement in hand function in tetraplegics. (2004). *Spinal Cord* 42, 526–532.
- Ditunno, P.L., Patrick, M., Stineman, M., and Ditunno, J.F. Who wants to walk? Preferences for recovery after SCI: a longitudinal and cross-sectional study. (2008). *Spinal Cord* 46, 500–506.
- Simpson, L.A., Eng, J.J., Hsieh, J.T.C., Wolfe, D.L., and Spinal Cord Injury Rehabilitation Evidence Scire Research Team. The health and life priorities of individuals with spinal cord injury: a systematic review. (2012). *J. Neurotrauma* 29, 1548–1555.
- Holmes, G.M., Hudson, T.R., and Filart, R. (2017). Neurogastroenterology in spinal cord dysfunction, in: *Neurological Aspects of Spinal Cord Injury*. W. Weidner, R. Rupp, and K. Tansey (eds). Springer, pps. 397–437.
- Schemann, M., and Neunlist, M. The human enteric nervous system. (2004). *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 55–59.
- Kabatas, S., Yu, D., He, X.D., Thatté, H.S., Benedict, D., and Hepgul, K.T. (2008). Neural and anatomical abnormalities of the gastrointestinal system resulting from contusion spinal cord injury. *Neuroscience* 154, 1627–1638.
- Joo, M.C., Kim, Y.S., Choi, E.S., Oh, J.T., Park, H.J., and Lee, M.Y. (2011). Changes in the muscarinic receptors on the colonic smooth muscles of rats with spinal cord injury. *Ann. Rehabil. Med.* 35, 589–598.
- White, A.R., and Holmes, G.M. Anatomical and Functional Changes to the Colonic Neuromuscular Compartment after Experimental Spinal Cord Injury. (2018). *J. Neurotrauma* 35, 1079–1090.
- Liu, C.-W., Huang, C.-C., Chen, C.-H., Yang, Y.-H., Chen, T.-W., and Huang, M.-H. Prediction of severe neurogenic bowel dysfunction in persons with spinal cord injury. (2010). *Spinal Cord* 48, 554–559.
- Vallès, M., Vidal, J., Clavé, P., and Mearin, F. (2006). Bowel dysfunction in patients with motor complete spinal cord injury: clinical, neurological, and pathophysiological associations. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 2290–2299.
- Behr-Roussel, D., Oger, S., Caisey, S., Sandner, P., Bernabé, J., Alexandre, L., and Giuliano, F. (2011). Vardenafil decreases bladder afferent nerve activity in unanesthetized, decerebrate, spinal cord-injured rats. *Eur. Urol.* 59, 272–279.



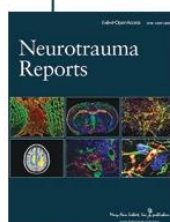
20. Joo, M.C., Kim, Y.S., Choi, E.S., Oh, J.T., Park, H.J., and Lee, M.Y. Changes in the muscarinic receptors on the colonic smooth muscles of rats with spinal cord injury. (2011). *Ann. Rehabil. Med.* 35, 589–598.
21. Ferrero, S.L., Brady, T.D., Dugan, V.P., Armstrong, J.E., Hubscher, C.H., and Johnson, R.D. Effects of lateral funiculus sparing, spinal lesion level, and gender on recovery of bladder voiding reflexes and hematuria in rats. (2015). *J. Neurotrauma* 32, 200–208.
22. Takahashi, K., Kitamura, N., Suzuki, Y., Yamanaka, Y., Shinohara, H., and Shibuya, I. (2015). Activation of muscarinic acetylcholine receptors elevates intracellular Ca^{2+} concentrations in accessory lobe neurons of the chick. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 201, 385–394.
23. Gerthoffer, W.T. (2005). Signal-transduction pathways that regulate visceral smooth muscle function. III. Coupling of muscarinic receptors to signaling kinases and effector proteins in gastrointestinal smooth muscles. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G849–G853.
24. Dickson, E.J., Heredia, D.J., McCann, C.J., Hennig, G.W., and Smith, T.K. (2010). The mechanisms underlying the generation of the colonic migrating motor complex in both wild-type and nNOS knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G222–G232.
25. Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., Thinard, R., Naveilhan, P., and Vanden Berghe, P. (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 1963–1975.
26. Gungor, B., Adiguzel, E., Gursel, I., Yilmaz, B., and Gursel, M. (2016). Intestinal microbiota in patients with spinal cord injury. *PLoS One* 11, e0145878.
27. Anitha, M., Reichardt, F., Tabatabavakili, S., Nezami, B.G., Chassaing, B., and Mwangi, S. Intestinal dysbiosis contributes to the delayed gastrointestinal transit in high-fat diet fed mice. (2016). *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 328–339.
28. Hyland, N.P., and Cryan, J.F. Microbe-host interactions: influence of the gut microbiota on the enteric nervous system. (2016). *Dev. Biol.* 417, 182–187.
29. Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., and Segain, J.P. (2010). Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology*. 138,1772–1782.

Cite this article as: Lefèvre C, Bessard A, Aubert P, Joussain P, Giuliano F, Behr-Roussel D, Perrouin-Verbe M-A, Perrouin-Verbe B, Brochard C, Neunlist M (2020) Enteric nervous system remodeling in a rat model of spinal cord injury: a pilot study, *Neurotrauma Reports* 1:1, 125–136, DOI:10.1089/neur.2020.00041.

Abbreviations Used

ANOVA = analysis of variance
AUC = area under the curve
ChAT = choline acetyltransferase
CT = control
Cy3 = carboxymethylindocyanine
Cy5 = 7-amino-4-indodicyanin
EFS = electrical field stimulation
ENS = enteric nervous system
FICT = fluorescein isothiocyanate
ICAM-1 = intercellular adhesion molecule-1
IL = interleukin
IR = immunoreactive
L-NAME = N-nitro-L-arginine methyl ester
mRNA = messenger RNA
nNOS = neuronal nitric oxide synthase
NOS = nitric oxide synthase
PBS = phosphate-buffered saline
PFA = paraformaldehyde
RIPA = radioimmunoprecipitation assay
SCI = spinal cord injury

Publish in *Neurotrauma Reports*



- Immediate, unrestricted online access
- Rigorous peer review
- Compliance with open access mandates
- Authors retain copyright
- Highly indexed
- Targeted email marketing

liebertpub.com/neur



3 Résultats préliminaires sur modèle de souris spinalisée

Pour la première étude présentée sur rat spinalisé, nous avons bénéficié d'un partenariat avec l'unité INSERM 1179, Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines, qui nous a permis de générer les premières données de nos travaux. Cependant, afin d'être à la fois autonomes dans la gestion de notre modèle animal, et d'être les plus efficaces possibles pour nos recherches, il a paru essentiel de mettre au point un modèle de souris spinalisée au laboratoire TENS.

Nous avons mis en place un modèle de souris SCI spinalisée en thoracique haut. Il s'agit d'un modèle chirurgical de section de la moelle épinière en T3 (proche de la situation clinique des lésions thoraciques supérieures)(146). Dans ce modèle, dans lequel les capacités motrices de la souris sont également évaluées (en utilisant l'échelle de Basso (147)), les données pour le moment restent préliminaires. Sur un nombre réduit d'animaux pour l'instant, le modèle est fonctionnel et a permis de reproduire les données attendues.

La partie « méthodes » concernant le modèle chirurgical et quelques résultats principaux de ce travail sous forme de figures seules sont présentés ici. Les références de cette section sont dans la dernière partie « référence » du document.

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Modèle animal : modèle murin de souris spinalisée en T3

Les souris du groupe spinal cord injury (SCI) ont été soumises à une lésion médullaire haute en T3 entraînant la paralysie des membres postérieurs. En effet, la moelle épinière T3 a été sectionnée par chirurgie de transection après réalisation d'une laminectomie

Le jour de la chirurgie, toutes les souris ont reçu un traitement morphinique 30 minutes avant l'opération avec l'injection en sous-cutanée de 50 μ L de buprécare à 0.05 mg/mL. Les animaux ont été anesthésiés par inhalation de gaz d'isoflurane, 3% en induction et 2% en entretien, puis la peau recouvrant les vertèbres thoraciques a été rasée et désinfectée. La

peau puis les muscles ont été incisés sur 2 cm et maintenus écartés via le positionnement d'un écarteur afin d'avoir un champ de visibilité suffisamment grand et donc de visualiser la colonne vertébrale. Après repérage des vertèbres, la moelle épinière des souris SCI a été sectionnée au niveau de T3 à l'aide des ciseaux d'iridectomie que l'on glisse entre 2 vertèbres. La même chirurgie a été effectuée chez les souris Sham à l'exception de la section de la moelle épinière. 30 µL de lidor à 0.5% (Lidocaïne), un anesthésique local, ont ensuite été injectés par voie sous-cutanée chez chaque souris, au niveau de l'incision at avant fermeture de celle-ci. Une fois que les plans musculaires puis cutanés ont été suturés avec du fil stérile résorbable Vicryl, les souris ont été transférées en cage individuelle et surveillées jusqu'à leur réveil. Pour la suite de l'étude, les souris sont hébergées en groupe de 4-5 maximum par cage. 6h après le début des opérations, tous les animaux ont reçu une injection en sous-cutanée de 50 µL d'anti-inflammatoires (Metacam) à 2 mg/mL. Durant les 3 jours suivant l'opération, 50 µL de Metacam à 2 mg/mL et 50 µL de buprenorphine (buprécare) à 0.05 mg/mL ont été administrés par voie sous-cutanée à l'ensemble des souris.

La vessie a été vidangée manuellement 2 fois par jour jusqu'à la reprise des réflexes de miction. Le poids et l'aspect général des animaux ont été suivis quotidiennement pendant toute la durée de l'étude. De plus, la litière des cages a été changée tous les jours afin d'éviter toute infection. De la nourriture humidifiée et sèche a également été ajoutée au sol dans les cages contenant les souris SCI pour lesquelles l'accès à l'eau a été favorisé par des biberons à tétine longue. Les animaux nous semblant en légère déshydratation ont reçu une injection en sous-cutanée de 300 µl de chlorure de sodium (NaCl).

3.2 Résultats

3.2.1 Classification des animaux selon leur statut moteur

Dans un premier temps, les souris ont été classées dans les différents groupes selon la sévérité de leur atteinte motrice suite à la chirurgie. Afin d'évaluer la fonction locomotrice des membres postérieurs de chaque souris, le score Basso Mouse Scale (BMS)(147) a été attribué à J7 et à J21 en prenant en compte les différents critères d'observation fixés par l'échelle de Basso (Fig. 10). Les souris ayant un score BMS de 0 à 2 ont été placées dans le groupe

« complete SCI ». Les sham avaient un score BMS à 9. Les scores intermédiaires étaient classés dans le groupe de lésions incomplètes = incomplete SCI).

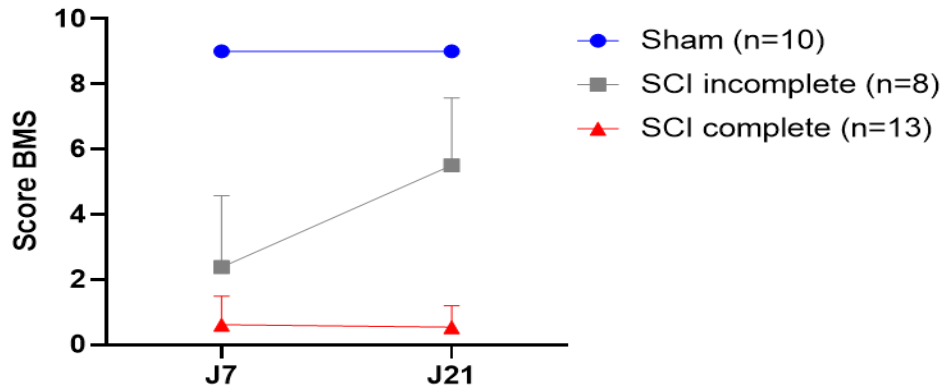


FIGURE 1 : CLASSIFICATION DES SOURIS EN TROIS GROUPES, SHAM, COMPLETE SCI ET INCOMPLETE SCI, EN FONCTION DU SCORE BMS ATTRIBUE A CHAQUE SOURIS. LES VALEURS SONT EXPRIMEES EN MOYENNE $\pm$ ECART-TYPE.

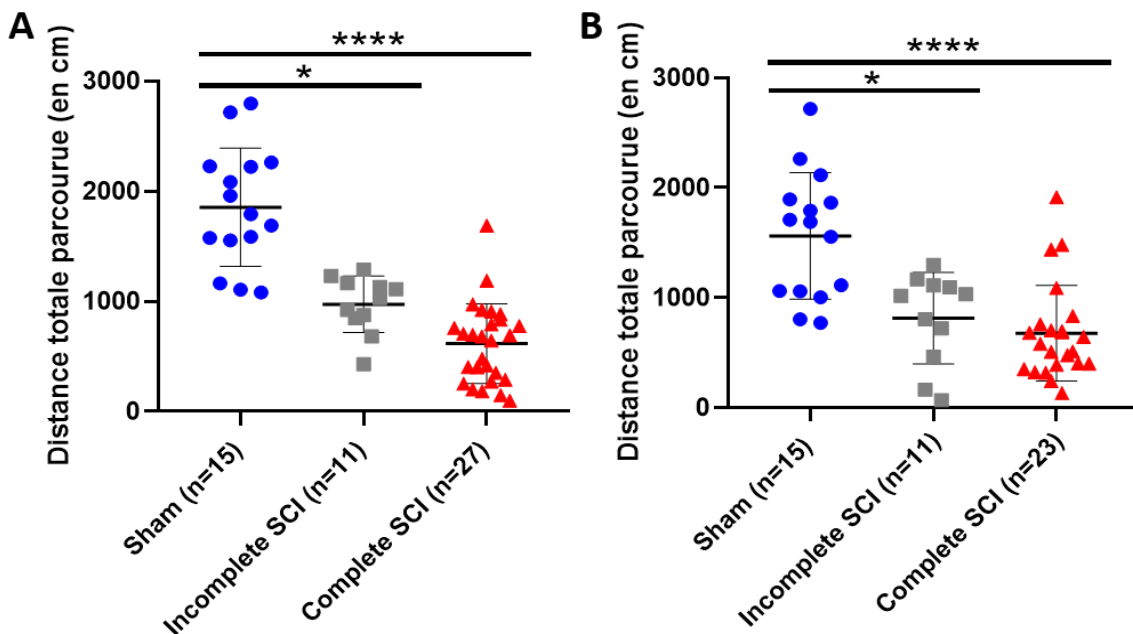


FIGURE 2 : ETUDE DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE DES SOURIS SHAM ET DES SOURIS « COMPLETE SCI » ET « INCOMPLETE SCI » A L'AIDE DU TEST DE L'OPEN FIELD A J7 ET A J21. (A) LA DISTANCE TOTALE PARCOURUE (EN CM) A ETE MESUREE PENDANT 4 MINUTES A J7 ($p < 0.0001$). (B) LA DISTANCE TOTALE PARCOURUE (EN CM) A ETE MESUREE PENDANT 4 MINUTES A J21 ($p < 0.0001$). LES VALEURS SONT EXPRIMEES EN MOYENNE $\pm$ ECART-TYPE. * $p < 0.05$ ET ** $p < 0.0001$, TEST DE KRUSKAL-WALLIS ET TEST DE COMPARAISONS MULTIPLES DE DUNN.**

3.2.2 Etude des paramètres anatomiques

Lors du sacrifice à J28, la longueur du côlon a été mesurée et comparée entre les groupes.

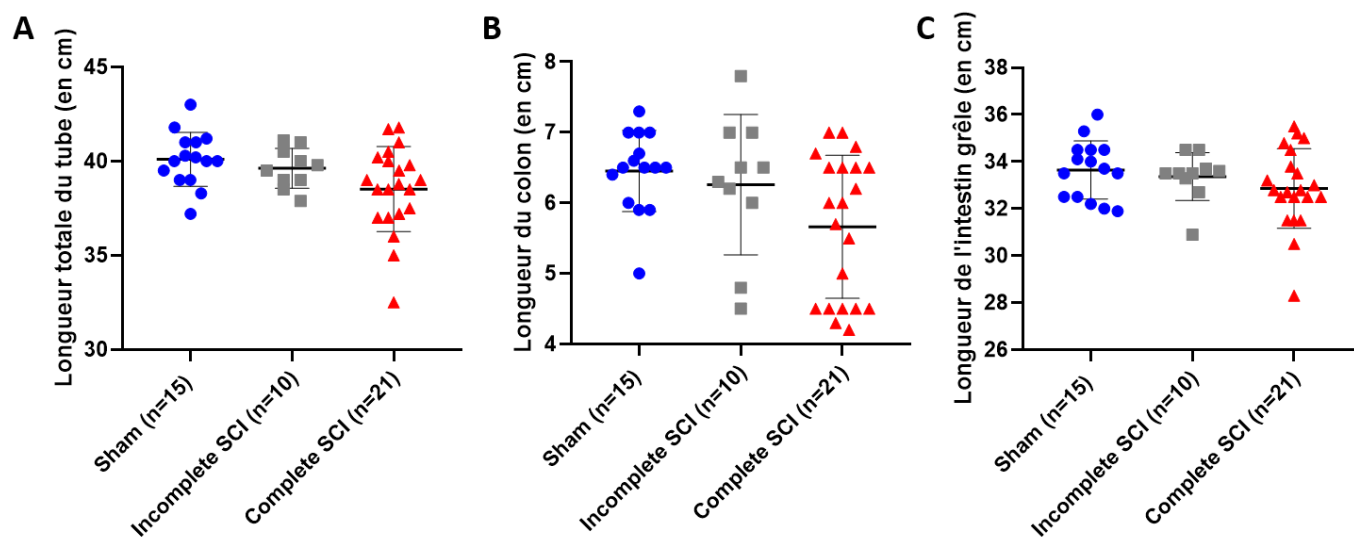


FIGURE 1: ÉTUDE DES PARAMETRES ANATOMIQUES LE JOUR DU SACRIFICE. (A) LA LONGUEUR TOTALE DE L'INTESTIN A ÉTÉ MESURÉE EN CM À J28 ($p=0.0557$). (B) LA LONGUEUR DU COLON A ÉTÉ MESURÉE EN CM À J28 ($p=0.0618$). (C) LA LONGUEUR DE L'INTESTIN GRÊLE A ÉTÉ MESURÉE EN CM LE JOUR DU SACRIFICE ($p=0.3436$). LES RESULTATS SONT EXPRIMÉS EN MOYENNE $\pm$ ÉCART-TYPE. $p>0.05$, NON SIGNIFICATIF, TEST DE KRUSKAL-WALLIS ET TEST DE COMPARAISONS MULTIPLES DE DUNN.

3.2.3 Etude des fonctions digestives

Les souris des 3 groupes Sham, incomplete SCI et complete SCI ont été évaluées sur le plan du transit à J7 et J21. Le temps de transit total était mesuré par la méthode FPO = fecal pellets output, soit un recueil du nombre de fèces en 2h. Étonnamment, le FPO était supérieur chez les souris SCI dans les deux groupes complete SCI ou incomplete SCI, avec une répartition de la production des fèces dans le temps globalement répartie uniformément chez les souris SCI, alors que les Sham ralentissaient leur transit après 15 min.

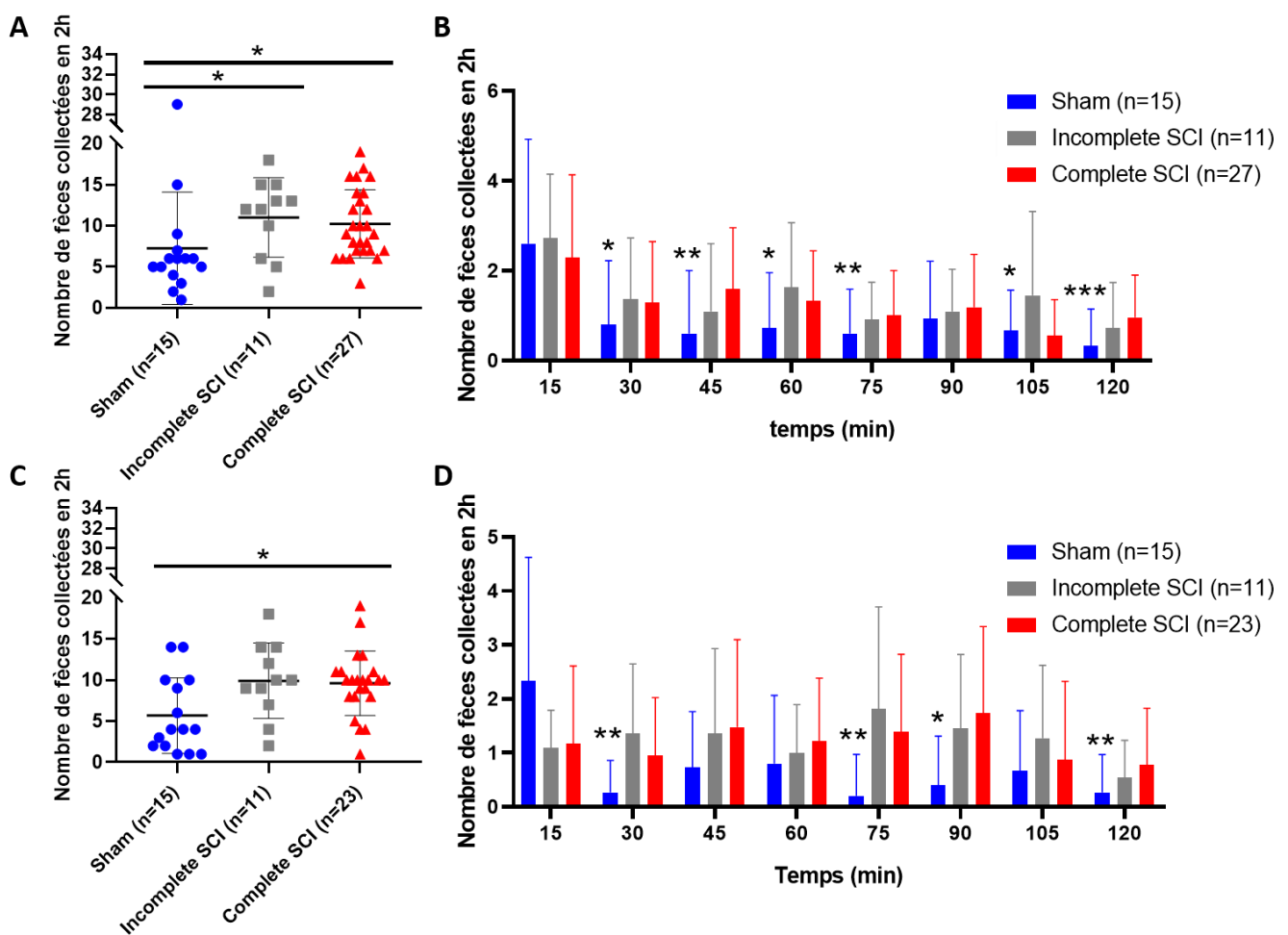


FIGURE 4: EVALUATION DU TRANSIT COLIQUE DES ANIMAUX PAR LA METHODE DU FECAL PELLET OUTPUT (FPO) A J7 ET A J21. (A) A J7, LE NOMBRE DE FECES RECUEILLIES PENDANT 2H A ETE COMPTE ($p=0.0079$). (B) REPARTITION DES MATIERES FECALES EXCRETEES DURANT LES 2H A J7. (C) NOMBRE TOTAL DE FECES COLLECTEES EN 2 HEURES A J21 ($p=0.0267$). (D) DISTRIBUTION DES FECES AU COURS DU TEMPS A J21. LES DONNEES SONT EXPRIMEES EN MOYENNE $\pm$ ECART-TYPE. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ET * $p<0.001$ POUR UN GROUPE DONNE PAR RAPPORT AU NOMBRE DE SELLES COLLECTEES A 15 MINUTES POUR LE GROUPE DONNE, (A, C) TEST DE KRUSKAL-WALLIS ET TEST POST-HOC DE DUNN, (B, D) ANOVA BIDIRECTIONNELLE A MESURES REPETEEES SUIVIE DU TEST POST-HOC DE TUKEY.**

Le temps de transit distal a également été évalué par mesure du temps nécessaire à l'expulsion d'une bille insérée dans le rectum à 2cm de distance. Le temps de transit distal était extrêmement allongé chez les souris complete SCI, et allongé seulement à J21 pour les souris incomplete SCI.

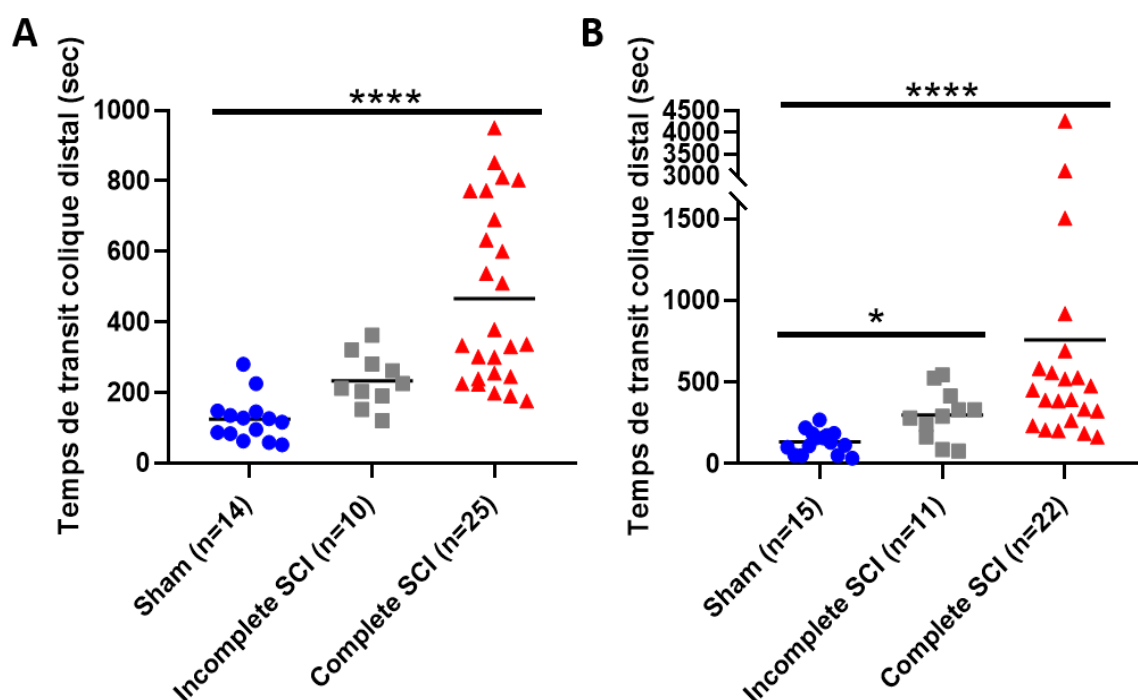


FIGURE 2: EVALUATION DU TEMPS DE TRANSIT COLIQUE DISTAL A J7 ET A J21. (A) A J7 ET (B) A J21, LE TEMPS D'EXPULSION D'UNE BILLE INTRODUITE DANS LE RECTUM DES SOURIS A ETE DETERMINE EN SECONDES ($P<0.0001$). LES DONNEES OBTENUES SONT EXPRIMEES EN MOYENNE. * $P<0.05$ ET **** $P<0.0001$, TEST DE KRUSKAL-WALLIS ET TEST POST-HOC DE DUNN.

3.2.4 Etude de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire

3.2.4.1 Etude *in vivo*

La mesure de la perméabilité paracellulaire *in vivo* a été mesurée à J7 et J21 post lésion médullaire, ne retrouvant pas de différence entre les deux groupes.

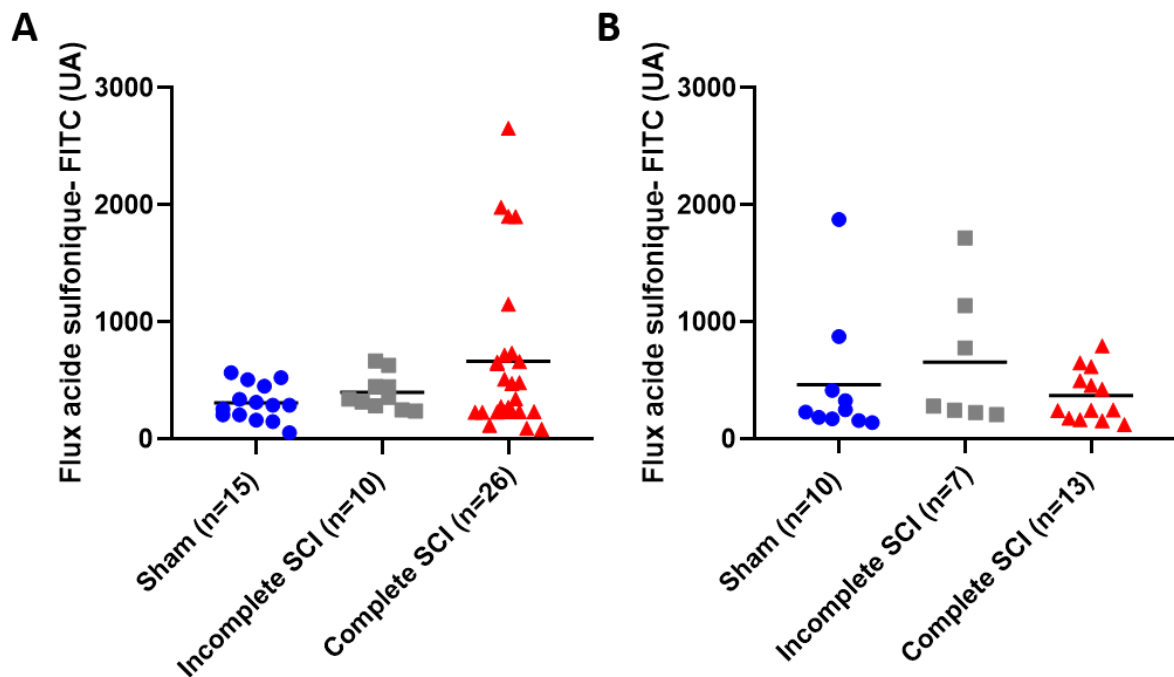


FIGURE 6: ÉTUDE DE LA PERMEABILITE PARACELLULAIRE *IN VIVO* A J7 ET A J21 CHEZ LES SOURIS SHAM ET LES SOURIS SCI COMPLETES ET INCOMPLETES. (A) A J7, LE FLUX D'ACIDE SULFONIQUE-FITC A ÉTÉ MESURÉ EN UNITÉS ARBITRAIRES (UA) 2H APRÈS L'ADMINISTRATION DU MARQUEUR PAR GAVAGE ($P=0.2686$). (B) A J21, UN DOSAGE PLASMATIQUE DE L'ACIDE SULFONIQUE-FITC EN UA A ÉTÉ EFFECTUÉ 2H APRÈS L'ADMINISTRATION PAR GAVAGE DE LA SOLUTION CONTENANT LE MARQUEUR ($P=0.5065$). LES RÉSULTATS SONT EXPRIMÉS EN MOYENNE. $P>0.05$, NON SIGNIFICATIF, TEST DE KRUSKAL-WALLIS ET TEST POST-HOC DE DUNN.

3.2.4.2 Etude *ex vivo*

La perméabilité paracellulaire et transcellulaire *ex vivo* a ensuite été mesurée au moment du sacrifice à J28, nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les groupes.

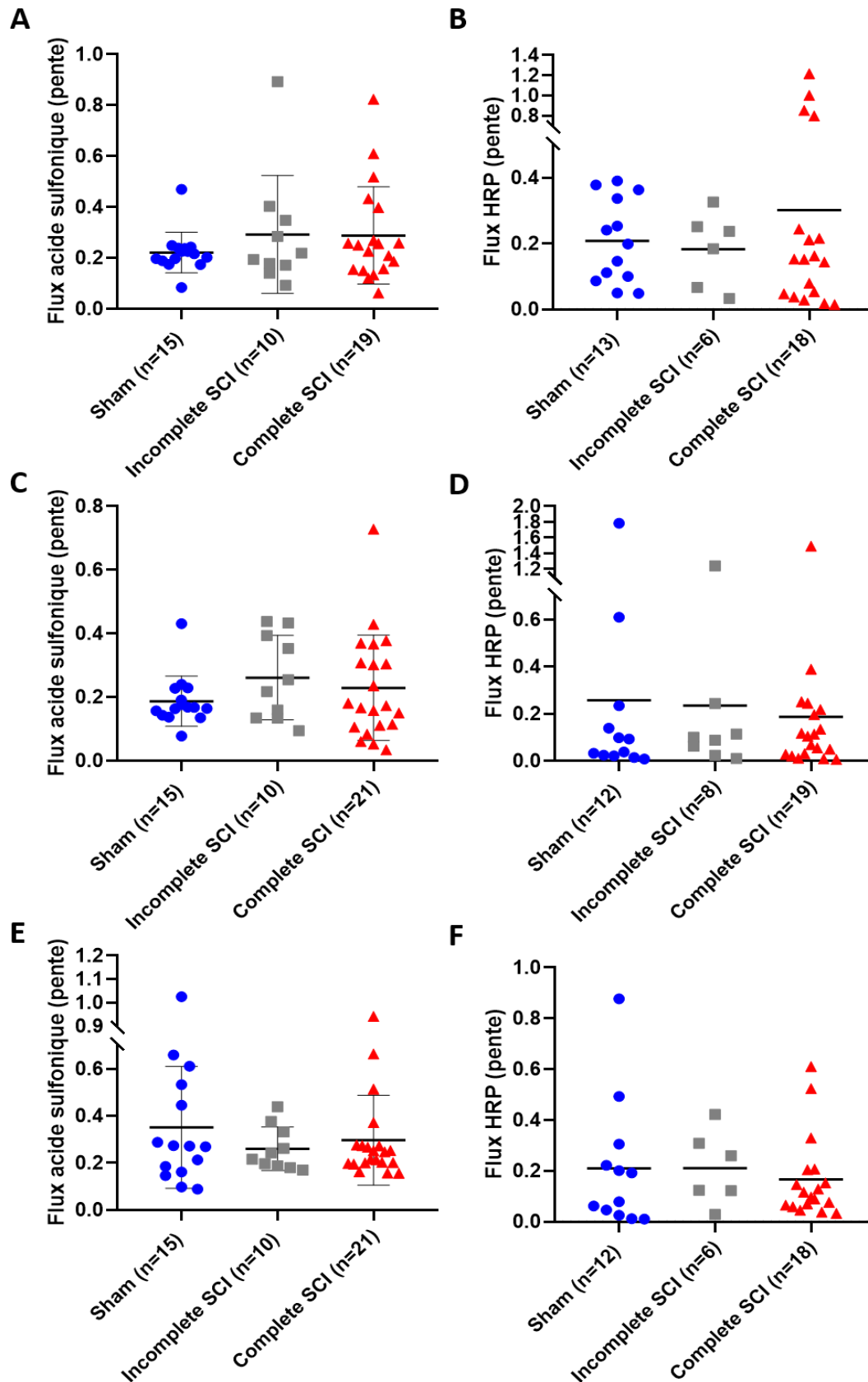


FIGURE 7: ÉVALUATION DE LA PERMEABILITE PARACELLULAIRE ET TRANSCELLULAIRE *EX VIVO*, A J28, DANS DIFFERENTS SEGMENTS D'INTESTIN CHEZ LES DIFFERENTS GROUPES. AFIN D'ÉVALUER LA PERMEABILITE PARACELLULAIRE, LE FLUX D'ACIDE SULFONIQUE A ÉTÉ MESURÉ DANS (A) DES TISSUS D'ILEON, (C) DES TISSUS DE COLON PROXIMAL ET (E) DES TISSUS DE COLON DISTAL MONTÉS DANS DES CHAMBRES DE USSING. AFIN D'ÉVALUER LA PERMEABILITE TRANSCELLULAIRE, LE FLUX DE HRP A ÉTÉ MESURÉ DANS (B) DES SEGMENTS D'ILEON, (D) DES SEGMENTS DE COLON PROXIMAL ET (F) DES SEGMENTS DE COLON DISTAL MONTÉS DANS DES CHAMBRES DE USSING. LES RESULTATS SONT EXPRIMÉS EN MOYENNE. $P > 0.05$, NON SIGNIFICATIF, TEST DE KRUSKAL-WALLIS ET TEST DE COMPARAISONS MULTIPLES

3.2.5 Etude de la motricité colique ex vivo

Afin de déterminer si la libération des différents médiateurs est altérée dans notre modèle murin de blessé médullaire, nous avons étudié à J28, le dernier jour de l'expérimentation animale, dans des bains d'organes isolés, l'intensité de la réponse neuromusculaire *ex vivo* de segments de côlon proximal et de côlon distal des différents groupes en réponse à une stimulation électrique de 10s et en absence ou en présence d'antagonistes et d'un agoniste des récepteurs muscariniques.

L'activité contractile *ex vivo* des tissus de côlon proximal et de côlon distal pendant l'EFS dans trois conditions différentes en mesurant l'aire sous la courbe (AUC) durant la période de l'EFS (Fig. 8). En condition basale, il a été montré que la réponse contractile des tissus de côlon

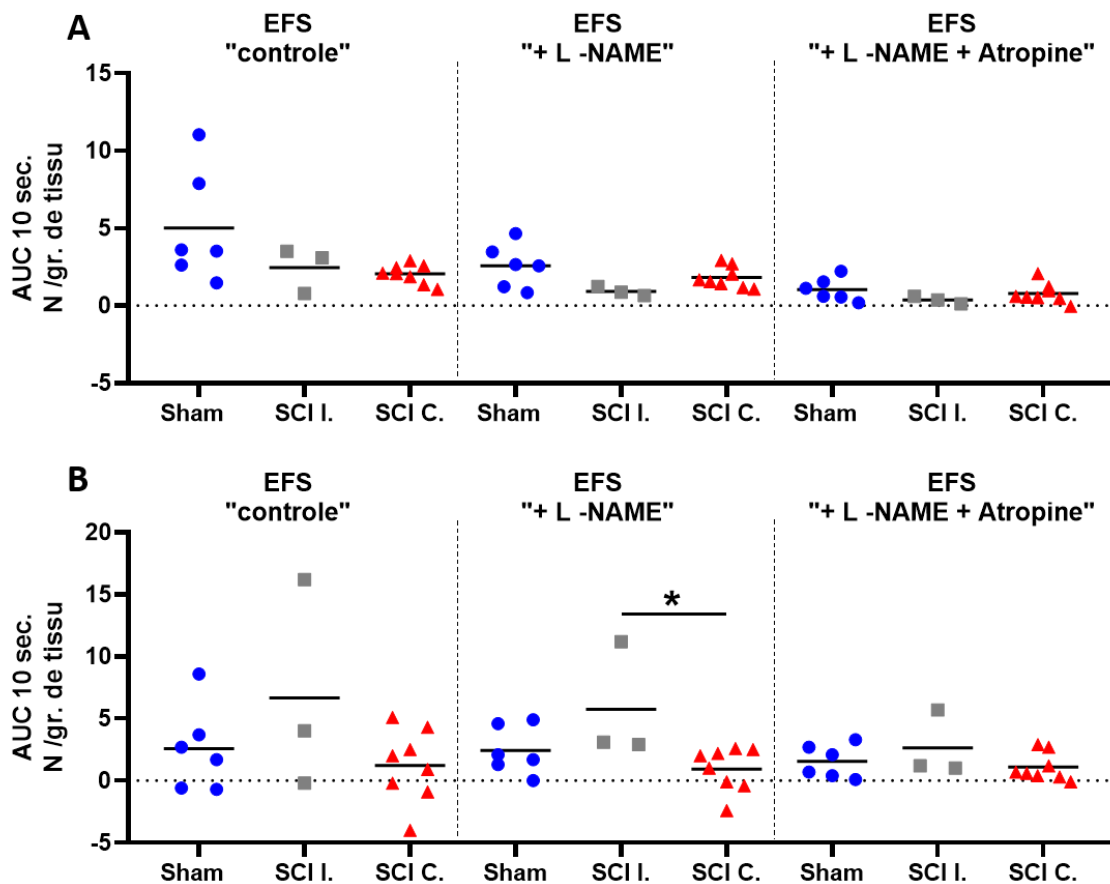


FIGURE 8: ÉTUDE DE L'ACTIVITE CONTRACTILE *EX VIVO* DES SEGMENTS DE COLON PROXIMAL ET DE COLON DISTAL PENDANT LA STIMULATION ELECTRIQUE (EFS) EN PRESENCE ET EN ABSENCE DE L-NAME ET D'ATROPINE. L'AIRESous LA COURBE (AUC) A ÉTÉ CALCULÉE DURANT LA PERIODE DE L'EFS (10 SECONDES) POUR DES TISSUS (A) DE COLON PROXIMAL ($p=0.0631$; $p=0.11$ ET $p=0.32$) ET (B) DE COLON DISTAL ($p=0.54$; $p=0.045$ ET $p=0.43$). LES VALEURS SONT EXPRIMEES EN NEWTON (N) ET SONT RAPPORTEES AU POIDS DU TISSU EN GRAMME. LES RESULTATS SONT REPRESENTES EN MOYENNE. * $p<0.05$ ET $p>0.05$, NON SIGNIFICATIF, TEST DE KRUSKAL-WALLIS ET TEST DE COMPARAISONS MULTIPLES DE DUNN.

proximal, induite par l'EFS, n'était pas significativement différente entre les trois groupes ($p=0.0631$). De plus, le même paramètre a été calculé en présence de L-NAME et d'atropine. Le L-NAME est un inhibiteur de l'oxyde nitrique (NO) synthase, le NO étant responsable de la relaxation des muscles lisses tandis que l'atropine est un antagoniste compétitif non sélectif des récepteurs muscariniques qui sont activés par l'acétylcholine et sont impliqués dans la contraction des muscles lisses de la paroi digestive. Il a été constaté qu'en présence de L-NAME ou en présence de L-NAME et d'atropine, l'activité contractile des tissus de côlon proximal en réponse à l'EFS semblait comparable entre les trois groupes (respectivement $p=0.11$ et $p=0.32$) (Fig. 8A).

De plus, des résultats similaires ont été observés dans les segments de côlon distal des souris. En effet, l'analyse de l'AUC durant la période de l'EFS en condition basale n'a révélé aucune différence significative entre les trois groupes ($p=0.54$). En présence de L-NAME, il a également été mis en évidence que la réponse du SNE, induite par l'EFS, ne semblait pas

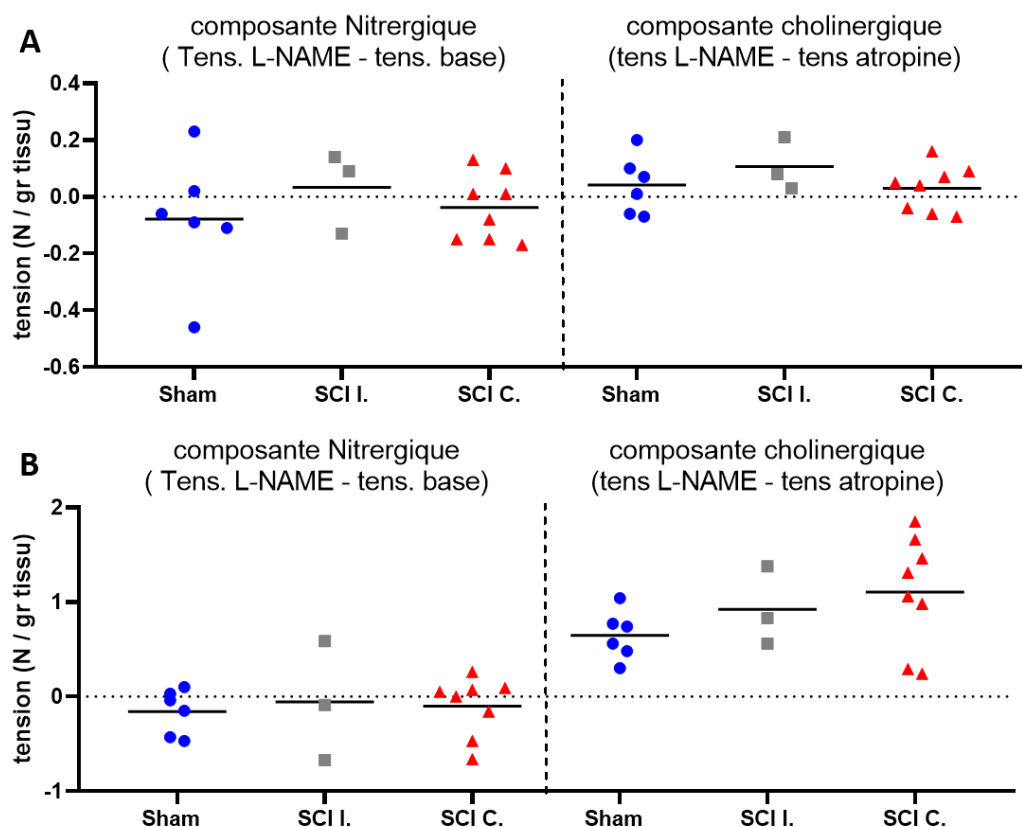


FIGURE 9: EXPRESSION DES COMPOSANTES NITRERGIQUE (NO) ET CHOLINERGIQUE (ACh) DANS DES TISSUS (A) DE COLON PROXIMAL (RESPECTIVEMENT $P=0.7$ ET $P=0.5$) ET (B) DE COLON DISTAL (RESPECTIVEMENT $P=0.92$ ET $P=0.29$). LES VALEURS SONT EXPRIMEES EN NEWTON (N) ET SONT NORMALISEES EN FONCTION DU POIDS DU TISSU EN GRAMME. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN MOYENNE. $P>0.05$, NON SIGNIFICATIF, TEST DE KRUSKAL-WALLIS ET TEST POST-HOC DE DUNN.

significativement modifiée dans les tissus de côlon distal des souris SCI complètes et incomplètes par rapport aux souris Sham (respectivement $p=0.81$ et $p=0.44$). De même, en présence de L-NAME et d'atropine, l'activité contractile en réponse à l'EFS était semblable entre les animaux SCI complets et les animaux Sham ($p=0.99$) ainsi qu'entre les animaux SCI incomplets et les animaux contrôles ($p=0.99$) (Fig. 8B).

Par ailleurs, nous avons également analysé l'expression des composantes nitrergique (NO) et cholinergique (ACh) en mesurant la tension sur une portion de courbe de 2 minutes avant l'EFS de chaque condition (Fig. 9). Il a été constaté que les composantes NO et ACh n'étaient pas modifiées dans les segments de côlon proximal entre les trois groupes au cours de notre étude (respectivement $p=0.7$ et $p=0.5$) (Fig. 9A) et distal (respectivement $p>0.999$ et $p>0.999$) (Fig. 9B).

Afin d'étudier la réponse des muscles lisses du côlon, nous avons analysé la dose réponse au bethanechol, un agoniste des récepteurs muscariniques. Pour ce faire, plusieurs doses de cette drogue ont été appliquées (de 10^{-9} à 10^{-2} M) et une AUC de 120 secondes a été calculée pour chaque concentration (Fig. 10). Il a été observé que l'activité contractile *ex vivo* des muscles lisses du côlon proximal était semblable entre les trois groupes pour des doses de bethanechol allant de 10^{-9} à 10^{-4} M. En revanche, une diminution de l'activité contractile en réponse à des doses de 10^{-3} et 10^{-2} a été mise en évidence dans les tissus de côlon proximal des souris SCI complètes et incomplètes par rapport aux souris Sham (respectivement $p<0.0001$ et $p<0.0001$) (Fig. 10A).

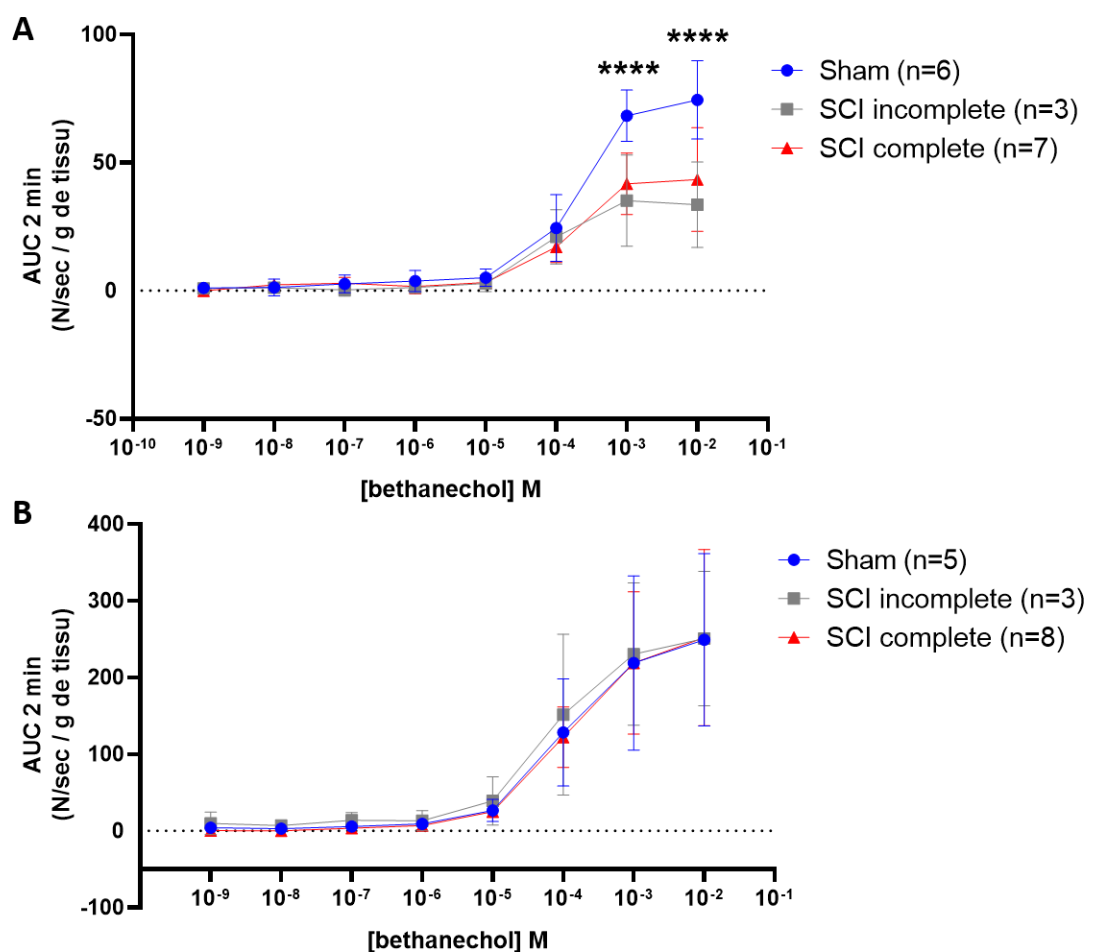


FIGURE 30: ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ CONTRACTILE *EX VIVO* DES MUSCLES LISSES DU COLON EN REPONSE A DES DOSES CROISSANTES DE BETHANECHOL (DE 10^{-9} A 10^{-2} M). L'AIRE SOUS LA COURBE (AUC) A ÉTÉ MESURÉE SUR UNE PORTION DE COURBE DE 2 MINUTES POUR CHAQUE DOSE ET POUR DES TISSUS (A) DE COLON PROXIMAL ($p=0.0069$) ET (B) DE COLON DISTAL ($p=0.9$). LES DONNÉES SONT EXPRIMÉES EN NEWTON/SECONDE (N/SEC) ET SONT RAPPORTÉES AU POIDS DU TISSU EN GRAMME. LES RESULTATS SONT REPRÉSENTÉS EN MOYENNE. ** $p<0.0001$ ET $p>0.05$, NON SIGNIFICATIF, ANOVA BIDIRECTIONNELLE A MESURES REPETÉES SUIVIE DU TEST POST-HOC DE TUKEY.**

Les résultats étaient différents dans les segments de côlon distal, l'analyse de l'AUC sur une période de 2 minutes a révélé, pour toutes les doses de bethanechol, que l'activité contractile *ex vivo* des muscles lisses des tissus de côlon distal n'était pas significativement modifiée entre les animaux SCI complets et les animaux Sham ($p > 0.9793$) ainsi qu'entre le groupe SCI incomplet et le groupe contrôle ($p > 0.8461$) (Fig. 10B). Nos résultats indiquent donc que la lésion médullaire induirait une altération de la sensibilité du muscle à l'acétylcholine uniquement dans le côlon proximal qui se caractériserait par une diminution de la réponse contractile au bethanechol dans le côlon proximal des souris spinalisées en T3.

4 Article 2: étude translationnelle

Via une étude ancillaire à l'étude clinique présentée en 4), il a été possible de prélever des biopsies coliques chez les patients blessés médullaires, afin de les étudier. Le 2^{ème} article présenté ci-après est une étude translationnelle alliant à la fois l'étude fondamentale des modifications des neurotransmetteurs du SNE, et l'étude du remodelage notamment entéroendocrine de la BEI après une lésion médullaire, tout en les corrélant à plusieurs paramètres cliniques. Elle a permis de mettre en évidence une régionalisation de l'atteinte, avec des modifications prédominantes au niveau du côlon gauche.

L'article est soumis dans la revue Cellular and Molecular Life sciences (revue de Rang B).

Cellular and Molecular Life Sciences

Region-specific remodeling of the enteric nervous system and enteroendocrine cells in the colon of spinal cord injury patients —Manuscript Draft—

Manuscript Number:	CMLS-D-22-02946	
Full Title:	Region-specific remodeling of the enteric nervous system and enteroendocrine cells in the colon of spinal cord injury patients	
Article Type:	Original Article	
Corresponding Author:	Michel Neunlist Inserm U1235: The enteric nervous system in gut and brain diseases Nantes, FRANCE	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Inserm U1235: The enteric nervous system in gut and brain diseases	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Chloe Lefevre	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Chloe Lefevre Camille Leroy Anne Bessard Catherine Le Berre-Scoul Emmanuel Coron Marc Le Rhun Charlène Brochard Brigitte Perrouin-Verbe Michel Neunlist	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Centre Hospitalier Universitaire de Nantes	Not applicable
	Institut pour la Recherche sur la Moelle épinière et l'Encéphale	Not applicable
	Agence Nationale de la Recherche	Not applicable
Abstract:	Introduction: Patients with Spinal cord injury (SCI) suffer from major bowel dysfunction, whose exact pathophysiology, particularly the involvement of the enteric nervous system or epithelial dysfunction is poorly understood. Herein, we aimed to characterize the mucosal biopsies of the right and left colon in SCI patients: 1) remodeling of key enteric neurotransmitters, 2) remodeling of enteroendocrine cells, and 3) mucosal inflammation compared to those in controls. Materials and methods: Colonic biopsies were obtained from the right and left colon from SCI patients and controls (CT). Acetylcholine (ACh), acetylcholinesterase (AChE) activity, 5-hydroxytryptamine (5-HT), and vaso intestinal peptide (VIP) concentrations were measured using an immunoassay. The mucosal density of enteroendocrine cells were analyzed using immunofluorescence. The mRNA expressions of VIP, tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), serotonin reuptake transporter (SERT), and inflammatory cytokines [Interleukin 1 beta (IL-1β) and tumor necrosis factor alpha (TNFα)] were analyzed by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction. We then correlated the clinical data of SCI patients with biological parameters. Results: In SCI, mucosal ACh concentration was lower in the right colon ($p=0,0065$) but not in the left colon, and	

Region-specific remodeling of the enteric nervous system and enteroendocrine cells in the colon of spinal cord injury patients

Lefèvre C^{*1,2}, Le Roy C^{*1,2}, Bessard A^{*1}, Le Berre-Scoul C¹, Coron E^{1,3}, Le Rhun M³, Brochard C^{1,4}, Perrouin-Verbe B^{1,2}, Neunlist M¹.

¹Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, The Enteric Nervous System in gut and brain disorders, IMAD, F-44000 Nantes, France

²Nantes Université, CHU Nantes, Service de Médecine Physique et Réadaptation Neurologique, F-44000 Nantes, France

³Nantes Université, CHU Nantes, Service de Gastroentérologie, IMAD, F-44000 Nantes, France

⁴CHU Rennes, Explorations fonctionnelles digestives, F-35000 Rennes

*contributed equally to the work

Corresponding author :

M Neunlist, PhD

“The Enteric Nervous System in gut and brain disorders”,

Faculté de médecine, 4ème étage,

Boulevard Gaston Veil,

44000 Nantes.

Biobank information:

SCI patients: PHRC ConstiCAPE – clinical trial NCT02566746

CTs: Anosain – clinical trial NCT03054415 and biobank of the « Institut des Maladies de l’Appareil Digestif (IMAD) » registered under number DC-2008-402

ABSTRACT

Introduction: Patients with Spinal cord injury (SCI) suffer from major bowel dysfunction, whose exact pathophysiology, particularly the involvement of the enteric nervous system or epithelial dysfunction is poorly understood. Herein, we aimed to characterize the mucosal biopsies of the right and left colon in SCI patients: 1) remodeling of key enteric neurotransmitters, 2) remodeling of enteroendocrine cells, and 3) mucosal inflammation compared to those in controls.

Materials and methods: Colonic biopsies were obtained from the right and left colon from SCI patients and controls (CT). Acetylcholine (ACh), acetylcholinesterase (AChE) activity, 5-hydroxytryptamine (5-HT), and vaso intestinal peptide (VIP) concentrations were measured using an immunoassay. The mucosal density of enteroendocrine cells were analyzed using immunofluorescence. The mRNA expressions of VIP, tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), serotonin reuptake transporter (SERT), and inflammatory cytokines [Interleukin 1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF α)] were analyzed by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction. We then correlated the clinical data of SCI patients with biological parameters.

Results: In SCI, mucosal ACh concentration was lower in the right colon ($p=0.0065$) but not in the left colon, and AChE activity was lower in both the right and left colon ($p=0.004$ and $p=0.028$, respectively) than in CT. While the VIP concentration was similar in the right and left colons, VIP mRNA expression was increased in the right colon ($p=0.0103$) and decreased in the left colon ($p=0.0031$), in SCI patients compared with CT. Interestingly, 5-HT concentration was reduced in the left colon ($p=0.005$) but not in the right colon in SCI patients. Moreover, in SCI patients, compared with CT, SERT mRNA expression was selectively increased in the left colon ($p=0.0069$) while TPH1 mRNA expression was increased in the right and left colons ($p=0.003$ and 0.007 , respectively). Although mucosal TNF α and IL-1 β mRNA expression did not significantly differ between SCI and CT groups, we identified a significant positive correlation between TNF α and IL-1 β mRNA expression and left colon transit time ($p=0.027$ and $p=0.03$, respectively) in the SCI group.

Conclusion: Region-specific changes occur in the enteric neurotransmitter, serotonergic, and inflammatory pathways in the colon of SCI patients. The significant correlations between these

pathways and clinical parameters in the left colon further set a scientific basis for designing therapeutic targets to improve colonic motor dysfunction in patients.

Key words: spinal cord injury, digestive disorders, enteric nervous system, enteroendocrine cells, colonic inflammation

INTRODUCTION

Spinal cord injury (SCI) causes significant alterations to multiple organ systems. Beyond sensitive or motor impairments, impairments caused by SCI lead to autonomic dysfunction of the cardiovascular and respiratory systems, genito-sexual and bladder systems, and gastrointestinal tract(1). The latter is also known as neurogenic bowel dysfunction (NBD). NBD is among the most prevalent disorders after SCI, affects up to 95% of patients(2). Clinically, SCI patients most often suffer from delayed transit and excretion disorders, including anorectal dyssynergia and anal incontinence(3–6). The management of NBD takes a significant amount of time on a daily basis and is ineffective due to a limited therapeutic arsenal(7). In addition, NBD accounts for 15 % of the causes of rehospitalization after SCI(8). Taken together, NBD has a major impact on the health and quality of life of SCI patients(9). Indeed, improving bowel function is the second or third recovery priority for paraplegics and tetraplegics, even before the recovery of walking capacity(10). Therefore, improving our understanding of the pathophysiological mechanisms underlying NBD is of major interest in the care of SCI patients.

Digestive dysfunction in SCI patients is purportedly related to the impairment of extrinsic sympathetic and parasympathetic innervation(11). However, recent evidence suggests that the enteric nervous system (ENS) may be a major contributor to these dysfunctions. Indeed, the ENS is the integrative and intrinsic nervous system embedded along the gastrointestinal tract that regulates digestive functions, such as motor functions (peristalsis, migrating motor complex), as well as intestinal epithelial barrier functions (secretion, permeability, cell proliferation, and differentiation)(12). Alterations in the ENS have been reported in patients with a wide range of digestive motility disorders, including slow transit constipation (STC)(13), irritable bowel syndrome (IBS)(14), and brain diseases such as Parkinson's disease (15) and autism spectrum disorders(16), where these alterations may contribute to digestive comorbidities observed in central nervous system disorders(17). In the only study performed in SCI patients, changes in the ENS characterized by myenteric neuronal cell loss and a reduction in calretinin-immunoreactive submucosal neurons were observed(18). In animal models of SCI, region-specific changes in the ENS neurochemical phenotype have been observed and characterized in the ileum by a decrease in the proportion of neuronal nitric oxide synthase neurons (19) and in the colon by a decrease in acetylcholine (ACh)

concentration (20). Interestingly, animal model studies suggest that changes in the ENS phenotype in the colon are region-specific, that is, they primarily affect the right colon compared to the left colon(20,21). However, whether organ-specific changes in the ENS phenotype, particularly in neuromediator expression, also occur in SCI patients remains undetermined.

In addition to the ENS, enteroendocrine cells (EEC) are increasingly recognized as key cellular regulators of digestive functions. Indeed, EEC are a cellular subtype of the intestinal epithelial monolayer that act as mechanical and/or chemo sensors, triggering, upon stimulation, the release of mediators such as 5-hydroxytryptamine (5-HT) or cholecystokinin, which activate the ENS to modulate motility and/or epithelial secretory functions(22). Among EEC, enterochromaffine cells (ECC), which synthesize 5-HT(23,24), have gained particular attention in gut motility disorders. Indeed, EEC-derived 5-HT regulates gut motility (25–28). Furthermore, specific deletion of ECC induces delayed gastric emptying and colonic motility(29). Further, reduced expression of tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), the rate-limiting enzyme in 5-HT synthesis, and serotonin reuptake transporter (SERT) has been reported in IBS patients with constipation(26,30). Whether changes in ECC density and 5-HT pathways also occur in SCI patients remains unknown.

A major factor limiting pathophysiological understanding of both ENS and ECC dysfunctions in SCI patients relies on difficulties in accessing human tissues for both technical and ethical reasons. However, routine colonic mucosal biopsies have proven effective in studying both intestinal epithelial barrier function and the ENS phenotype in patients, particularly in Parkinson's disease (31–33). Therefore, this study combined similar approaches using mucosal biopsies of the right and left colons of SCI patients and controls to characterize 1) mucosal changes in ENS neurotransmitter expression, 2) changes in ECC density and 5-HT pathways, 3) mucosal inflammation, and 4) to identify putative correlations between biological and clinical parameters.

PATIENTS AND METHODS

1- Patients

Fourteen SCI patients who were included in a clinical trial (PHRC ConstiCAPE clinical trial NCT02566746) from July 2016 to October 2020 were enrolled in the study. This study aimed to evaluate the effect of percutaneous endoscopic cecostomy (PEC) on the quality of life of SCI patients. Colonic functional exploration was performed by evaluating the initial colonic transit time using radiopaque markers(34). Patients completed several forms, including the NBD score, which is a validated score for evaluating digestive function in SCI(35). Patients underwent pre-inclusion colonoscopy with standard mucosal colonic biopsies before treatment modification and PEC.

The exclusion criteria were: inability to provide informed consent (guardianship, curatorship), known hemostasis disorders, severe obesity, history of colic resection surgery, or inflammatory bowel disease.

Two control (CT) groups were included: the first CT group consisted of healthy volunteers from a clinical trial (Anosain – clinical trial NCT03054415)(36), from May to September 2017, used for immunoassay and transcriptomic analyses. The second, used for immunohistochemistry, was obtained from a historical cohort of patients who underwent colorectal tumor resection, wherein segments of the colon were collected at a distance from the tumor in a healthy area. This historical cohort of the « Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD) » is registered under the number DC-2008-402. Written informed consent for participation in the trial or biobank was obtained from each participant prior to inclusion.

2- Tissue conditioning

Biopsies were performed on the right and left colon of SCI patients. For the CT “Anosain,” biopsies were collected on left colon and for the biobank IMAD, we used tissue biopsies taken from fixed right or left colon. Biopsies or tissue fragments were placed immediately in sterile Hank's balanced salt solution maintained at 4°C on ice and immediately transported to the

laboratory. Five biopsies were obtained: one biopsy was placed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer for protein analysis, two in RNA lysis buffer (RA1) for transcriptomic analysis, and two for immunochemistry analysis.

3- ACh assay

Biopsies were lysed in RIPA lysis buffer (Millipore, Burlington, MA, USA) containing sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich, USA), phosphatase inhibitors (Phosphatase inhibitor cocktail 3; Sigma-Aldrich, USA), and protease inhibitors (Complete; Roche Diagnostics, France) using a Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, France), followed by sonication with a Vibracell 75186 (Sonics, USA). Total protein levels were quantified using an Eppendorf Biophotometer (France) with Bradford solution (Sigma-Aldrich, USA). ACh concentration and acetylcholinesterase activity (AChE) were determined in tissue homogenates containing equal amounts of protein (100 µg) (Amplex red ACh/AChE assay kit; Thermo Fisher).

4- 5-HT assays

Serotonin concentration in biopsies was assessed using a serotonin ELISA kit (E4294; Biovision, Milpitas, USA) according to the manufacturer's protocols. Biopsies lysed in RIPA buffer were used to assess 5-HT release. The plate was washed two times with 1× wash solution, and then samples were added and incubated with biotin-detection antibody working solution for 45 min at 37°C. Following incubation, the liquids were discarded, the wells were manually washed three times, each with the diluted wash solution, and horseradish peroxidase was added to each well. Following incubation at 37°C for 30 min, the wells were washed again, and tetramethylbenzidine substrate was added to all wells and incubated for 15 min at 37°C in the dark. The reaction was terminated by adding a stop solution, and the color changed from blue to yellow. The color change was measured at 450 nm using a spectrofluorometer (Biotek, France). The data were calculated for 100 µg protein.

5- Quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis

Total RNA was extracted from biopsies placed in RA1 buffer with a Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies) using Nucleospin RNA II (Machery-Nagel, France)

according to the manufacturer's instructions. Potential genomic DNA contamination was removed by treatment with Turbo DNase (Ambion Inc., USA), and RNA was quantified using a Nanodrop 200° ND-1000 UV-vis spectrophotometer (Nanodrop Technologies, USA). The reverse transcriptase reaction was performed using 1 µg total RNA incubated at 72°C for 3 min using the Super Script III Reverse Transcriptase System kit (Thermo Fisher Scientific, France) in a Thermal Cycler 2720 thermocycler (Applied Biosystems, USA) (25°C for 5 min, 50°C for 55 min, 70°C for 15 min). PCR amplification was performed using an Absolute Blue SYBR Green Fluorescein Kit (Roche Molecular Biochemicals, France) and run on a StepOnePlus system (Life Technologies). The studied genes were vasoactive intestinal peptide (VIP), TPH1, tumor necrosis factor alpha (TNFα), and interleukin 1 beta (IL-1β).

- VIP # NM_003381, forward: 5'-CGGCATGGCCTCTTTACAGGGC-3'; reverse: 5'-ACTCCATCAGCATGCCTGGCA-3'
- TPH1 # NM_004179, forward: 5'-ATACCCCAGAGCCAGATACC-3'; reverse: 5'-GTAGCACGTTGCCAGTTTTTG-3'
- TNFα # NM_000594, forward: 5'- CCGAGTGACAAGCCTGTAG-3'; reverse: 5'-TGAGGTACAGGCCCTCTGAT-3'
- IL-1β # NM_000576.2, forward: 5'-GAGCAACAAGTGGTGTCTCC-3'; reverse: 5'-TTGGGATCTACTCTCCAGC-3'

The expression of S6 ribosomal protein was used as a reference gene: RPS6 # NM_001010.2, forward:5'-AAGCACCCAAGATTCAGCGT; reverse:5'- TAGCCTCCTTCATTCTCTTGGC-3'.

For SERT gene expression, PCR amplification was performed using TaqMan primers Hs00169010_m1 and RPS6 control (Hs04195024_g1) (Thermo Fisher Scientific, France).

The relative expression of gene interest was measured by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

6- Immunohistochemical analysis

Biopsies were pinned and stretched in a dissection dish, then fixed in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde for 3 h at room temperature. After three PBS washes, the mucosa was first collected under a microscope and stored in PBS/NaN₃ (0.1%). The muscle was removed to expose the submucosal plexus (SMP). The SMP were permeabilized for 1 h in PBS/NaN₃ (0.1%) containing 0.5% TritonX-100 and 4% horse serum.

The SMPs were incubated sequentially with the following primary antibodies: rabbit anti-choline acetyltransferase (rChAT; 1/1000; kindly gifted by M. Schemann, Germany) for 72 h, guinea-pig anti-VIP (1/500; Peninsula, USA) for 24h and then mouse anti-Hu (mHu; 1/500; Invitrogen, USA) for 24 h at room temperature. Between each primary incubation, the tissues were washed with PBS and incubated for 2 h with anti-rabbit IgG Cy3 (1/500, Jackson ImmunoResearch, UK), anti-guinea-pig IgG AF488 (1/500; Invitrogen, USA), or anti-mouse IgG Cy5 (1/500, Jackson ImmunoResearch, UK). After washing with PBS, the specimens were visualized, and images were acquired with a fluorescent microscope (AxioObserver, Zeiss, Marly le Roi, France) associated with Zen Software (Zeiss) and fitted with adequate filter cubes. Images were analyzed using the ImageJ software.

7- Histological analysis

The mucosa was embedded in paraffin and microtome-sectioned (3- μ m thick) mounted on glass slides. Sections were deparaffinized by incubating the slides in two successive baths of xylene (2 $\times$ 7 min), followed by three successive baths of ethanol (100%, 5 min; 95%, 4 min; 70%, 3 min). After two baths of distilled water (2 $\times$ 2 min), the sections were incubated in antigen retrieval solution (Dako Target Retrieval Solution pH6) for 90 s at 95°C in a decklocking chamber (DC2012-220v, Biocare Medical). The sections were washed three times with PBS and incubated for one hour in antigen blocking solution (Dako) before overnight incubation at 4°C with the following primary antibodies: rabbit anti-chromogranin A (1/500; Atlas Antibodies, Sweden) or rabbit anti-5HT (1/200; Immunostar, USA) diluted in Dako Diluent (Dako Agilent). After three washes, sections were incubated for 2.5 h with Cy3-conjugated anti-rabbit IgG (1/500; Jackson ImmunoResearch, UK) at RT. The sections were then counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich, USA), mounted in Prolong (Thermo Fisher Scientific, France), and viewed under a Zeiss AxioObserver fluorescent microscope (Zeiss). The number of positive cells was normalized according to the perimeter of the crypt measured to obtain a linear density (number of cells per mm).

8- Statistical analysis

Figures were plotted and statistical analyses were performed using the Prism software (GraphPad). Clinical and descriptive data were expressed as means ($\pm$ standard deviations).

Nonparametric tests were also conducted. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Correlation tests were performed using the one-tailed Spearman's coefficient (nonparametric).

RESULTS

1. Characteristics of SCI patients and CT

The samples from 15 CTs and 14 SCI patients were analyzed using immunoassay and transcriptomic studies. The patients' characteristics are presented in Table 1. CTs were predominantly women (9/15; 60%), aged of 72.9 ± 14.9 years. SCI patients were predominantly men (11/14; 78.6%), younger with an age of 49.9 ± 14.7 years, $p=0.016$. They had a majority of thoracic neurological levels (9/14; 64.3%) and a complete SCI (9/14; 57.1%). They had a delay post injury of 22.4 ± 15.6 years. Their mean colonic transit time was 92.8 ± 43.24 hours (129.6 ± 10.18 in women [compared with a standard of 91 hours] and 85.44 ± 43.73 hours in men [compared with a standard of 77 hours]). Their mean NBD score was 19.7 ± 7.1 points, corresponding to severe dysfunction. For the immunohistochemical study, mucosal samples from 13 CTs and 9 SCI patients were analyzed. The patient characteristics are described in Table 2.

2. Analysis of mucosal neurotransmitters expression in SCI patients and CT

We first determined whether two key enteric neurotransmitters involved in ENS regulation of gastrointestinal functions, that is, ACh and VIP, were altered in mucosal biopsies of SCI patients compared to that in CTs. The ACh concentration was significantly reduced by 39% in the right ($p=0.007$) but not in the left colon of SCI patients, as compared to those in CTs (Figure 1A and 1E). Interestingly, AChE activity was significantly reduced by 67% in the right colon ($p=0.004$) and by 54% in the left colon ($p=0.028$) compared to that in CTs (Figure 1C and 1G). The VIP concentration did not change in the mucosal biopsies of SCI patients compared to that in CTs in both the right and left colons (Figure 1B and 1F). However, we observed a region-specific differential regulation of VIP mRNA expression (Figure 1D and 1H). VIP mRNA expression was significantly increased in the right colon ($p=0.010$) and significantly decreased in the left colon ($p=0.003$) of SCI patients compared to those in CTs.

3. Analysis of colonic serotonergic mucosal pathways in SCI patients and CT

This part of the study determined whether serotonergic pathways, previously reported to be altered in colonic motility disorders, were also affected in SCI patients compared to those in CTs.

a. Enteroendocrine cells counts in mucosa of SCI patients and CTs

First, we analyzed the morphological characteristics of the colonic mucosa of SCI patients and CTs. The mean height of crypts was similar in SCI patients and CTs both for the right (136.8 ± 39.4 vs. 181.5 ± 107.3 μm , respectively; $p=0.662$) and left colons (160.9 ± 52.0 vs. 173.0 ± 49.0 μm , respectively; $p=0.792$). Next, we characterized the mucosal density of ECC using an antibody against chromogranin A (CgA). The number of CgA-IR cells per mucosal length (Figure 2 A-D) did not significantly differ between SCI patients and CTs, in both the right (2.0 ± 1.7 vs. 1.6 ± 0.8 cells per mm, $p=0.931$, respectively) and left colons (2.7 ± 1.2 vs. 2.3 ± 0.9 cells per mm, $p=0.152$, respectively). Next, we analyzed the mucosal ECC density in SCI patients and CTs using an anti-5-HT antibody (Figure 2E-F). We identified no difference in the number of 5-HT-IR cells per mucosal length between SCI patients and CTs in the right (Figure 2G) (1.6 ± 0.7 vs 1.8 ± 0.5 cells per mm $p=0.662$, respectively) and left colons (Figure 2H) (2.6 ± 1.3 vs. 2.3 ± 1.0 cells per mm $p=0.955$, respectively).

b. Mucosal 5-HT concentration and mRNA expression of TPH-1 and SERT in SCI patients and CTs

Subsequently, we characterized the 5-HT concentration and expression of key molecules involved in serotonin synthesis and reuptake, that is, TPH1 and SERT expression, respectively (Figure 3).

First, we showed that the mucosal 5-HT concentration in the right colon was similar in patients as compared to CT (Figure 3E, $p=0.999$). However, in the left colon, there was a significant decrease in the mucosal concentration of 5-HT in SCI patients as compared to CT (Figure 3F, $p=0.005$). Next, we showed that TPH1 mRNA expression was significantly increased in the right colon ($p=0.002$) (Figure 3A) and in the left colon ($p=0.019$) (Figure 3B) compared to CT. Interestingly, SERT mRNA expression was not modified in the right colon (Figure 3C, $p=0.257$) but was significantly increased in the left colon (Figure 3D, $p=0.007$), as compared to CT.

4. Mucosal colonic inflammation in SCI patients and CT

In this part of the study, we aimed to determine whether changes in ENS and ECC were associated with changes in the mucosal expression of key inflammatory mediators, such as IL-1 β and TNF α .

IL-1 β mRNA expression tended to be increased in the left colon in SCI patients compared to CT ($p=0.056$) (Fig.4C), but not in the right colon ($p=0.444$) (Fig.4D). There was no significant increase in TNF- α mRNA expression compared to CT in the right colon ($p=0.257$) (Fig.4A) and in the left colon ($p=0.213$) (Fig.4B). Next, we aimed to identify the putative correlation between the ENS, markers, and inflammatory mediators in the SCI group. We found that IL-1 β expression was positively correlated with TPH1 mRNA expression in both the right and left colon ($r=0.567$ and $r=0.776$, respectively; $p=0.029$ and $p=0.002$, respectively) (Supplementary Figure1, A and B, respectively). TNF α mRNA expression was also positively correlated with TPH1 mRNA expression in both the right and left colon ($r=0.671$ and $r=0.587$, respectively; $p=0.010$ and $p=0.024$, respectively) (Supplementary Material, C and D, respectively). No correlation has been reported between IL-1 β or TNF- α and 5-HT or SERT (data not shown). Finally, no correlation was found between IL-1 β or TNF α expression and VIP or ACh concentration (data not shown).

5. Correlations between clinical and biological parameters in SCI patients

In the final part of the study, we identified putative correlations between the biological parameters in the right and left colon (enteric neurotransmitter expression, serotonergic pathways, mucosal cytokine expression) and the clinical parameters of SCI patients: total colonic transit time, right colonic transit time, left colonic transit time (i.e., left and sigmoid colonic transit time), NBD score, and Kess score. The correlations are summarized in Tables 3 and 4.

a- Enteric neurotransmitters

We first correlated the concentration and mRNA expression of mucosal enteric neurotransmitters (ACh, VIP, and AChE activity) with clinical parameters in SCI patients. No significant correlation was found between these parameters in either organ (Tables 3 and 4).

b- Serotoninergetic pathways

Next, we correlated 5-HT concentration and TPH1 and SERT mRNA expression with clinical parameters. Interestingly, we found a significant correlation between mucosal 5-HT concentration and left colon transit time in the left but not in the right colon ($r=0.643$, $p=0.048$) as well as a trend for a correlation with the total transit time ($r=0.578$; $p=0.07$). Additionally, in the left colon, SERT mRNA expression negatively correlated with the total transit time ($r=-0.584$; $p=0.031$) whereas the left colon transit time exhibited a trend ($r=-0.492$; $p=0.063$).

While TPH1 mRNA expression and transit time exhibited no correlation, TPH-1 mRNA expression positively correlated with the NBD score in the right colon ($r=0.586$; $p=0.019$) but not in the left colon ($r=-0.056$; $p=0.432$). Interestingly, TPH1 mRNA expression positively correlated with the Kess score in the right colon ($r=0.499$; $p=0.042$) and negatively in the left colon ($r=-0.589$; $p=0.024$).

Finally, no correlation was observed between 5-HT concentration, TPH1, or SERT mRNA expression in the right or left colon, and the other clinical parameters.

c- Mucosal inflammation

Finally, we correlated mucosal cytokine mRNA expression in the right and left colons using clinical parameters. Interestingly, in the left but not in the right colon, IL-1 β mRNA expression significantly correlated with both the total ($r=0.774$; $p=0.003$) and left colon transit times ($r=0.656$; $p=0.016$). Similarly, in the left but not in the right colon, TNF α mRNA expression significantly correlated with the total ($r=0.601$, $p=0.027$) and left colon transit times ($r=0.601$, $p=0.027$).

Finally, we found no correlation between TNF α and IL-1 β mRNA expression in the right or left colon and the other clinical parameters, such as the NBD or Kess score (Table 4).

DISCUSSION

In this study, we aimed to identify the remodeling of mucosal enteric neurotransmitters and serotonergic pathways in living SCI patients as compared to those in the CTs and to correlate these changes with the bowel motor dysfunctions observed in these patients. First, we demonstrated the existence of region-specific changes in enteric neurotransmitters and serotonergic pathways. Second, serotonergic pathways as well as inflammatory cytokines in the left colon, but not in the right colon, significantly correlated with transit time in the left colon, suggesting that targeting these pathways in colon-specific regions could improve motility dysfunction in SCI patients.

The first major finding of this study was to provide a comprehensive analysis of key neuromediators (ACh, VIP, and 5-HT) that could contribute to gut motility dysfunction in SCI patients. We found region-specific changes in neuromediator concentrations in the right and left colons of SCI patients compared to those in CTs. In particular, we identified a significant and region-specific decrease in the mucosal concentration of ACh in the right colon and 5-HT concentration in the left colon compared to those in CTs. Concerning changes in 5-HT pathways, a similar reduction of 5-HT was reported in a model of rat SCI(37). In addition to decreased serotonin concentration, we also observed increased SERT mRNA expression, which could further reduce the bioavailability of 5-HT and thus further contribute to constipation in SCI patients. Modified mucosal 5-HT levels have been associated with colonic constipation in diseases such as IBS(30) and STC(26). Conversely, the increased expression of TPH-1 may be considered an adaptive response of the gut to low levels of 5HT. Interestingly, these changes in 5-HT were not associated with changes in ECC density, but rather with the modulation of 5-HT expression. Among the factors potentially involved in TPH1 mRNA regulation in both the right and left colon is IL-1 β . We found a positive linear correlation between IL-1 β and TPH1 mRNA expression. However, the ability of IL-1 β to regulate TPH1 mRNA expression remains unknown. The importance of this altered 5-HT in gastrointestinal motility disturbances is also further highlighted by the fact that therapeutic approaches for improving motility in preclinical models of SCI, such as electroacupuncture (37) or microbiota transfer (38), are associated with the restoration of 5-HT levels. Moreover, 5-HT₄R agonists such as prucalopride (39) demonstrably improve colonic transit time in SCI patients. Surprisingly, we found an inverse correlation between 5-HT level and transit time in the colon.

This counterintuitive observation may indicate that the severity of constipation could induce a response in the gut to increase 5HT production to counteract the motility deficit.

In addition to changes in 5-HT, we observed a decrease in mucosal ACh concentration in SCI patients, but only in the right colon. Interestingly, this decrease in ACh concentration was previously reported in the literature in a rat model of chronic SCI (40), where this decrease was also region-specific in the right colon of ACh but not in the left (20). Interestingly, this decrease in ACh was associated with a reduction in AChE activity, which could dampen the loss of cholinergic components by enhancing ACh bioavailability. Alternatively, this reduction in ACh and AChE could reflect a loss of mucosal innervation by cholinergic neurons that also synthesize AChE. Indeed, the loss of neurons and a decrease in nerve fiber density have been previously observed in the myenteric plexus of patients with chronic SCI (18). The functional consequences of these changes on mucosal homeostasis, such as permeability or antimicrobial defense, remain unexplored. Interestingly, a recent report on Hirschsprung's disease revealed that reduced cholinergic mucosal innervation was associated with an increased risk of enterocolitis (41). This may be a result of the reduced ability of cholinergic pathways to secrete mucus or antimicrobial peptides, which both act as a defense mechanism of the intestinal epithelial barrier. However, whether SCI patients have an increased risk of gastroenteritis and whether ENS can contribute to these changes remains unknown. Whether mirror changes to those occurring in the mucosa also occur in the myenteric plexus and could thereby directly contribute to functional changes remains unknown. Indeed, previous studies have reported reduced expression of ACh and ChAT in the human colon during constipation(42,43). However, no correlation was found between the mucosal ACh concentration, AChE activity, and colonic transit time. Finally, although the ACh content was reduced, no change was observed in the mucosal content of another key neuromediator involved in gut physiology, such as VIP. However, the VIP mRNA expression was increased in the right colon and decreased in the left colon. These results remain unexplained and may reflect the fact that, besides enteric neurons, other cells of the mucosal microenvironment, such as immune cells, can produce VIP (44) and are differentially regulated.

Finally, the major findings of our study were the significant correlations between clinical parameters (colonic transit time; NBD score) and biological parameters, mainly in the left colon and not in the right colon, suggesting that these interactions in the left colon could

drive motility disorders in SCI patients and may be considered putative therapeutic targets. We found a linear positive correlation between both TNF α and IL-1 β mRNA expression in the left colon and total transit time. This suggests that gut inflammation can contribute to motility disorders or function as a marker of motility disorders in SCI patients. Although we did not measure a significant increase in IL-1 β or TNF α , only a trend for IL-1 β , in the left colon in SCI patients as compared to CT patients, this absence could result from the limited number of patients and/or cellular variability of single biopsies. However, inflammation has been previously shown to contribute to motility dysfunctions reminiscent of those observed in SCI in patients with STC or PD (45). Therefore, targeting intestinal inflammation may help improve motility dysfunction in SCI patients.

This study had some limitations. First, our findings require further confirmation in a validation cohort because of the relatively small number of patients. In particular, a longitudinal cohort could allow us to identify the time window of appearance of these lesions and whether targeting these changes earlier could prevent or reduce the development of gut motility disorders. Second, we used two independent cohorts. To increase the number of controls included in our study, control biopsies from colon tissue were obtained at a distance from cancer. Furthermore, the use of functional approaches relying on high-resolution manometry or exploration of gut permeability may improve our ability to identify the contribution of specific mediators to the functional changes observed in SCI patients. Finally, the study of mucosal enteric mediators as a mirror of changes in the myenteric plexus, which is directly involved in colonic motility, must be performed with caution. Therefore, studies confirming changes in myenteric neurons are required in the future.

In conclusion, our findings illustrate major changes in the expression of key enteric neuromediators involved in the regulation of mucosal functions as well as major modifications of the enteric endocrine system. The functional consequences of the gut pathophysiological processes observed in SCI patients remain to be determined, as well as whether targeting these changes may improve bowel dysfunction in SCI patients.

References

1. Eckert MJ, Martin MJ. Trauma: Spinal Cord Injury. *Surg Clin North Am.* oct 2017;97(5):1031-45.
2. Emmanuel A. Neurogenic bowel dysfunction. *F1000Research.* 28 oct 2019;8:F1000 Faculty Rev-1800.
3. Krogh K, Nielsen J, Djurhuus JC, Mosdal C, Sabroe S, Laurberg S. Colorectal function in patients with spinal cord lesions. *Dis Colon Rectum.* oct 1997;40(10):1233-9.
4. Enck P, Greving I, Klosterhalfen S, Wietek B. Upper and lower gastrointestinal motor and sensory dysfunction after human spinal cord injury. *Prog Brain Res.* 2006;152:373-84.
5. Lynch AC, Anthony A, Dobbs BR, Frizelle FA. Anorectal physiology following spinal cord injury. *Spinal Cord.* oct 2000;38(10):573-80.
6. Coggrave M, Norton C, Cody JD. Management of faecal incontinence and constipation in adults with central neurological diseases. *Cochrane Database Syst Rev.* 13 janv 2014;(1):CD002115.
7. Emmanuel AV, Krogh K, Bazzocchi G, Leroi AM, Bremers A, Leder D, et al. Consensus review of best practice of transanal irrigation in adults. *Spinal Cord.* oct 2013;51(10):732-8.
8. Lynch AC, Frizelle FA. Colorectal motility and defecation after spinal cord injury in humans. *Prog Brain Res.* 2006;152:335-43.
9. Liu CW, Huang CC, Yang YH, Chen SC, Weng MC, Huang MH. Relationship between neurogenic bowel dysfunction and health-related quality of life in persons with spinal cord injury. *J Rehabil Med.* janv 2009;41(1):35-40.
10. Anderson KD. Targeting Recovery: Priorities of the Spinal Cord-Injured Population. *J Neurotrauma.* oct 2004;21(10):1371-83.
11. Callaghan B, Furness JB, Pustovit RV. Neural pathways for colorectal control, relevance to spinal cord injury and treatment: a narrative review. *Spinal Cord.* mars 2018;56(3):199-205.
12. Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* avr 2004;16 Suppl 1:55-9.
13. Bassotti G, Villanacci V. Slow transit constipation: a functional disorder becomes an enteric neuropathy. *World J Gastroenterol.* 7 août 2006;12(29):4609-13.
14. Dothel G, Barbaro MR, Boudin H, Vasina V, Cremon C, Gargano L, et al. Nerve fiber outgrowth is increased in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* mai 2015;148(5):1002-1011.e4.

15. Lebouvier T, Chaumette T, Paillusson S, Duyckaerts C, Bruley des Varannes S, Neunlist M, et al. The second brain and Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* sept 2009;30(5):735-41.
16. Gonzales J, Marchix J, Aymeric L, Le Berre-Scoul C, Zoppi J, Bordron P, et al. Fecal Supernatant from Adult with Autism Spectrum Disorder Alters Digestive Functions, Intestinal Epithelial Barrier, and Enteric Nervous System. *Microorganisms.* 13 août 2021;9(8):1723.
17. Rao M, Gershon MD. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* sept 2016;13(9):517-28.
18. den Braber-Ymker M, Lammens M, van Putten MJAM, Nagtegaal ID. The enteric nervous system and the musculature of the colon are altered in patients with spina bifida and spinal cord injury. *Virchows Arch.* 1 févr 2017;470(2):175-84.
19. Kabatas S, Yu D, He XD, Thatte HS, Benedict D, Hepgul KT, et al. Neural and anatomical abnormalities of the gastrointestinal system resulting from contusion spinal cord injury. *Neuroscience.* 17 juill 2008;154(4):1627-38.
20. Lefèvre C, Bessard A, Aubert P, Joussain C, Giuliano F, Behr-Roussel D, et al. Enteric Nervous System Remodeling in a Rat Model of Spinal Cord Injury: A Pilot Study. *Neurotrauma Rep.* 1 janv 2020;1(1):125-36.
21. Joo MC, Kim YS, Choi ES, Oh JT, Park HJ, Lee MY. Changes in the muscarinic receptors on the colonic smooth muscles of rats with spinal cord injury. *Ann Rehabil Med.* oct 2011;35(5):589-98.
22. Latorre R, Sternini C, De Giorgio R, Greenwood-Van Meerveld B. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* mai 2016;28(5):620-30.
23. Portela-Gomes GM. Chromogranin A immunoreactivity in neuroendocrine cells in the human gastrointestinal tract and pancreas. *Adv Exp Med Biol.* 2000;482:193-203.
24. Smith TK, Koh SD. A model of the enteric neural circuitry underlying the generation of rhythmic motor patterns in the colon: the role of serotonin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1 janv 2017;312(1):G1-14.
25. Spencer NJ, Keating DJ. Role of 5-HT in the enteric nervous system and enteroendocrine cells. *Br J Pharmacol.* 21 juill 2022;
26. Costedio MM, Coates MD, Brooks EM, Glass LM, Ganguly EK, Blaszyk H, et al. Mucosal serotonin signaling is altered in chronic constipation but not in opiate-induced constipation. *Am J Gastroenterol.* mai 2010;105(5):1173-80.
27. Faure C, Patey N, Gauthier C, Brooks EM, Mawe GM. Serotonin signaling is altered in irritable bowel syndrome with diarrhea but not in functional dyspepsia in pediatric age patients. *Gastroenterology.* juill 2010;139(1):249-58.

28. Spencer NJ, Keating DJ. Is There a Role for Endogenous 5-HT in Gastrointestinal Motility? How Recent Studies Have Changed Our Understanding. *Adv Exp Med Biol.* 2016;891:113-22.
29. Wei L, Singh R, Ha SE, Martin AM, Jones LA, Jin B, et al. Serotonin Deficiency Is Associated With Delayed Gastric Emptying. *Gastroenterology.* juin 2021;160(7):2451-2466.e19.
30. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* juin 2004;126(7):1657-64.
31. Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, et al. Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* janv 2010;22(1):e11-14.
32. Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Coron E, Bourreille A, Le Dily S, Vavasseur F, et al. Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 10 mars 2015;3:12.
33. Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Des Varannes SB, Neunlist M, Derkinderen P. A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* avr 2012;24(4):e202-205.
34. Danquechin Dorval E, Barbieux JP, Picon L, Alison D, Codjovi P, Rouleau P. [Simplified measurement of colonic transit time by one radiography of the abdomen and a single type of marker. Normal values in 82 volunteers related to the sexes]. *Gastroenterol Clin Biol.* 1994;18(2):141-4.
35. Krogh K, Christensen P, Sabroe S, Laurberg S. Neurogenic bowel dysfunction score. *Spinal Cord.* oct 2006;44(10):625-31.
36. Brochard C, Bouguen G, Olivier R, Durand T, Henno S, Peyronnet B, et al. Altered epithelial barrier functions in the colon of patients with spina bifida. *Sci Rep.* 3 mai 2022;12(1):7196.
37. Cheng J, Li W, Wang Y, Cao Q, Ni Y, Zhang W, et al. Electroacupuncture modulates the intestinal microecology to improve intestinal motility in spinal cord injury rats. *Microb Biotechnol.* mars 2022;15(3):862-73.
38. Tian Y, Zuo L, Guo Q, Li J, Hu Z, Zhao K, et al. Potential role of fecal microbiota in patients with constipation. *Ther Adv Gastroenterol.* 2020;13:1756284820968423.
39. Krogh K, Jensen MB, Gandrup P, Laurberg S, Nilsson J, Kerstens R, et al. Efficacy and tolerability of prucalopride in patients with constipation due to spinal cord injury. *Scand J Gastroenterol.* avr 2002;37(4):431-6.

40. White AR, Werner CM, Holmes GM. Diminished enteric neuromuscular transmission in the distal colon following experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*. sept 2020;331:113377.
41. Keck S, Galati-Fournier V, Kym U, Moesch M, Usemann J, Müller I, et al. Lack of Mucosal Cholinergic Innervation Is Associated With Increased Risk of Enterocolitis in Hirschsprung's Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;12(2):507-45.
42. Burleigh DE. Evidence for a functional cholinergic deficit in human colonic tissue resected for constipation. *J Pharm Pharmacol*. janv 1988;40(1):55-7.
43. Wattchow D, Brookes S, Murphy E, Carbone S, de Fontgalland D, Costa M. Regional variation in the neurochemical coding of the myenteric plexus of the human colon and changes in patients with slow transit constipation. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc*. déc 2008;20(12):1298-305.
44. Gonzalez-Rey E, Delgado M. Role of vasoactive intestinal peptide in inflammation and autoimmunity. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. nov 2005;6(11):1116-23.
45. Li Y, Chen Y, Jiang L, Zhang J, Tong X, Chen D, et al. Intestinal Inflammation and Parkinson's Disease. *Aging Dis*. déc 2021;12(8):2052-68.

Legends - figures

		CT	SCI
		n=15	n=14
Gender (n (%))	Male	6 (40)	11 (78,6)
Age (mean $\pm$ SD)		72,9 $\pm$ 14,9	49,86 $\pm$ 14,73*
SCI (n (%))	cervical level	-	5 (35,7)
	thoracic level	-	9 (64,3)
Complete Injury (%)		-	9 (64,3)
Delay post SCI (years, mean $\pm$ SD)		-	22,4 $\pm$ 15,6
Colonic transit time (hours, mean $\pm$ SD)		-	92,8 $\pm$ 43,24
NBD score (mean $\pm$ SD)		-	19,7 $\pm$ 7,1

Table 1. Characteristics of the patients used for RT-qPCR and immunoassay analyses

Abbreviations: CT=Control, SCI=Spinal Cord Injury, n=number of patients, SD=Standard Deviation, NBD=Neurogenic Bowel Dysfunction, (* **Mann** Whitney tests; $p<0.05$)

		CT	SCI
		n=13	n=9
Gender (n (%))	Male	10 (76,9)	7 (77,8)
Age (mean $\pm$ SD)		65,6 $\pm$ 18,6	45,4 $\pm$ 16,1*
SCI (n (%))	cervical level	-	3 (33,3)
	thoracic level	-	6 (66,7)
Complete Injury (%)		-	5 (55,5)
Delay post SCI (years, mean $\pm$ SD)		-	21,4 $\pm$ 13,4
Colonic transit time (hours, mean $\pm$ SD)		-	78,8 $\pm$ 40,6
NBD score (mean $\pm$ SD)		-	22 $\pm$ 4,6

Table 2. Characteristics of the patients used for immunohistochemistry analyses

Abbreviations: CT=Control, SCI=Spinal Cord Injury, n=number of patients, SD=Standard Deviation, NBD=Neurogenic Bowel Dysfunction, (* Mann Whitney tests; $p<0.05$)

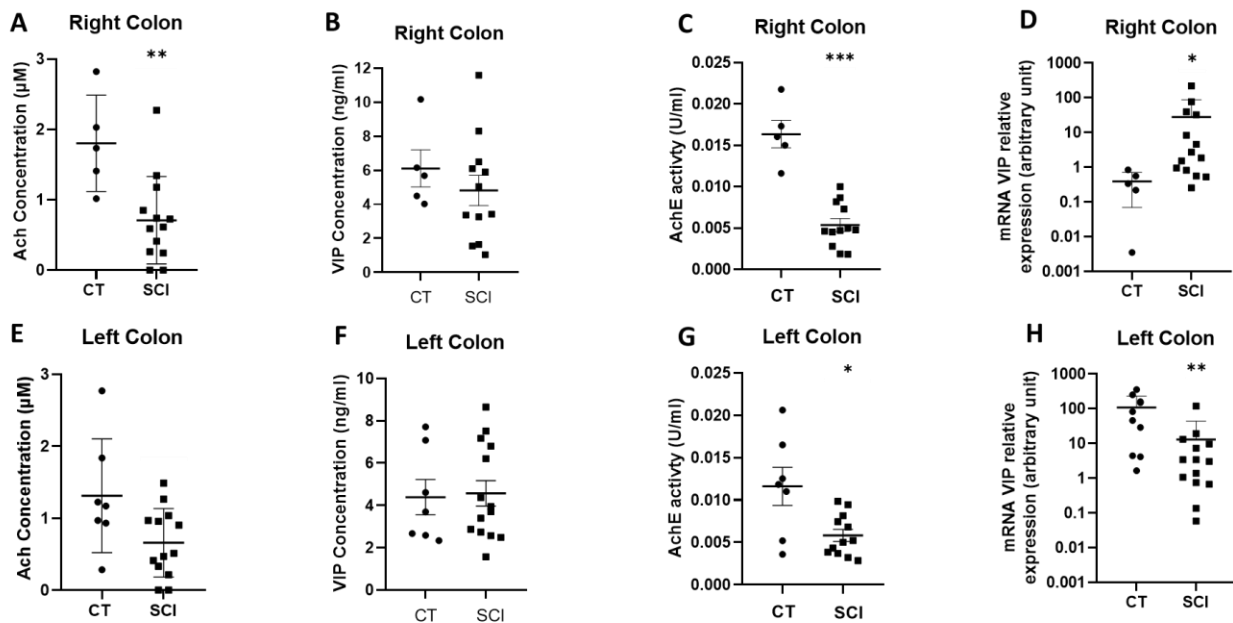


Figure 1. Impact of spinal cord injury (SCI) on neuromediators of the enteric nervous system

The acetylcholine concentration was significantly reduced in right colon of SCI patients (n=13) **(A)** compared to that in controls (CT) (n=5) (p=0.007), but not in the left colon of SCI patients (n=13) compared to those in CT (n=7) **(E)**. Acetylcholinesterase activity was decreased in both the right (n=12) **(C)** and left (n=12) **(G)** colon of SCI patients compared to those in CT (n=5, right and n=7, left) (respectively p=0.004 and p=0.028). The vasoactive intestinal peptide (VIP) concentration was unchanged in both the right (n=12) **(B)** and left colon (n=14) **(F)** of SCI patients compared to those in CT (n=5, right and n=7, left). However, mRNA VIP expression was significantly higher in the right colon (n=14) (p=0.0103) **(D)** but significantly lower in the left colon of SCI patients (n=14) (p=0.003) **(H)** compared to those in CT (n=5, right and n=9 left)

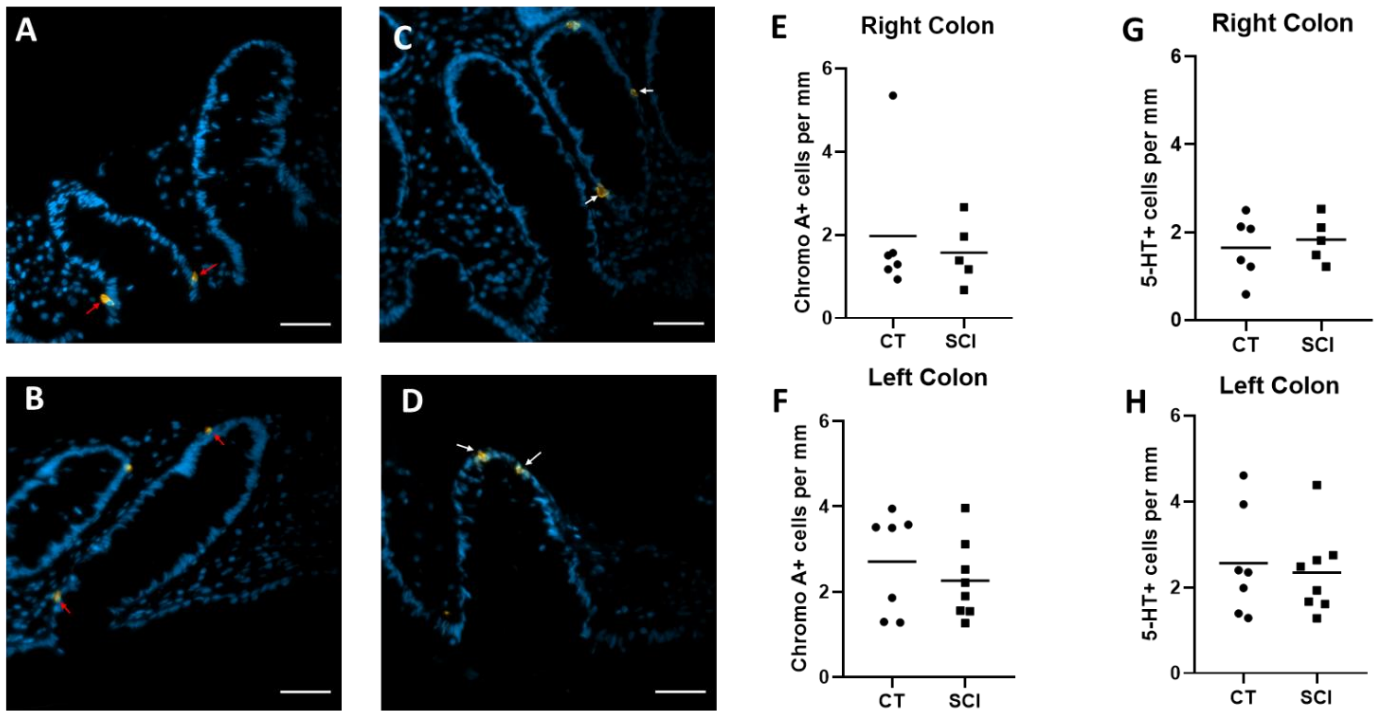


Figure 2. Impact of spinal cord injury (SCI) on enteroendocrine cells (EEC)

Immunofluorescence staining of paraffin-embedded section of colonic mucosa against chromogranin A (A, B red arrows) and against 5-hydroxytryptamine 5-HT (C, D white arrows) associated with a marker of the cell nuclei (DAPI, in blue). There was no difference between EEC density regarding the crypt perimeter (cellular linear density) in SCI patients in both the right (n=5; E) and left colons (n=8; F) and in CT (n=6, right; n=7, left). There was no difference in 5-HT+ cell density per mucosal length compared to that in CT (right, n=6; left, n=7) in both the right (n=5; G) and left colons (n=8; H) of SCI patients (Scale bar=50 μ m).

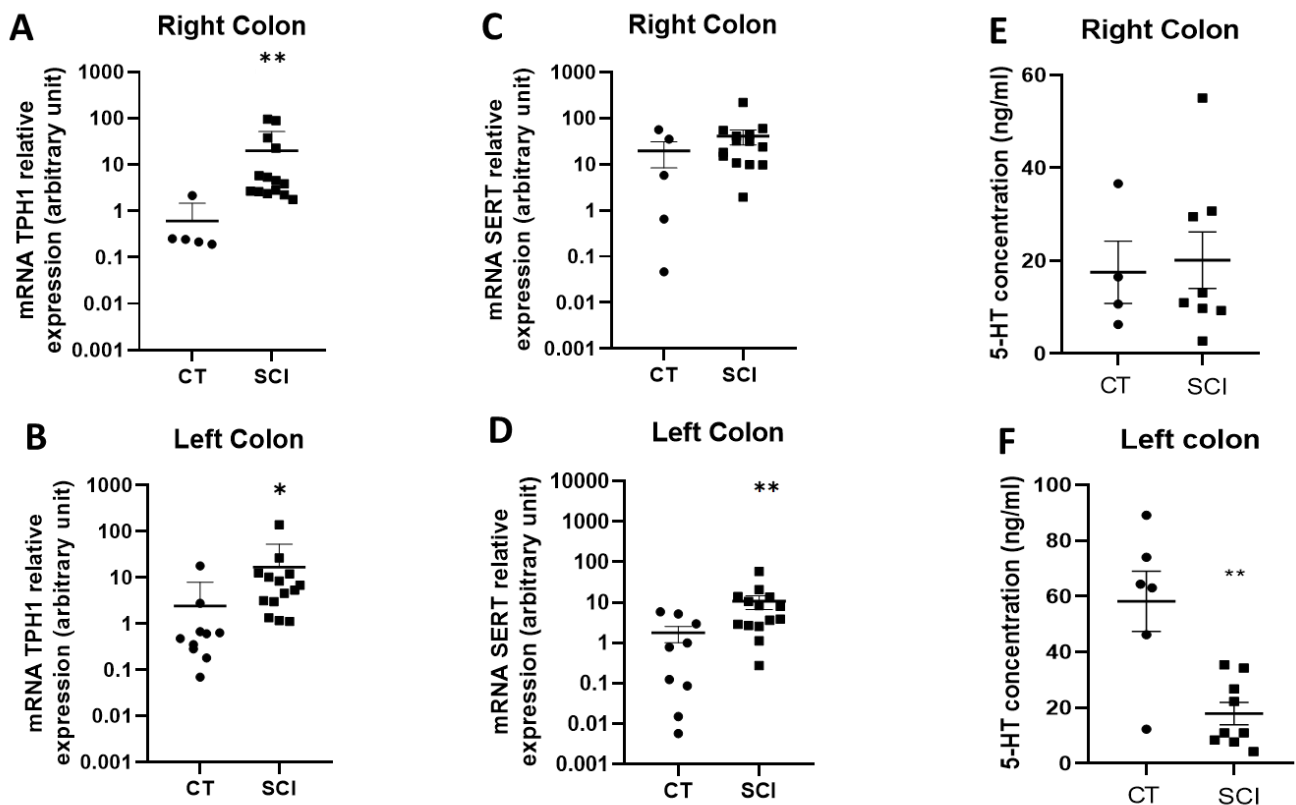


Figure 3. Impact of Spinal Cord Injury (SCI) on mucosal serotonergic pathways

mRNA Tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) expression was higher in both the right (n=14) **(A)** and left (n=14) **(B)** colons of SCI patients compared to that in controls (CT) (n=5, right; n=10, left) (respectively p=0.002 and p=0.019). The mRNA Serotonin Reuptake Transporter (SERT) expression increased in the left colon (n=14) of SCI patients compared to that in CT (n=9, left; n=5, right) **(D)**, p=0.007) but not in the right colon (n=14) (p=0.257) **(C)**. Moreover, 5-hydroxytryptamine (5-HT) concentration was unchanged in the right colon (n=8) **(E)** but lower in the left colon (n=9) **(F)** of SCI patients compared to that in CT (n=4, right; n=6, left)(p=0.005).

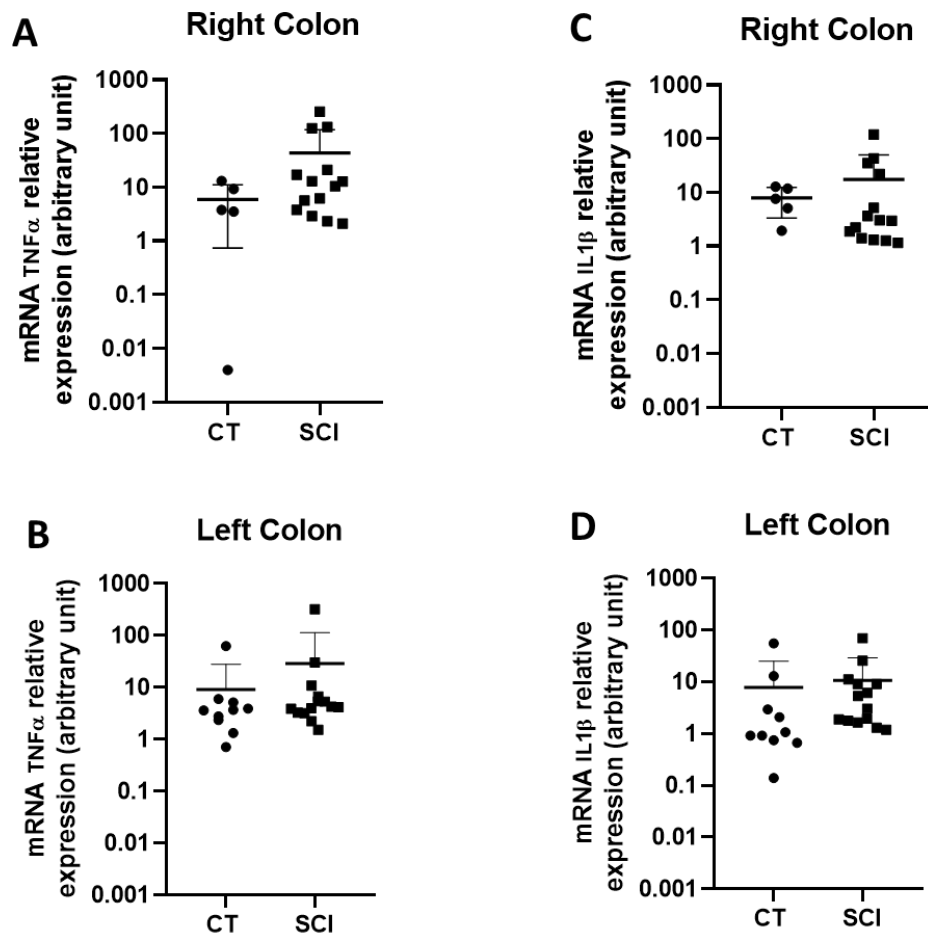


Figure 4. Impact of Spinal Cord Injury (SCI) on local inflammation

No significant increase occurred in $TNF\alpha$ mRNA expression in SCI patients ($n=14$) compared with CT both in the right colon (CT $n=5$) **(A)** and in the left colon (CT $n=10$) **(B)**. $IL-1\beta$ mRNA expression tended to increase in the left colon in SCI patients compared to those in CT ($p=0.056$) **(D)**, but not in the right colon **(C)**.

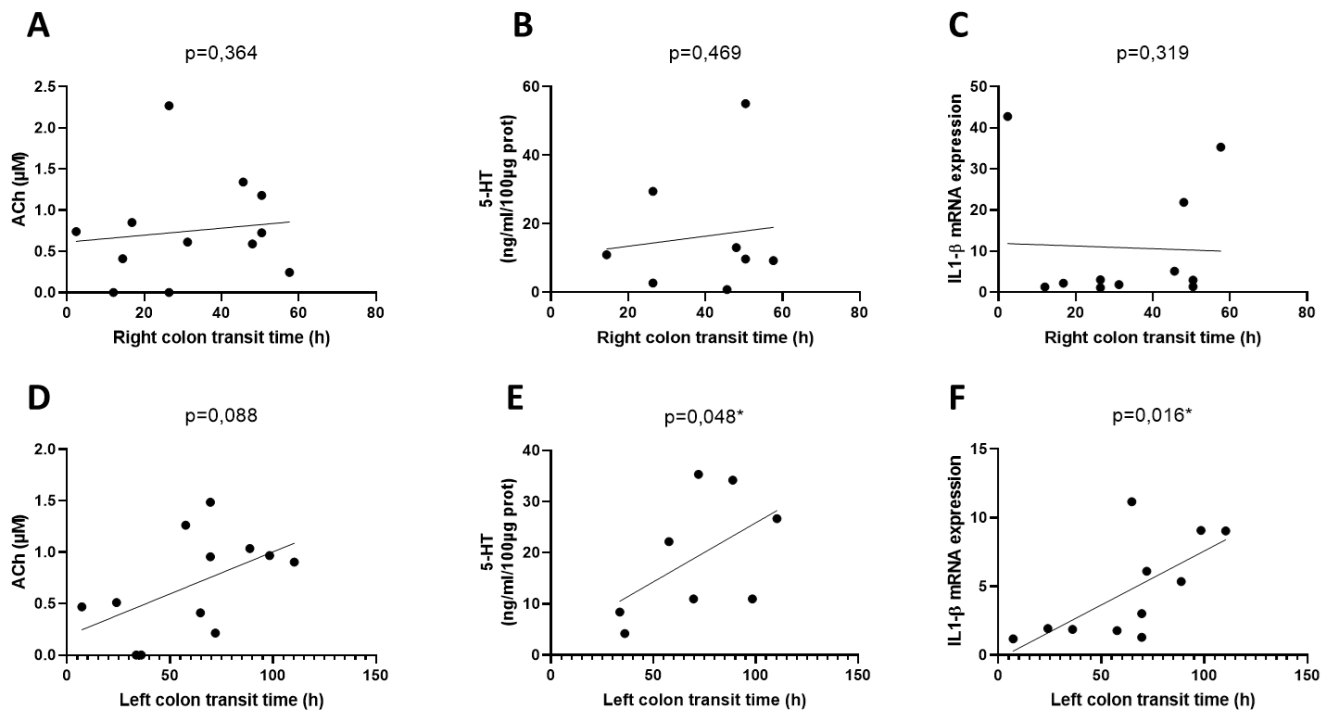


Figure 5 Clinico-biological correlations between transit time and biological parameters in the right (A-C) and left colon (D-F) of spinal cord injury patients.

The represented biological parameters are: Acetylcholine (ACh) concentration in right colon (A) and left colon (D); Serotonin (5-HT) concentration in right colon (B) and left colon (E); Interleukin-1 beta (IL-1 β) mRNA expression in the right colon (C) and left colon (F). Spearman's one-tailed correlation coefficient ($n=13$ spinal cord injury patients).

Correlations		Neurotransmitters			Serotonergic pathways			Mucosal inflammation		
			r	p-value		r	p-value		r	p-value
A Total transit time	1 Right colon	ACh	0,142	0,328	5-HT	0,072	0,436	TNFα	-0,109	0,374
		AChE	0,256	0,223	TPH1	-0,4	0,099	IL1-β	-0,027	0,470
		VIP	-0,246	0,231	SERT	-0,301	0,183			
	2 Left Colon	ACh	0,415	0,090	5-HT	0,578	0,070	TNFα	0,601	0,027*
		AChE	0,406	0,107	TPH1	0,279	0,202	IL1-β	0,774	0,003**
		VIP	0,116	0,360	SERT	-0,584	0,031*			
B Right colon transit time	Right colon	ACh	0,111	0,364	5-HT	0,036	0,469	TNFα	-0,023	0,476
		AChE	0,301	0,183	TPH1	-0,235	0,229	IL1-β	0,16	0,319
		VIP	-0,237	0,240	SERT	-0,142	0,338			
C Left colon transit time	Left colon	ACh	0,418	0,088	5-HT	0,643	0,048*	TNFα	0,601	0,027*
		AChE	0,46	0,078	TPH1	0,296	0,187	IL1-β	0,656	0,016*
		VIP	0,227	0,191	SERT	-0,492	0,063			

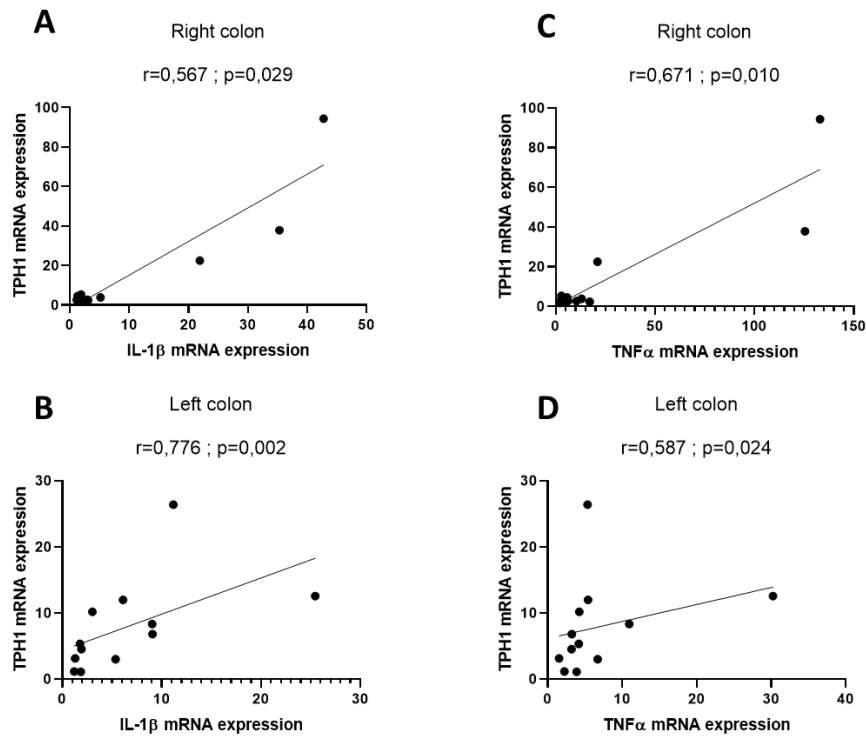
Table 3: Correlations between total (A) and segmental (B-C) transit time and biological parameters :

Enteric neurotransmitters [Acetylcholine (ACh) concentration, acetylcholinesterase activity (AChE), Vaso intestinal peptide (VIP) mRNA expression], serotonergic pathways [Serotonin (5-HT) concentration, Tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) mRNA expression, Serotonin transporter (SERT) mRNA expression], mucosal inflammation [Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα) and Interleukin -1 beta (IL-1β) mRNA expression], in the right (A1 and B) and left colons (A2 and C) of spinal cord injury (SCI) patients. Spearman's one-tailed correlations, n=13 SCI patients.

Correlations		Neurotransmitters			Serotonergic pathways			Mucosal inflammation		
		r	p-value		r	p-value		r	p-value	
A	Right colon	ACh	-0,102	0,375	5-HT	-0,204	0,316	TNFα	0,411	0,092
		AChE	-0,183	0,284	TPH1	0,586	0,019*	IL1-β	0,337	0,141
		VIP	0,397	0,100	SERT	0,313	0,160			
	Left colon	ACh	-0,394	0,091	5-HT	0,108	0,404	TNFα	-0,243	0,222
		AChE	-0,394	0,102	TPH1	-0,056	0,432	IL1-β	-0,211	0,254
		VIP	-0,39	0,105	SERT	0,155	0,315			
B	Right colon	ACh	0,114	0,360	5-HT	-0,301	0,233	TNFα	0,224	0,240
		AChE	0,105	0,372	TPH1	0,499	0,042*	IL1-β	0,077	0,406
		VIP	0,193	0,272	SERT	-0,463	0,065			
	Left colon	ACh	-0,454	0,060	5-HT	-0,036	0,472	TNFα	-0,414	0,090
		AChE	-0,316	0,157	TPH1	-0,589	0,024*	IL1-β	-0,28	0,187
		VIP	-0,396	0,101	SERT	-0,025	0,471			

Table 4: Correlations between NBD score (A) or Kess score (B) and biological parameters :

Enteric neurotransmitters [Acetylcholine (ACh) concentration, acetylcholinesterase activity (AChE), Vaso intestinal peptide (VIP) mRNA expression], serotonergic pathways [Serotonin (5-HT) concentration, Tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) mRNA expression, Serotonin transporter (SERT) mRNA expression], and mucosal inflammation [Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα) and Interleukin -1 beta (IL-1β) mRNA expression], in the right and left colons of spinal cord injury (SCI) patients. Spearman's one-tailed correlations, n=13 SCI patients.



Supplementary Figure 1: Correlations between Tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) mRNA expression and Interleukin-1 beta (IL-1 β) mRNA expression in right (**A**) and left (**B**) colon of Spinal cord injury (SCI) patients, and between TPH1 mRNA expression and tumor necrosis factor alpha (TNF α) mRNA expression in the right (**C**) and left (**D**) colons of SCI patients. Spearman's one-tailed, $n=13$ SCI patients.

Tester l'efficacité d'une nouvelle technique thérapeutique

5 Article 3 : étude clinique

Le dernier article présenté ici est une étude clinique ayant pour objectif d'évaluer une nouvelle technique d'irrigations coliques antérogrades via une caecostomie posée de façon percutanée endoscopique, en terme d'effets sur la qualité de vie des patients blessés médullaires, ainsi que sur leur fonction digestive (constipation, incontinence...).

L'étude ancillaire à ce projet a permis de prélever des biopsies coliques chez ces mêmes patients, et de réaliser l'article 2 précédemment décrit.

Cette étude clinique avait des résultats positifs en ce qui concerne le dispositif à l'étude, et laisse même entrevoir un nouveau moyen d'administration de nouvelles thérapeutiques potentielles directement par voie endoluminale dans le côlon droit.

L'article est soumis dans la revue Clinical Hepato Gastroenterology (Revue de Rang A).

Clinical Gastroenterology and Hepatology
Percutaneous endoscopic caecostomy : a new approach for neurogenic bowel dysfunction in patients with spinal cord injury.
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	Percutaneous endoscopic caecostomy : a new approach for neurogenic bowel dysfunction in patients with spinal cord injury.
Article Type:	Clinical - Endoscopy
Section/Category:	Clinical Trial
Corresponding Author:	Chloe LEFEVRE Nantes University Nantes Cedex, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Nantes University
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Chloe LEFEVRE
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Chloe LEFEVRE Chloe Lefevre Brigitte Perrouin-Verbe Marc Le Fort Bénédicte Reiss Jacques Kerdraon Chloé Melchior Michel Neunlist Emilie Duchalais Emmanuel Coron Marc Le Rhun
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Introduction The aim of this study was to compare the impact of antegrade colonic irrigation (ACI) performed via a percutaneous endoscopic caecostomy (PEC) with that of an optimized bowel management program (MED) on quality of life in chronically constipated patients with spinal cord injury (SCI). Methods The study was randomized, controlled, and multicentric. Patients were included in either the PEC or MED group. They were followed-up at M1, M3, M6, M9 and M12. Patients in the MED group were allowed to switch to the PEC group and to be followed up again at M1, M3, M6, M9 and M12 after PEC. Results Eighteen patients with SCI were included; 10 were randomized to the MED group, and 8 were randomized to the PEC group. Five patients randomized to the MED group were allowed to switch to the PEC group after 12 months of evaluation, so 13 patients were evaluated in the PEC group. Quality of life (Gastro-Intestinal Quality of Life Index=GIQLI score) score improved at M1, M3 and M6 in the PEC group. The Neurogenic Bowel Dysfunction (NBD) score, which is a validated score in spinal cord-

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Arles Systems Corporation

Percutaneous endoscopic caecostomy, a randomized-controlled study about a new approach for neurogenic bowel dysfunction in spinal cord injured patients.

Authors :

Chloé Lefèvre^{1,2}, Brigitte Perrouin-Verbe^{1,2}, Marc Le Fort¹, Bénédicte Reiss¹, Jacques Kerdraon³, Chloé Melchior⁴, Michel Neunlist², Emilie Duchalais^{2,5}, Emmanuel Coron^{2,6}, Marc Le Rhun⁶.

¹ Nantes Université, CHU Nantes, Service de Médecine Physique et Réadaptation Neurologique, F-44000 Nantes, France

² Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, The enteric nervous system in gut and brain disorders, IMAD, F-44000 Nantes, France

³ Centre Mutualiste de Rééducation et de Réadaptation Fonctionnelles de Kerpape, F-56270 Ploemeur, France

⁴ CHU de Rouen, Service de Gastroentérologie, F-76000 Rouen, France

⁵ Nantes Université, CHU Nantes, Service de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, IMAD, F-44000 Nantes, France

⁶ Nantes Université, CHU Nantes, Service de Gastro-entérologie, IMAD, F-44000 Nantes

Corresponding author: Dr Chloé Lefèvre, chloe.lefevre@chu-nantes.fr, Service universitaire de MPR Neurologique du CHU de Nantes, Hôpital Saint-Jacques, 85 rue Saint-Jacques, 44093 Nantes Cedex.

Abstract

Introduction

The aim of this study was to compare the impact of antegrade colonic irrigation (ACI) performed via a percutaneous endoscopic caecostomy (PEC) with that of an optimized bowel management program (MED) on quality of life in chronically constipated patients with spinal cord injury (SCI).

Methods

The study was randomized, controlled, and multicentric. Patients were included in either the PEC or MED group. They were followed-up at M1, M3, M6, M9 and M12. Patients in the MED group were allowed to switch to the PEC group and to be followed up again at M1, M3, M6, M9 and M12 after PEC.

Results

Eighteen patients with SCI were included; 10 were randomized to the MED group, and 8 were randomized to the PEC group. Five patients randomized to the MED group were allowed to switch to the PEC group after 12 months of evaluation, so 13 patients were evaluated in the PEC group. Quality of life (Gastro-Intestinal Quality of Life Index=GIQLI score) score improved at M1, M3 and M6 in the PEC group. The Neurogenic Bowel Dysfunction (NBD) score, which is a validated score in spinal cord-injured patients, improved in the PEC group from M1 to M12. The tolerance of the device was good. Reinforced medical follow-up alone was effective in improving some parameters but not significantly.

Conclusion

ACI via PEC is effective for managing bowel disorders in patients with spinal cord injury before invasive procedures are considered.

Introduction

Spinal cord injuries (SCIs) lead to multiple impairments of motor, sensory and autonomic functions below the neurological level of the injury(1). Among autonomic impairments, bowel dysfunction in SCI patients is one of the most difficult to treat. However, this is one of the recovery priorities for patients(2). Bowel dysfunction is a source of depression, anxiety and stress, as well as social and family isolation in this population(3,4), in addition to being a source of both locoregional complications (5,6) (fecal impaction, hemorrhoids, anal fissures) and general complications (abdominal pain, autonomic dysreflexia) (7,8), which lead to 11% of rehospitalizations (9). The type of bowel dysfunction may vary according to the neurological level of injury, the completeness of the SCI, and the supraconal (=reflexic) or conal/cauda equina (=areflexic) nature of the lesion(10). They always include a loss of voluntary control of the excretion reflex and colonic dysmotility (11).

Treatments are based on a multistratified management process, the therapy pyramid (12). The first step consists of basic dietary rules, laxatives and suppositories, and the use of digital maneuvers. The second step is the use of minimally invasive measures, which include transanal irrigation (TAI)(13). TAI allows the evacuation of stool from the entire left side of the colon and rectum (14). In cases of failure, there are more invasive surgical solutions. First, antegrade irrigation performed after a Malone surgery (15–17), surgery which allows the creation of an orifice which is suitable for catheterization. In case of failure and if the lesion is complete, sacral anterior root stimulation, i.e., Brindley's procedure(18), is another possibility. As a last step, a colostomy (19) can be proposed.

Among these surgical solutions, Malone's procedure, which consists of making a caecostomy in the right iliac fossa to perform antegrade colonic irrigation (ACI), is less invasive than colostomy but has a non negligible rate of complications (20) (leakage of digestive fluid, problem of surgical conduit, stenosis of the stoma making it impossible to catheterize, etc.). In percutaneous endoscopic caecostomy (PEC), a multiperforated device (the Chait Trapdoor™ catheter(21)) can be placed under endoscopy, thus permitting ACI. This technique is minimally invasive and reversible in cases of failure. Its effectiveness has been investigated in only a few studies (22–25). To our knowledge, PEC has never been studied in a target population of spinal cord-injured patients, although in several studies have reported good efficacy of ACI in neurological subjects(22,26).

The primary endpoint of our study was the comparison of the “GastroIntestinal Quality of Life Index” (GIQLI) (27) of spinal cord injury patients with severe neurogenic bowel dysfunction undergoing ACI via PEC with those who underwent medical treatment. The secondary endpoint was the effect on bowel function, according to specific scores such as the Neurogenic Bowel Dysfunction score (NBD score), which is strongly related to quality of life (28).

Methods

This was a prospective, controlled, randomized, multicenter study (clinical trial NCT02566746, recruitment in 3 French centers) in which chronically constipated patients who met the Rome IV criteria(29) and had failed optimal treatments were enrolled. The majority of the patients included were patients with spinal cord injury. The sole focus of the present study is the population of spinal cord injury patients included in the study.

The primary objective was:

- to compare the impact of ACI performed by PEC with that of optimal medical management on the GIQLI (0 to 144 points, good quality of life if >121) for up to 1 year of follow-up.

The secondary objectives were:

- to evaluate the impact of ACI performed by PEC on neurological bowel dysfunction (assessed by the NBD score, 0 to 47 points: 0-6 = very minimal dysfunction; 7-9 = minimal dysfunction; 10-13 = moderate dysfunction; ≥ 14 = severe dysfunction), constipation (assessed by the Kess score, 0 to 39 points, ≥ 10 = constipation) and fecal incontinence (assessed by the Cleveland score, 0 to 20: 0-4 = minimal; 5-9 = moderate; 10-16 = important; 17-20 = severe incontinence) for up to 1 year of follow-up.
- to evaluate satisfaction about NBD management (numeric scale, from 0 to 10)
- to evaluate the tolerance of the device using a Pain Visual Analog Scale (VAS), with scores ranging from 0 to 10, at each follow-up visit in the PEC group,
- to record minor or serious adverse events in the two groups.

The inclusion criteria were as follows:

- Age from 18 to 75 years
- Chronic constipation defined according to the Rome IV classification
- Colonic transit time with radiopaque markers, indicating a transit time of at least 120 hours and/or an NBD (Neurogenic bowel dysfunction) score ≥ 14 (= severe dysfunction)
- Colonoscopy performed to eliminate a colorectal tumor or an inflammatory pathology
- GIQLI score < 121 and Kess questionnaire score >7 despite medical treatment of constipation, including taking a laxative (oral stimulant laxative and/or suppository and/or retrograde enema) more than once a week for at least two months.
- Written informed consent

The criteria for exclusion were:

- Severe obesity (BMI>40)
- History of colonic resection surgery
- Hypothyroidism, hydroelectrolytic disorder, insulin-dependent diabetes mellitus
- Acute decompensation of a depressive syndrome
- Immunosuppressive treatment
- Hemostasis disorders
- Pregnant or breastfeeding women
- Adults under legal protection
- Participation in another research protocol for the treatment of constipation

Patients were then randomized to either the “PEC group” or the “optimal medical treatment” group, which is defined as the “MED” group. Follow-up was performed for 12 months with an evaluation at M1, M3, M6, M9 and M12. In the MED group, all types of personalized medical solutions were allowed.

During the course of the study, recruitment difficulties related to the risk of randomization and exclusive management in the MED group were overcome by a secondary amendment to the protocol: MED group patients were secondarily switched to the PEC group after 12 months of follow-up. Some patients were therefore evaluated in both the MED and PEC groups (in this case again at M1, M3, M6, M9 and M12 after the PEC procedure). The characteristics of those patients, the “MED+PEC” group, are described in Table 1. They were included in the PEC group for the score analysis.

At each visit, patients completed the standardized questionnaires to obtain the GIQLI, the NBD score, the bowel management satisfaction score, the Kess score and the Cleveland score. Patients were also clinically evaluated for tolerance of the device (pain evaluation (VAS score ranging from 0 to 10) only in the PEC group) and the occurrence of adverse events.

The operating procedure for the placement of the Chait Trapdoor™ catheter was previously described by Duchalais et al. (24) (Fig. 1). Patients underwent ACI two weeks later, after a 48-72-hour hospitalization that included catheter handling education.

Statistical analysis:

Continuous variables are presented as medians and interquartile ranges, and categorical data are presented as counts and percentages. Missing data are described by treatment group.

Analyses were performed with SAS software, version 9.4 (SAS Institute Inc.). Type I error was set at $\alpha = 0.05$.

The primary endpoint, the GIQLI, was compared first between groups with Wilcoxon-Mann-Whitney nonparametric tests and then within groups with paired signed-rank tests (comparisons baseline vs. M1, M3, M6, M9 and M12).

The same comparisons are used for secondary endpoints: NBD score, overall satisfaction score, Kess constipation score and Cleveland score.

No imputation was performed for missing data on primary and secondary endpoints.

Because of the potential for type I error due to multiple comparisons and analysis in a subgroup (SCI group), findings for analyses should be interpreted as exploratory.

Results

We included 18 patients with spinal cord injury. Eight patients were randomized to the PEC group, and 10 patients were randomized to the MED group. One patient randomized in the MED group withdrew from the study after being put on lifetime anticoagulant treatment. Another patient randomized to the MED group withdrew her consent at M6. One patient initially randomized in the PEC group left the study after M6 because of poor tolerance of irrigation (autonomic dysreflexia during irrigation). The last 5 patients randomized to the MED group were allowed to switch to the PEC group after 12 months of initial follow-up (representing the “MED+PEC” group in Table 1), resulting in a total of 13 patients evaluated in the PEC group (12 full evaluations). The flow chart (Figure 2) shows a summary of these elements.

Table 1 shows the general and neurological characteristics of the patients. The majority of the patients were male (sex ratio 2/1). There were 6 with tetraplegia and 12 with paraplegia, including 11 with thoracic paraplegia and 1 with lumbosacral paraplegia. Ninety-four percent of the patients had an acquired SCI (n=17/18). Fifty-five percent of the lesions were of traumatic origin and mostly supra conal (88.8%).

All patients used their PEC every day or every other day, with a volume of lukewarm water between 750 ml and 1.250 L. The volume of water used varied according to the results obtained, and each patient managed his or her irrigation volumes independently or in agreement with his or her caregivers after learning the technique. Only one patient needed assistance from a caregiver to perform the irrigation.

Primary endpoint: effect of ACI on quality of life

GIQLI (Figure 3A)

Regarding the intergroup comparisons, the initial median GIQLI was 61.5 in the PEC group and 63 in the MED group (p=0.9439). The GIQLI was significantly increased in the PEC group when compared to that in the MED group at M1 (median 90.5 vs. 71, p=0.0127) and M6 (median 83.5 vs. 67, p=0.0253) but not at the other evaluations (median 80 vs. 64 at M3 p=0.1538; 73 vs. 68.5 at M9 p=0.3155; 83 vs. 71.5 at M12 p=0.1056).

For intragroup comparisons, we compared the initial GIQLI with that at each evaluation. In the PEC group, there was a significant increase from the initial GIQLI to that of the evaluations at M1 ($p=0.0234$), at M3 ($p=0.0156$) and M6 ($p=0.0078$) but not to the evaluations at M9 ($p=0.0625$) and M12 ($p=0.1094$). On the other hand, there was no significant increase from the initial GIQLI to those at the evaluations from M1 to M12 in the MED group. One patient in the PEC group had a normal GIQLI (GIQLI >121), whereas 0 in the MED group had a normal GIQLI.

Secondary endpoints: ACI and neurogenic bowel dysfunction

NBD score (Figure 3B)

Regarding the intergroup comparisons, the initial median NBD score was 22 in the PEC group and 22.5 in the MED group ($p=0.9018$). There was no significant difference in NBD score values at each evaluation between the two groups: at M1 (median 10.5 for PEC group vs. 17 for MED group, $p=0.0946$), at M3 (median 13 vs. 19, $p=0.2534$), at M6 (median 13 vs. 11, $p=0.8172$), at M9 (median 12 vs. 19, $p=0.1724$), or at M12 (median 13.5 vs. 14.5 $p=0.2922$).

For the intragroup comparisons, we compared the NBD score at each evaluation with the initial score. In the PEC group, the NBD score was significantly lower when comparing the initial score (median 22) with those obtained at M1 (median 10.5, $p=0.0078$), M3 (median 13, $p=0.0156$), M6 (median 13, $p=0.0156$), M9 (median 12, $p=0.0313$) and M12 (median 13.5, $p=0.0313$). In contrast, in the MED group, there was no significant decrease of the NBD score values at M1 to M12 compared with the initial NBD score. One **patient in the PEC group and 3 patients in the MED group** had normal NBD scores (NBD <7) at least once during the follow-up.

Kess score (Figure 3C)

Next, in intergroup comparisons, the median Kess constipation score was 25 at the time of inclusion in the PEC group and 27 in the MED group ($p=0.6472$). The median Kess score was significantly lower in the PEC group than that in the MED group at M1 (17 vs. 28.5, $p=0.0042$)

and at M12 (20 vs. 28, $p=0.0372$). This was not the case at the other visits; the median was 22 in the PEC group vs. 23 in the MED group ($p=0.1492$) at M3; 23 vs. 27 at M6 ($p=0.1153$); 18 vs. 26.5 at M9 ($p=0.0531$).

Regarding intragroup comparisons, the Kess score at each evaluation was compared to the initial score. In the PEC group, there was a significant decrease in the Kess score from the time of inclusion to M1 ($p=0.0234$) and M3 ($p=0.0391$) but not to M6 ($p=0.4375$), M9 ($p=0.1563$) or M12 ($p=0.5156$). On the other hand, in the MED group, there was no significant decrease between the initial Kess score and M1 to M12. Only **1 patient** in the PEC group had a normal Kess score (Kess < 10).

Cleveland score (Figure 3D)

The Cleveland score did not decrease significantly in either the intergroup comparisons at the successive follow-up visits or in the intragroup comparisons, nor between those obtained at the time of inclusion (median 11.5 in the PEC group and 14 in the MED group, $p=0.8587$) and follow-up visits at M1, M3, M6, M9, and M12.

Satisfaction

The overall satisfaction score for bowel dysfunction management started from a median of 5 (out of 10) in the PEC group at the time of inclusion and improved to 7 at M1, 7.5 at M3, 7 at M6, 8 at M9, and 8 at M12. In the MED group, the median satisfaction score started from 6.5 at the time of inclusion and increased to 6.5 at M1, 4 at M3, 4 at M6, 4 at M9, and 6 at M12. There was no significance for either group (data not shown).

Tolerance of ACI by PEC

Concerning pain associated with the device, the median VAS score was 0 [0; 2] 15 days after the PEC procedure and 3.5 [0; 5] at the M12 follow-up visit in the PEC group ($n=13$). Nine out of 13 patients reported pain $>3/10$ at least once; among these 9 patients, 4 had an incomplete SCI.

There were 23 adverse events in the PEC group ($n=13$ patients) and 8 adverse events in the MED group ($n=10$ patients). In the PEC group, 3 out of 23 were serious adverse events (1 case

of pneumoperitoneum after PEC and 2 rehospitalizations for fecal impaction). The other minor adverse events were some local skin complications (granuloma, skin lesion, etc.; n=5), some local device complications (serous leakage, device obstruction, accidental removal of catheter, etc.; n=9) and cases of constipation without the need for rehospitalization (n=6). In the MED group, 7 out of 8 were serious adverse events (7 rehospitalizations for fecal impaction, severe constipation, colonic evacuation), and 1 minor adverse event was linked to constipation without the need for rehospitalization.

Discussion

In our study, we reported an improvement in quality of life parameters in patients with spinal cord injury who underwent percutaneous endoscopic caecostomy. The tolerance of the device was overall very good, since only one patient among the 13 patients in the PEC group had it removed at M6. These data are better than those reported in the literature in which researchers report catheter removal in up to 39% of patients (24). The difference is probably due to moderate pain associated with sensory impairments among SCI patients. The number of adverse events was higher in the PEC group than in the MED group, but they were minor adverse events linked with the device. For the adverse events in the MED group, the majority were cases of severe constipation that necessitated rehospitalization. Rehospitalizations for severe constipation or evacuations of fecal impaction were three times less frequent in the PEC group than in the MED group.

The main objective of the study, whose initial design was intended for all types of chronic constipated patients, was based on the evaluation of the GIQLI score, which has not been validated in a population of spinal cord injury patients, but we found an improvement only in the PEC group, especially at the beginning of the study until M6. This "honeymoon" effect is similar to that already observed in other studies(23,24) on nonneurological constipated subjects.

The NBD score, on the other hand, has been validated in patients with SCI. The NBD score includes 10 items that are associated with quality of life (28); therefore, an improvement in NBD score indicates a better quality of life. We observed a significant improvement in the NBD score from the initial NBD score in the PEC group, which persisted over time, from M1 to M12. Other studies have reported similar improvement rates with antegrade irrigation via Malone surgery(30), but no study on PEC has focused exclusively on SCI patients. Some patients had a score below the threshold of minimal dysfunction (NBD of 0 to 6 = very minimal dysfunction). The numeric scale score for overall satisfaction of bowel management (score from 0 to 10) also improved but not significantly. Nevertheless, all 12 patients questioned about their willingness to continue or discontinue irrigation via their PEC at M12 said they wanted to continue.

However, we also note that the NBD score of the patients in the MED group also improved slightly but not significantly, thus reducing the gap between the values of the two groups

(hence the lack of significance between the values of the two groups on the different evaluations). It is likely that close follow-up during this period allowed better personalized bowel management of the patients in the MED group, as well as better listening during the consultations dedicated to assessing bowel problems.

The Kess score assessing constipation was also improved in the PEC group when compared with that of the MED group at the beginning of the follow-up, but less improved at the end, with the same "honeymoon" effect as for the GIQLI.

We did not find any significant improvement in the Cleveland incontinence score due to a large disparity in scores. Indeed, a minority of patients were bothered by incontinence at baseline, so it was not easy to show a difference, even though the median score also globally decreased. Other studies have also shown that an improvement in incontinence scores after irrigation was higher when the baseline score was high (31).

The therapeutic pyramid (12) for neurogenic bowel in patients with spinal cord injury currently places antegrade colonic irrigation via Malone surgery at the 3rd step, i.e., at the level of invasive measures (Figure 4A). In a recent guideline (32), expert consensus validated the contribution of antegrade irrigation in spinal cord injury patients. Considering that ease of placement, reversibility, good tolerance and efficacy are advantages of the percutaneous endoscopic technique, antegrade colonic irrigation via PEC could be placed among the minimally invasive therapeutic measures of the pyramid (Figure 4B: new proposition for the therapy pyramid).

For caregivers, another important point is that PEC makes administering enemas easier than transanal irrigation. It can also facilitate independence regarding bowel management, especially for patients with tetraplegia of the lower extremities when compared to transanal irrigation.

Conclusion

PEC is a technique that has its place in the management of neurogenic bowel dysfunction in patients with spinal cord injury. The study showed an improvement in the quality of life at the beginning of the irrigation, which was less evident after 12 months of follow-up, except for NBD score, which remained the most reliable score in spinal cord injury patients. We already know the importance of prolonged, holistic medical follow-up for patients with SCI. It is interesting to note that a follow-up specifically dedicated to bowel disorders of patients with spinal cord injury allows support and maintenance of the positive effect of different treatments.

PEC is a less invasive procedure than Malone surgery, and we validated its feasibility, tolerance and short- or medium-term efficacy in a population of spinal cord injury patients.

Références :

1. Perrouin-Verbe B, Lefevre C, Kieny P, Gross R, Reiss B, Le Fort M. Spinal cord injury: A multisystem physiological impairment/dysfunction. *Rev Neurol (Paris)*. mai 2021;177(5):594-605.
2. Anderson KD. Targeting Recovery: Priorities of the Spinal Cord-Injured Population. *J Neurotrauma*. oct 2004;21(10):1371-83.
3. Liu CW, Huang CC, Yang YH, Chen SC, Weng MC, Huang MH. Relationship between neurogenic bowel dysfunction and health-related quality of life in persons with spinal cord injury. *J Rehabil Med*. janv 2009;41(1):35-40.
4. Coggrave M, Norton C, Cody JD. Management of faecal incontinence and constipation in adults with central neurological diseases. *Cochrane Database Syst Rev*. 13 janv 2014;(1):CD002115.
5. Correa GI, Rotter KP. Clinical evaluation and management of neurogenic bowel after spinal cord injury. *Spinal Cord*. mai 2000;38(5):301-8.
6. Harari D, Sarkarati M, Gurwitz JH, McGlinchey-Berroth G, Minaker KL. Constipation-related symptoms and bowel program concerning individuals with spinal cord injury. *Spinal Cord*. juin 1997;35(6):394-401.
7. Krassioukov A, Warburton DE, Teasell R, Eng JJ. A Systematic Review of the Management of Autonomic Dysreflexia After Spinal Cord Injury. *Arch Phys Med Rehabil*. avr 2009;90(4):682-95.
8. Faaborg PM, Christensen P, Krassioukov A, Laurberg S, Frandsen E, Krogh K. Autonomic dysreflexia during bowel evacuation procedures and bladder filling in subjects with spinal cord injury. *Spinal Cord*. juin 2014;52(6):494-8.
9. Middleton JW, Lim K, Taylor L, Soden R, Rutkowski S. Patterns of morbidity and rehospitalisation following spinal cord injury. *Spinal Cord*. juin 2004;42(6):359-67.
10. Enck P, Greving I, Klosterhalfen S, Wietek B. Upper and lower gastrointestinal motor and sensory dysfunction after human spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 2006;152:373-84.
11. Johns J, Krogh K, Rodriguez GM, Eng J, Haller E, Heinen M, et al. Management of Neurogenic Bowel Dysfunction in Adults after Spinal Cord Injury: Clinical Practice Guideline for Health Care Providers. *Top Spinal Cord Inj Rehabil*. Spring 2021;27(2):75-151.
12. Emmanuel AV, Krogh K, Bazzocchi G, Leroi AM, Bremers A, Leder D, et al. Consensus review of best practice of transanal irrigation in adults. *Spinal Cord*. oct 2013;51(10):732-8.
13. Christensen P, Bazzocchi G, Coggrave M, Abel R, Hultling C, Krogh K, et al. A randomized, controlled trial of transanal irrigation versus conservative bowel management in spinal cord-injured patients. *Gastroenterology*. sept 2006;131(3):738-47.

14. Christensen P, Olsen N, Krogh K, Bacher T, Laurberg S. Scintigraphic assessment of retrograde colonic washout in fecal incontinence and constipation. *Dis Colon Rectum*. janv 2003;46(1):68-76.
15. Malone PS, Ransley PG, Kiely EM. Preliminary report: the antegrade continence enema. *Lancet Lond Engl*. 17 nov 1990;336(8725):1217-8.
16. Teichman JM, Harris JM, Currie DM, Barber DB. Malone antegrade continence enema for adults with neurogenic bowel disease. *J Urol*. oct 1998;160(4):1278-81.
17. Brinas P, Zalay N, Philis A, Castel-Lacanal E, Barrieu M, Portier G. Use of Malone antegrade continence enemas in neurologic bowel dysfunction. *J Visc Surg*. déc 2020;157(6):453-9.
18. Brindley GS. The first 500 patients with sacral anterior root stimulator implants: general description. *Paraplegia*. déc 1994;32(12):795-805.
19. Waddell O, McCombie A, Frizelle F. Colostomy and quality of life after spinal cord injury: systematic review. *BJS Open*. 27 août 2020;
20. Teichman JMH, Zabihi N, Kraus SR, Harris JM, Barber DB. Long-term results for Malone antegrade continence enema for adults with neurogenic bowel disease. *Urology*. mars 2003;61(3):502-6.
21. Elfeki H, Duelund-Jakobsen J, Christensen P. Chait trapdoor cecostomy catheter for treatment of intractable constipation - a video vignette. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel*. juin 2019;21(6):733.
22. Uno Y. Introducer method of percutaneous endoscopic cecostomy and antegrade continence enema by use of the Chait Trapdoor cecostomy catheter in patients with adult neurogenic bowel. *Gastrointest Endosc*. avr 2006;63(4):666-73.
23. Ricard J, Quénéhervé L, Lefevre C, Le Rhun M, Chabrun E, Duchalais-Dassonneville E, et al. Anterograde colonic irrigations by percutaneous endoscopic caecostomy in refractory colorectal functional disorders. *Int J Colorectal Dis*. janv 2019;34(1):169-75.
24. Duchalais E, Meurette G, Mantoo SK, Le Rhun M, Varannes SB des, Lehur PA, et al. Percutaneous endoscopic caecostomy for severe constipation in adults: feasibility, durability, functional and quality of life results at 1 year follow-up. *Surg Endosc*. mars 2015;29(3):620-6.
25. Hoy NY, Metcalfe P, Kiddoo DA. Outcomes following fecal continence procedures in patients with neurogenic bowel dysfunction. *J Urol*. juin 2013;189(6):2293-7.
26. Worsøe J, Christensen P, Krogh K, Buntzen S, Laurberg S. Long-term results of antegrade colonic enema in adult patients: assessment of functional results. *Dis Colon Rectum*. oct 2008;51(10):1523-8.

27. Eypasch E, Williams JJ, Wood-Dauphinee S, Ure BM, Schmülling C, Neugebauer E, et al. Gastrointestinal Quality of Life Index: development, validation and application of a new instrument. *Br J Surg.* févr 1995;82(2):216-22.
28. Krogh K, Christensen P, Sabroe S, Laurberg S. Neurogenic bowel dysfunction score. *Spinal Cord.* oct 2006;44(10):625-31.
29. Drossman DA, Hasler WL. Rome IV-Functional GI Disorders: Disorders of Gut-Brain Interaction. *Gastroenterology.* mai 2016;150(6):1257-61.
30. Yang CC, Stiens SA. Antegrade continence enema for the treatment of neurogenic constipation and fecal incontinence after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* mai 2000;81(5):683-5.
31. Brochard C, Peyronnet B, Hascoet J, Olivier R, Manunta A, Jezequel M, et al. Defecation disorders in Spina Bifida: Realistic goals and best therapeutic approaches. *Neurourol Urodyn.* févr 2019;38(2):719-25.
32. Kurze I, Geng V, Böthig R. Guideline for the management of neurogenic bowel dysfunction in spinal cord injury/disease. *Spinal Cord.* mai 2022;60(5):435-43.

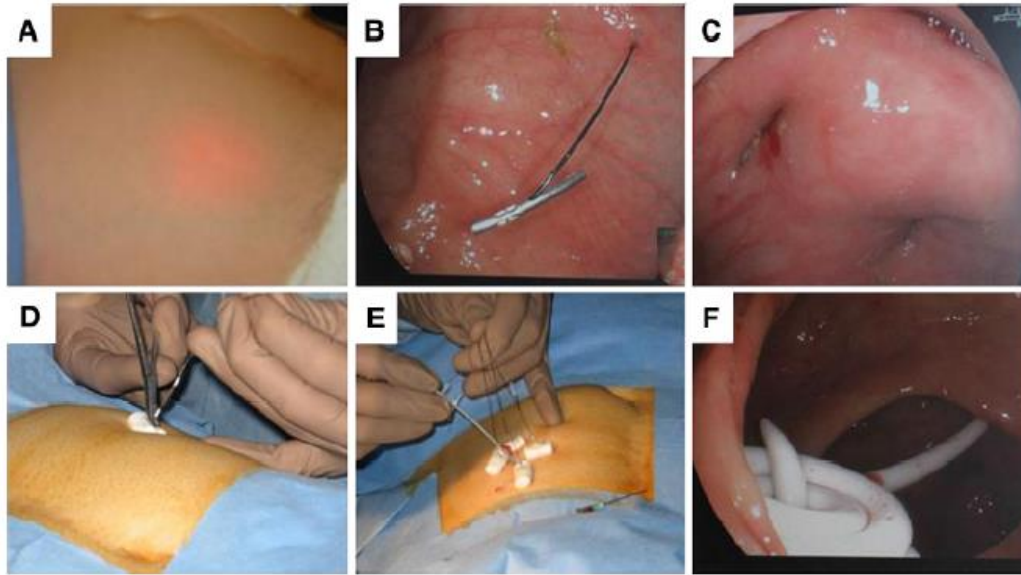


Figure 1 (Duchalais et al.(31)) : endoscopic placement of the Chait Trapdoor™ caecostomy catheter. The correct position is confirmed by caecal transillumination (A). Percutaneous metallic anchors, introduced under endoscopic control (B). Caecopexy ensured (C). Anchors are locked (D). Wireguide dilators are introduced (E) before the caecostomy catheter (F).

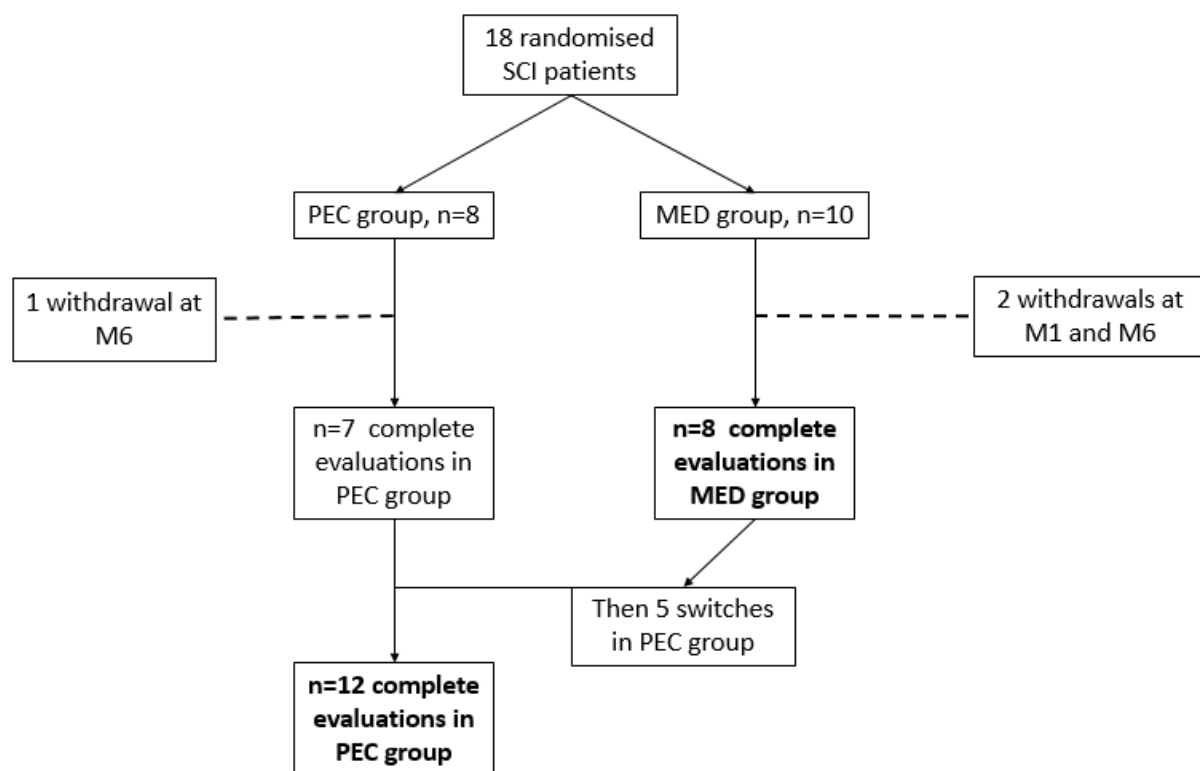


Figure 2 : Flow chart of the study

Initial group			PEC	MED	MED+PEC	Total
n=			8	5	5	18
Sex	male	n=	6	2	4	12
	female	n=	2	3	1	6
Age (years)	median [Q1;Q3]		40,5 [31;56,5]	43 [28;57]	57 [53;58]	48,5 [35;57]
Transit time (hours)	median [Q1;Q3]		86 [49;120]	137 [134 ; 144]	79 [38,6;100]	120 [79;136]
Etiology of the spinal cord injury						
	traumatic	n=	5	2	3	10
	non-traumatic	n=	3	3	2	8
Post-injury delay (years)	median [Q1;Q3]		18 [4;27]	4 [3;5]	25 [16;37]	12 [4;25]
Neurological level of injury						
	Cervical (C1-C8)	n=	2	2	2	6
	Thoracic (T1-T12)	n=	6	2	3	11
	Lumbosacral (L1-S5)	n=	0	1	0	1
AIS grade						
	A	n=	5	2	3	10
	B	n=	1	1	0	2
	C	n=	2	1	0	3
	D	n=	0	1	2	3
	E	n=	0	0	0	0
Reflex status						
	Areflexic	n=	1	1	0	2
	Reflexic	n=	7	4	5	16

Table 1 General and neurological characteristics of the patients.

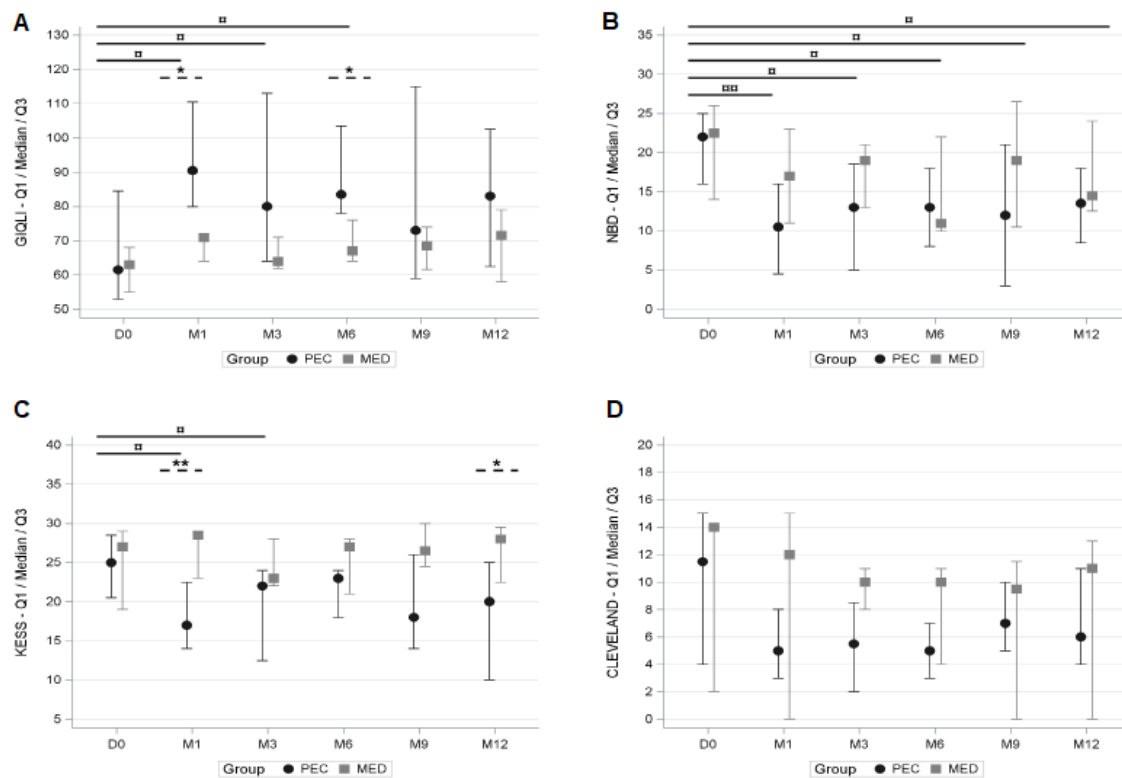


Figure 3: represents the median [Q1,Q3] GIQLI (GastroIntestinal Quality of Life Index) (**A**), NBD (Neurogenic Bowel Dysfunction) score (**B**), Kess score (**C**) and Cleveland score(**D**), in each group at inclusion and at each follow-up visit (M1, M3, M6, M9, and M12). Significance for $p < 0.05$: * between PEC group value versus MED group value (inter-group comparisons) and x between values within each group between inclusion and M1, M3, M6, M9, or M12 follow-up visit (intra-group comparisons).

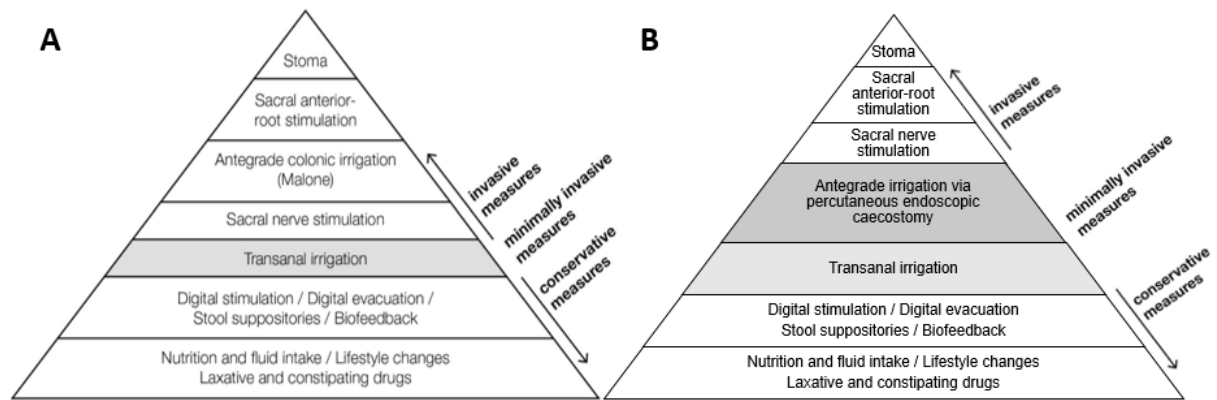


Figure 4 : Conventional therapy pyramid (A) (from ^(15,38)), for the management of neurogenic bowel dysfunction in spinal cord injuries ; and (B) this could be a new proposition of therapy pyramid with antegrade colonic irrigation at the second step, i.e. among the minimally invasive measures.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Notre travail de recherche a permis, en combinant des approches précliniques et translationnelles, de mettre en évidence des atteintes de l' « unité neuro-épithéliale » colique après lésion médullaire. Nos principaux résultats ont permis de mettre en évidence une atteinte régionalisée de cette unité neuro-épithéliale affectant différenciellement le côlon proximal et le côlon distal. En particulier, nous avons mis en évidence une modulation de l'expression de neuromédiateurs, caractérisée à la fois chez l'homme et l'animal par une diminution de la concentration en acétylcholine, sans modification de la concentration en VIP. Cette diminution de l'acétylcholine semble se produire dans les deux modèles (murin et Homme), principalement dans le côlon proximal. Enfin chez le rat, le nombre de neurones nNOS était diminué uniquement dans le plexus myentérique du côlon proximal des rats spinalisés. Cette dernière observation, confirmerait la seule étude de la littérature qui a montré une baisse de l'expression de nNOS (sur coupe histologique globale) de l'estomac jusqu'à l'iléon dans un modèle de rat (134). Chez l'Homme nous n'avons pas observé cette baisse de neurones nNOS dans le plexus sous-muqueux, peut-être à cause d'un manque de données expérimentales, ie nombre d'animaux étudiés, même s'il existait une tendance à la diminution. Néanmoins, d'un point de vue fonctionnel chez le rat, nous n'avons pas non plus mis en évidence de diminution de la composante nitrergique de la réponse neuromusculaire en motricité *ex vivo*. Cette absence d'impact pourrait soit confirmer l'absence d'atteinte de la composante nNOS, soit refléter simplement le fait que le muscle lisse longitudinal, étudié *in vitro*, est principalement innervé par une composante cholinergique.

Les mécanismes responsables/causaux impliqués dans le remodelage du phénotype entérique restent à ce jour inconnu mais pourraient impliquer par exemple, la perte de l'innervation du SNE par le système nerveux extrinsèque, qui entraînerait une modulation de l'expression neuronale entérique. En effet, cette perte de l'innervation pourrait conduire à une modulation de l'activité du SNE (sachant que le système parasympathique, à médiation principalement cholinergique, augmente l'activité neuronale, et que le système sympathique, à médiation principalement noradrénergique, inhibe l'activité neuronale) et ainsi moduler l'expression de certains gènes dans le SNE. En effet, des études ont montré que l'activité neuronale pouvait

réguler l'expression neuronale de la tyrosine hydroxylase ou du VIP dans le SNE (148). De plus, ces modifications des neuromédiateurs pourraient résulter de changements de composition du microbiote. En effet, il est rapporté dans la littérature, des modifications du microbiote après lésion médullaire, caractérisées par une perte du pool de bactéries productrices de butyrate, qui est un acide gras à chaîne courte (151). Cette diminution du butyrate pourrait, elle aussi, conduire à une diminution de la population neuronale cholinergique (149) et amplifier les troubles digestifs en diminuant la composante cholinergique (prokinétique) de la réponse neuromusculaire.

Bien que les troubles digestifs semblent affecter l'ensemble du colon (44), les mécanismes semblent être « organe-dépendants » avec une altération de la composante cholinergique plutôt dans le colon proximal et une atteinte plutôt sérotoninergique dans le colon distal. Ainsi dans le colon proximal, on observe une sorte de « double peine » dans le côlon proximal puisque non seulement l'acétylcholine est diminuée, mais aussi la réponse musculaire à des doses croissantes de betanéchol (agoniste cholinergique) est également diminuée dans le côlon proximal. Ces données ont été observées dans les deux modèles murins, rat et souris. A noter que Joo (119) et al. ont par contre montré une augmentation de la réponse contractile aux agonistes cholinergiques en motricité *ex vivo*, mais leur modèle était plus précoce (J7) et également avec une lésion de niveau plus bas (T11) que le nôtre. La cause de la perte de sensibilité du muscle à l'acétylcholine pourrait résulter d'une altération de l'expression de certains récepteurs muscariniques, ou de défauts de signalisation calcique au sein des cellules musculaires. Ces hypothèses restent à préciser dans la suite de ces travaux ainsi que leur validation chez l'homme.

D'autre part concernant le colon gauche chez l'Homme, nous avons mis en évidence un remodelage de la fonction endocrine de la BEI, caractérisé par une diminution de la concentration de 5-HT dans le côlon gauche spécifiquement associée à une augmentation de l'expression ARNm du récepteur de la sérotonine (SERT), qui potentiellement peut entraîner une réduction de biodisponibilité de la 5-HT. La sérotonine est connue, à des doses physiologiques, pour réguler la motricité digestive de façon positive (114). Aussi une diminution de la concentration de 5-HT et de sa biodisponibilité pourrait participer au ralentissement du transit dans le colon distal. De manière surprenante, nous avons aussi

observé une corrélation positive entre le taux de sérotonine et le temps de transit à gauche. Cette observation plutôt contre intuitive pourrait être interprétée comme une capacité d'« up-régulation » de la 5-HT chez les patients dont le transit est moins affecté. Une autre forme de réponse adaptative pourrait également se voir dans l'augmentation de l'expression de l'ARNm de TPH1 que nous avons observée, cette fois-ci dans le côlon droit et gauche. De manière intéressante, cette expression ARNm de TPH1 était positivement corrélée à l'expression ARNm de l'IL-1 β . Néanmoins, la capacité de l'IL1 β à réguler l'expression de TPH1 reste à démontrer.

Concernant la réponse inflammatoire intestinale, nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'inflammation digestive chez les patients blessés médullaires dans l'étude translationnelle, suggérant l'existence d'une inflammation de bas grade chez les patients, restant à être confirmée sur un effectif plus grand. En revanche dans le modèle de rat spinalisé, nous avons observé une diminution de la réponse inflammatoire, i.e. une diminution de l'expression ARNm de l'IL-1 β , IL-7, IL-10, TNF α , IFN γ and ICAM-1. La diminution de l'expression des cytokines de l'inflammation dans le modèle de rat, à 3 semaines post-lésion, pourrait être le reflet d'une immunodépression survenant juste après la phase aiguë de la lésion médullaire, alors que chez les patients, le délai post-lésion était supérieur à 5 ans donc ils étaient tous en phase chronique. Aussi, la temporalité des modifications observées (ainsi que probablement les traitements) semble donc être une notion à ne pas négliger, notamment en ce qui concerne les paramètres inflammatoires.

Enfin, une des données majeures de notre travail a permis de mettre en évidence des corrélations entre paramètres cliniques et biologiques principalement dans le côlon gauche entre les médiateurs inflammatoires (IL-1 β et TNF α) et le temps de transit colique gauche, suggérant une implication potentielle de l'inflammation comme un acteur des troubles digestifs et/ou du remodelage de l'unité neuro-épithéliale observés dans cette région. Ceci laisse entrevoir la possibilité de développer des approches thérapeutiques ciblées de manière organe-spécifique pour améliorer la dysfonction digestive chez patients. Le modèle préclinique de souris reproduisant les atteintes permettra de tester l'efficacité de ces approches avant de les tester chez l'homme.

Pour finir, notre étude clinique visant à démontrer l'efficacité de la caecostomie percutanée endoscopique, a eu des résultats positifs en terme de qualité de vie et d'amélioration des troubles digestifs ; de plus cela laisse entrevoir l'utilisation de cette approche d'irrigation antérograde comme outil pour délivrer localement et de manière ciblée les cibles thérapeutiques d'intérêt découvertes précédemment.

Notre travail reste à ce stade principalement descriptif et s'est limité à la caractérisation des atteintes du SNE et de ses fonctions. Il a permis de développer un modèle murin chronique de lésion médullaire, i.e. 4 semaines, qui est probablement un modèle d'interface entre la situation aiguë et chronique, mais qui permet de reproduire tout de même les grandes modifications observées chez patients, c'est-à-dire l'allongement du temps transit (Fecal Pellets Output et expulsion d'une bille intra-rectale), les modifications des neuromédiateurs, etc. Néanmoins, on observe des différences entre le modèle murin et l'Homme concernant l'immunité, qui peuvent refléter soit le maintien de l'immunosuppression suite à une lésion médullaire, soit des différences inter-espèces.

Concernant le mécanisme responsable de la régionalisation des différences, il reste à expliquer. D'une part, ces différences peuvent refléter les différences physiologiques inter-organes (côlon droit-gauche) déjà présentes en physiologie et le fait que le stress (c'est-à-dire la lésion médullaire) induirait une réponse différentielle selon l'organe. Elles peuvent aussi refléter les conséquences de l'innervation différentielle entre côlon droit et gauche par les systèmes sympathique et parasympathique : dans le côlon droit, l'innervation parasympathique se fait par le nerf vague et l'innervation sympathique via le ganglion mésentérique supérieur (T9-T12) ; dans le côlon gauche l'innervation parasympathique provient du centre parasympathique sacré S2-S4, et le sympathique du ganglion mésentérique inférieur (T12-L2). Ainsi une lésion médullaire >T8 aura une préservation de l'innervation colique parasympathique au niveau du colon droit via le nerf vague, alors que le parasympathique sacré n'innervera plus le colon gauche, le centre sympathique thoracolumbal non plus, ni à droite ni à gauche. Une lésion plus basse (par exemple en T11 ou T12) entraînera une perte de l'innervation parasympathique sacrée et sympathique thoracolumbale seulement au niveau du colon gauche. La perte d'acétylcholine pourrait aussi être considérée comme un mécanisme adaptatif suite à la perte de l'innervation sympathique

post-lésion médullaire, pour contrecarrer un tonus cholinergique (parasymphatique, via le nerf vague) accru.

Concernant l'atteinte du SNE, nous avons vu que l'inflammation par exemple peut moduler l'activité neuronale ou l'expression des neuromédiateurs (156) du SNE. Il reste à préciser si ces modifications du SNE observées après lésion médullaire sont associées à une mort neuronale, ou simplement à une modulation de l'expression des neuromédiateurs par l'inflammation par exemple. Nos données préliminaires, effectuées sur biopsies coliques humaines suggèrent dans le côlon gauche une perte de neurones entériques, mais ces résultats devront être confortés par plus de données. Dans cet objectif, j'ai pu déposer un projet de biopsies coliques nommé TENS-SCI en réponse à l'appel d'offre interne du CHU de Nantes. Cet appel d'offre me permettra de poursuivre nos recherches chez l'Homme blessé médullaire pour continuer d'explorer le remodelage du SNE, caractériser l'atteinte de la BEI (perméabilité par exemple), et en particulier confirmer les atteintes des voies sérotoninergiques au niveau du colon gauche.

Concernant la perte de tonus cholinergique, il nous reste à déterminer son implication dans les troubles digestifs, mais cela pourrait représenter une cible thérapeutique d'intérêt. En effet, bien que l'effet prokinétique de l'acétylcholine serait potentiellement utilisable, il aurait un effet miroir inverse sur l'hyperactivité du détrusor. Aussi, l'utilisation d'approches visant à moduler localement l'expression de l'acétylcholine en particulier via un apport local de butyrate (qui permet d'augmenter la production d'acétylcholine et de neurones cholinergiques dans le SNE (149,150)) par exemple via une caecostomie percutanée endoscopique, représenterait un intérêt.

De plus, cette approche via le butyrate pourrait aussi permettre de cibler une autre composante altérée dans notre étude chez l'homme, i.e. la composante entéroendocrine. En effet, des études ont montré que les acides gras à chaîne courte augmentent la production de 5-HT par les cellules entérochromaffines (157). Nous avons observé une diminution de 5-HT uniquement dans le côlon gauche, et une augmentation franche de l'expression ARNm de TPH1 à droite comme à gauche, ainsi qu'une diminution du SERT à gauche seulement. Il reste à démontrer pour l'heure si cette diminution de 5-HT contribue bien à la diminution de l'activité motrice, en particulier si un stimulus de distension conduit bien à une libération

insuffisante de 5-HT par les cellules entérochromaffines. Si oui, la proposition d'utiliser le butyrate pour augmenter la production de 5-HT serait aussi intéressante dans ce contexte. Alternativement, la capacité d'augmenter la biodisponibilité ou de faire un ciblage par les agonistes 5-HT₄ présenterait un intérêt potentiel (ceci a déjà été fait dans la littérature avec des effets positifs (118) mais également trop d'effets secondaires qui limitent sa pratique clinique). Pour pallier à ces effets secondaires, le développement de la voie d'administration locale colique directe par caecostomie percutanée endoscopique pourrait être d'un intérêt particulier.

Nous n'avons par ailleurs pas pu mettre en évidence d'atteinte de la BEI en terme de perméabilité, bien que les données chez l'animal (dans le modèle murin) suggèrent une potentielle augmentation de perméabilité dans le côlon proximal et pas dans le distal. Ces résultats doivent être confirmés dans un groupe plus large de population. De plus, ceci pourrait traduire aussi le fait qu'il existe potentiellement une atteinte précoce de la BEI qui ensuite se rétablirait avec le temps. C'est pour cela qu'une étude longitudinale de la BEI pourrait présenter un réel intérêt.

Nos données suggèrent par ailleurs que des atteintes inflammatoires existent potentiellement mais sont moins importantes que dans d'autres pathologies motrices (par exemple dans la maladie de Parkinson où l'on retrouve une forte augmentation des médiateurs inflammatoires...). L'intensité des modifications inflammatoires après une lésion médullaire pourraient plutôt s'apparenter à celles des patients atteints de constipation dans le cadre d'un syndrome de l'intestin irritable. Les données de la littérature suggèrent que l'inflammation serait plus importante à la phase aiguë, puis reviendrait proche de son niveau de base à la phase chronique post-lésion.

Dans ce contexte, le rôle du microbiote intestinal et sa contribution dans la genèse des symptômes reste à déterminer. En effet, différentes études ont mis en évidence des modifications du microbiote intestinal chez les blessés médullaires (151–155). Néanmoins son rôle comme acteur des troubles digestifs après lésion médullaire reste aussi à mieux comprendre tant sur le remodelage du SNE (au vu des effets connus du microbiote sur le SNE), des fonctions de la BEI, que sur l'inflammation. Dans ce contexte, afin d'avoir une vision dynamique de la mise en place des modifications du microbiote et de l'impact sur l'évolution des symptômes, nous avons démarré la constitution d'une biocollection reliée à la première

cohorte française de patients atteints de lésion médullaire (COhort in Spinal Cord Injury : Nantes follow-Up Standardization i.e. COSCINUS). Il s'agit d'une cohorte prospective longitudinale de patients atteints de lésion médullaire suivis depuis la lésion, tous les mois (3 premiers mois), puis à 6 mois, 1 an, et tous les ans. Cette cohorte comprend : des données cliniques regroupant les datasets internationaux des lésions de la moelle épinière (ISNCSCI), représentant des ensembles de données cliniques validées au niveau international et liées à chaque organe ou système atteint ; des échelles fonctionnelles spécifiques aux lésions de la moelle épinière ; et des questionnaires de qualité de vie.

Cette cohorte est associée à une biocollection comprenant des échantillons sanguins (biomarqueurs immunitaires, inflammatoires et de gravité des lésions), une biocollection urinaire et fécale, qui nous permettra d'avoir accès à des données dynamiques concernant les modifications du microbiote au cours du temps. La cohorte a débuté le 1er avril 2021, au sein du service de MPR Neurologique. Si nous pouvons l'associer à notre cohorte de biopsies coliques TENS SCI, nous aurons une base de données exhaustive qui va nous permettre de répondre sur les différents aspects et aussi dans le temps, aux questions posées.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis de confirmer nos hypothèses de recherche qui étaient l'existence d'un remodelage au niveau du SNE et de la BEI après lésion médullaire. Nos projets à venir nous permettront je l'espère de progresser encore, tant sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques des troubles digestifs des patients blessés médullaires, que sur nos pratiques cliniques grâce à l'identification de plusieurs cibles thérapeutiques potentielles.

Références

1. A global picture of Spinal cord injury. International perspectives of Spinal Cord Injury. World health Organization 2013. Chapter 2: 11-32.
2. Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, Donovan W, Graves DE, Jha A, et al. International standards for neurological classification of spinal cord injury (Revised 2011). *J Spinal Cord Med.* nov 2011;34(6):535-46.
3. ASIA and ISCoS International Standards Committee. The 2019 revision of the International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury (ISNCSCI)-What's new? *Spinal Cord.* oct 2019;57(10):815-7.
4. Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, Nouri A, Fehlings MG. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin Epidemiol.* 2014;6:309-31.
5. Perrouin-Verbe B, Lefevre C, Kieny P, Gross R, Reiss B, Le Fort M. Spinal cord injury: A multisystem physiological impairment/dysfunction. *Rev Neurol (Paris).* mai 2021;177(5):594-605.
6. Kumar R, Lim J, Mekary RA, Rattani A, Dewan MC, Sharif SY, et al. Traumatic Spinal Injury: Global Epidemiology and Worldwide Volume. *World Neurosurg.* mai 2018;113:e345-63.
7. Albert T, Ravaud JF, Tetrafigap group. Rehabilitation of spinal cord injury in France: a nationwide multicentre study of incidence and regional disparities. *Spinal Cord.* juin 2005;43(6):357-65.
8. Noonan VK, Fingas M, Farry A, Baxter D, Singh A, Fehlings MG, et al. Incidence and prevalence of spinal cord injury in Canada: a national perspective. *Neuroepidemiology.* 2012;38(4):219-26.
9. National Spinal Cord Injury Statistical Center, Facts and Figures at a Glance. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham, 2020.
10. Biering-Sørensen F, Biering-Sørensen T, Liu N, Malmqvist L, Wecht JM, Krassioukov A. Alterations in cardiac autonomic control in spinal cord injury. *Auton Neurosci Basic Clin.* janv 2018;209:4-18.
11. Eckert MJ, Martin MJ. Trauma: Spinal Cord Injury. *Surg Clin North Am.* oct 2017;97(5):1031-45.
12. Chen D, Apple DF, Hudson LM, Bode R. Medical complications during acute rehabilitation following spinal cord injury--current experience of the Model Systems. *Arch Phys Med Rehabil.* nov 1999;80(11):1397-401.

13. Eldahan KC, Rabchevsky AG. Autonomic dysreflexia after spinal cord injury: Systemic pathophysiology and methods of management. *Auton Neurosci Basic Clin.* janv 2018;209:59-70.
14. DiMarco AF, Onders RP, Ignagni A, Kowalski KE, Mortimer JT. Phrenic nerve pacing via intramuscular diaphragm electrodes in tetraplegic subjects. *Chest.* févr 2005;127(2):671-8.
15. Hackler RH. A 25-year prospective mortality study in the spinal cord injured patient: comparison with the long-term living paraplegic. *J Urol.* avr 1977;117(4):486-8.
16. Courtois FJ, Charvier KF, Leriche A, Raymond DP, Eyssette M. Clinical approach to erectile dysfunction in spinal cord injured men. A review of clinical and experimental data. *Spinal Cord.* nov 1995;33(11):628-35.
17. Denys P, Chartier-Kastler E, Even A, Joussain C. How to treat neurogenic bladder and sexual dysfunction after spinal cord lesion. *Rev Neurol (Paris).* mai 2021;177(5):589-93.
18. Sipski ML, Alexander CJ, Rosen RC. Orgasm in women with spinal cord injuries: A laboratory-based assessment. *Arch Phys Med Rehabil.* déc 1995;76(12):1097-102.
19. Perrouin-Verbe B, Courtois F, Charvier K, Giuliano F. [Sexuality of women with neurologic disorders]. *Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol.* juill 2013;23(9):594-600.
20. Lynch AC, Anthony A, Dobbs BR, Frizelle FA. Anorectal physiology following spinal cord injury. *Spinal Cord.* oct 2000;38(10):573-80.
21. Coggrave M, Norton C, Cody JD. Management of faecal incontinence and constipation in adults with central neurological diseases. *Cochrane Database Syst Rev.* 13 janv 2014;(1):CD002115.
22. Johns J, Krogh K, Rodriguez GM, Eng J, Haller E, Heinen M, et al. Management of Neurogenic Bowel Dysfunction in Adults after Spinal Cord Injury: Clinical Practice Guideline for Health Care Providers. *Top Spinal Cord Inj Rehabil.* Spring 2021;27(2):75-151.
23. Kurze I, Geng V, Böthig R. Guideline for the management of neurogenic bowel dysfunction in spinal cord injury/disease. *Spinal Cord.* mai 2022;60(5):435-43.
24. Beuret-Blanquart F, Weber J, Gouverneur JP, Demangeon S, Denis P. Colonic transit time and anorectal manometric anomalies in 19 patients with complete transection of the spinal cord. *J Auton Nerv Syst.* juill 1990;30(3):199-207.
25. Ng C, Prott G, Rutkowski S, Li Y, Hansen R, Kellow J, et al. Gastrointestinal symptoms in spinal cord injury: relationships with level of injury and psychologic factors. *Dis Colon Rectum.* août 2005;48(8):1562-8.
26. Krogh K, Nielsen J, Djurhuus JC, Mosdal C, Sabroe S, Laurberg S. Colorectal function in patients with spinal cord lesions. *Dis Colon Rectum.* oct 1997;40(10):1233-9.

27. Vallès M, Vidal J, Clavé P, Mearin F. Bowel dysfunction in patients with motor complete spinal cord injury: clinical, neurological, and pathophysiological associations. *Am J Gastroenterol.* oct 2006;101(10):2290-9.
28. Nielsen SD, Faaborg PM, Finnerup NB, Christensen P, Krogh K. Ageing with neurogenic bowel dysfunction. *Spinal Cord.* août 2017;55(8):769-73.
29. Liu CW, Huang CC, Chen CH, Yang YH, Chen TW, Huang MH. Prediction of severe neurogenic bowel dysfunction in persons with spinal cord injury. *Spinal Cord.* juill 2010;48(7):554-9.
30. Faaborg PM, Christensen P, Finnerup N, Laurberg S, Krogh K. The pattern of colorectal dysfunction changes with time since spinal cord injury. *Spinal Cord.* mars 2008;46(3):234-8.
31. Tate DG, Forchheimer M, Rodriguez G, Chiodo A, Cameron AP, Meade M, et al. Risk Factors Associated With Neurogenic Bowel Complications and Dysfunction in Spinal Cord Injury. *Arch Phys Med Rehabil.* oct 2016;97(10):1679-86.
32. Stone JM, Nino-Murcia M, Wolfe VA, Perlash I. Chronic gastrointestinal problems in spinal cord injury patients: a prospective analysis. *Am J Gastroenterol.* sept 1990;85(9):1114-9.
33. Amarenco G, Denys P, Soler J, Perrouin-Verbe B, Previnaire J, Garnier L. Etude de la prévalence des symptômes loco-régionaux chez les patients souffrant de troubles coloproctaux (constipation et/ou incontinence fécale) d'origine neurologique. *Congrès SIFUD-PP.* 2010;1.
34. Coggrave M, Norton C, Wilson-Barnett J. Management of neurogenic bowel dysfunction in the community after spinal cord injury: a postal survey in the United Kingdom. *Spinal Cord.* avr 2009;47(4):323-30; quiz 331-3.
35. Middleton JW, Lim K, Taylor L, Soden R, Rutkowski S. Patterns of morbidity and rehospitalisation following spinal cord injury. *Spinal Cord.* juin 2004;42(6):359-67.
36. Faaborg PM, Christensen P, Krassioukov A, Laurberg S, Frandsen E, Krogh K. Autonomic dysreflexia during bowel evacuation procedures and bladder filling in subjects with spinal cord injury. *Spinal Cord.* juin 2014;52(6):494-8.
37. Lance JW. What is spasticity? *Lancet Lond Engl.* 10 mars 1990;335(8689):606.
38. Klotz R, Joseph PA, Ravaud JF, Wiart L, Barat M, Tetrafigap Group. The Tetrafigap Survey on the long-term outcome of tetraplegic spinal cord injured persons: Part III. Medical complications and associated factors. *Spinal Cord.* sept 2002;40(9):457-67.
39. Lynch AC, Frizelle FA. Colorectal motility and defecation after spinal cord injury in humans. *Prog Brain Res.* 2006;152:335-43.

40. Liu CW, Huang CC, Yang YH, Chen SC, Weng MC, Huang MH. Relationship between neurogenic bowel dysfunction and health-related quality of life in persons with spinal cord injury. *J Rehabil Med.* janv 2009;41(1):35-40.
41. Anderson KD. Targeting Recovery: Priorities of the Spinal Cord-Injured Population. *J Neurotrauma.* oct 2004;21(10):1371-83.
42. Emmanuel A. Managing neurogenic bowel dysfunction. *Clin Rehabil.* juin 2010;24(6):483-8.
43. Frost FS. Role of rehabilitation after spinal cord injury. *Urol Clin North Am.* août 1993;20(3):549-59.
44. Emmanuel A. Neurogenic bowel dysfunction. *F1000Research.* 28 oct 2019;8:F1000 Faculty Rev-1800.
45. Brochard C, Peyronnet B, Hascoet J, Olivier R, Manunta A, Jezequel M, et al. Defecation disorders in Spina Bifida: Realistic goals and best therapeutic approaches. *Neurourol Urodyn.* févr 2019;38(2):719-25.
46. Glickman S, Kamm MA. Bowel dysfunction in spinal-cord-injury patients. *Lancet Lond Engl.* 15 juin 1996;347(9016):1651-3.
47. Coggrave MJ, Norton C. The need for manual evacuation and oral laxatives in the management of neurogenic bowel dysfunction after spinal cord injury: a randomized controlled trial of a stepwise protocol. *Spinal Cord.* juin 2010;48(6):504-10.
48. Heaton KW, Radvan J, Cripps H, Mountford RA, Braddon FE, Hughes AO. Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: a prospective study. *Gut.* juin 1992;33(6):818-24.
49. Krogh K, Christensen P, Sabroe S, Laurberg S. Neurogenic bowel dysfunction score. *Spinal Cord.* oct 2006;44(10):625-31.
50. Krogh K, Emmanuel A, Perrouin-Verbe B, Korsten MA, Mulcahey MJ, Biering-Sørensen F. International spinal cord injury bowel function basic data set (Version 2.0). *Spinal Cord.* juill 2017;55(7):692-8.
51. Knowles CH, Eccersley AJ, Scott SM, Walker SM, Reeves B, Lunniss PJ. Linear discriminant analysis of symptoms in patients with chronic constipation: validation of a new scoring system (KESS). *Dis Colon Rectum.* oct 2000;43(10):1419-26.
52. Wexner SD. Further validation of the Wexner Incontinence Score: A note of appreciation and gratitude. *Surgery.* juill 2021;170(1):53-4.
53. Danquechin Dorval E, Barbieux JP, Picon L, Alison D, Codjovi P, Rouleau P. [Simplified measurement of colonic transit time by one radiography of the abdomen and a single type of marker. Normal values in 82 volunteers related to the sexes]. *Gastroenterol Clin Biol.* 1994;18(2):141-4.

54. Singh G, Thomas DG. Bowel problems after enterocystoplasty. *Br J Urol.* mars 1997;79(3):328-32.
55. Emmanuel AV, Krogh K, Bazzocchi G, Leroi AM, Bremers A, Leder D, et al. Consensus review of best practice of transanal irrigation in adults. *Spinal Cord.* oct 2013;51(10):732-8.
56. Han TR, Kim JH, Kwon BS. Chronic gastrointestinal problems and bowel dysfunction in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord.* juill 1998;36(7):485-90.
57. Cardenas DD, Hoffman JM, Kirshblum S, McKinley W. Etiology and incidence of rehospitalization after traumatic spinal cord injury: a multicenter analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* nov 2004;85(11):1757-63.
58. Christensen P, Bazzocchi G, Coggrave M, Abel R, Hultling C, Krogh K, et al. A randomized, controlled trial of transanal irrigation versus conservative bowel management in spinal cord-injured patients. *Gastroenterology.* sept 2006;131(3):738-47.
59. Christensen P, Olsen N, Krogh K, Bacher T, Laurberg S. Scintigraphic assessment of retrograde colonic washout in fecal incontinence and constipation. *Dis Colon Rectum.* janv 2003;46(1):68-76.
60. Del Popolo G, Mosiello G, Pilati C, Lamartina M, Battaglini F, Buffa P, et al. Treatment of neurogenic bowel dysfunction using transanal irrigation: a multicenter Italian study. *Spinal Cord.* juill 2008;46(7):517-22.
61. Worsøe J, Rasmussen M, Christensen P, Krogh K. Neurostimulation for neurogenic bowel dysfunction. *Gastroenterol Res Pract.* 2013;2013:563294.
62. Brindley GS. The first 500 patients with sacral anterior root stimulator implants: general description. *Paraplegia.* déc 1994;32(12):795-805.
63. Kutzenberger J. Surgical therapy of neurogenic detrusor overactivity (hyperreflexia) in paraplegic patients by sacral deafferentation and implant driven micturition by sacral anterior root stimulation: methods, indications, results, complications, and future prospects. *Acta Neurochir Suppl.* 2007;97(Pt 1):333-9.
64. Rasmussen MM, Kutzenberger J, Krogh K, Zepke F, Bodin C, Domurath B, et al. Sacral anterior root stimulation improves bowel function in subjects with spinal cord injury. *Spinal Cord.* avr 2015;53(4):297-301.
65. Vallès M, Rodríguez A, Borau A, Mearin F. Effect of sacral anterior root stimulator on bowel dysfunction in patients with spinal cord injury. *Dis Colon Rectum.* mai 2009;52(5):986-92.
66. Negosanti L, Sgarzani R, Linguerrri R, Vetrone G, Liotta S, Bazzocchi G, et al. « Imola-Montecatone » subtotal colectomy to improve bowel management in spinal cord injury patients. Retrospective analysis in 19 cases. *Spinal Cord Ser Cases.* 7 juill 2020;6(1):59.
67. Branagan G, Tromans A, Finnis D. Effect of stoma formation on bowel care and quality of life in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord.* déc 2003;41(12):680-3.

68. Boucher M, Dukes S, Bryan S, Branagan G. Early Colostomy Formation Can Improve Independence Following Spinal Cord Injury and Increase Acceptability of Bowel Management. *Top Spinal Cord Inj Rehabil.* 2019;25(1):23-30.
69. Malone PS, Ransley PG, Kiely EM. Preliminary report: the antegrade continence enema. *Lancet Lond Engl.* 17 nov 1990;336(8725):1217-8.
70. Kelly MS, Wiener JS, Liu T, Patel P, Castillo H, Castillo J, et al. Neurogenic bowel treatments and continence outcomes in children and adults with myelomeningocele. *J Pediatr Rehabil Med.* 2020;13(4):685-93.
71. Duchalais E, Meurette G, Mantoo SK, Le Rhun M, Varannes SB des, Lehur PA, et al. Percutaneous endoscopic caecostomy for severe constipation in adults: feasibility, durability, functional and quality of life results at 1 year follow-up. *Surg Endosc.* mars 2015;29(3):620-6.
72. Ricard J, Quénéhervé L, Lefevre C, Le Rhun M, Chabrun E, Duchalais-Dassonneville E, et al. Anterograde colonic irrigations by percutaneous endoscopic caecostomy in refractory colorectal functional disorders. *Int J Colorectal Dis.* janv 2019;34(1):169-75.
73. Brinas P, Zalay N, Philis A, Castel-Lacanal E, Barrieu M, Portier G. Use of Malone antegrade continence enemas in neurologic bowel dysfunction. *J Visc Surg.* déc 2020;157(6):453-9.
74. Hoy NY, Metcalfe P, Kiddoo DA. Outcomes following fecal continence procedures in patients with neurogenic bowel dysfunction. *J Urol.* juin 2013;189(6):2293-7.
75. Martini FH, Ober WC, Bartholomew EF, Nath JL, Bélanger H, Mayrand M, et al. La biologie humaine: une approche visuelle. Montreuil, France, Canada: Pearson; 2015. 845 p.
76. Ducrotté P. Motricité du côlon et du rectum Colonic and anorectal motility in health. *EMC - Hépatogastroentérologie Volume 2, Issue 3, July 2005, Pages 177-188.* 2005;
77. Christensen J, Stiles MJ, Rick GA, Sutherland J. Comparative anatomy of the myenteric plexus of the distal colon in eight mammals. *Gastroenterology.* avr 1984;86(4):706-13.
78. Stiens SA, Bergman SB, Goetz LL. Neurogenic bowel dysfunction after spinal cord injury: clinical evaluation and rehabilitative management. *Arch Phys Med Rehabil.* mars 1997;78(3 Suppl):S86-102.
79. Leroi AM, Le Normand L. [Physiology of the anal and urinary sphincter apparatus for continence]. *Progres En Urol J Assoc Francaise Urol Soc Francaise Urol.* févr 2005;15(1):123-48.
80. Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol.* 2014;817:39-71.
81. Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* avr 2004;16 Suppl 1:55-9.

82. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 6 mars 2012;9(5):286-94.
83. Brading AF, Ramalingam T. Mechanisms controlling normal defecation and the potential effects of spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 2006;152:345-58.
84. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*. 3 juill 2000;81(1-3):87-96.
85. Spencer NJ, Dinning PG, Brookes SJ, Costa M. Insights into the mechanisms underlying colonic motor patterns. *J Physiol*. 1 août 2016;594(15):4099-116.
86. Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, des Varannes SB, Rolli-Derkinderen M. The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. févr 2013;10(2):90-100.
87. Vergnolle N, Cirillo C. Neurons and Glia in the Enteric Nervous System and Epithelial Barrier Function. *Physiol Bethesda Md*. 1 juill 2018;33(4):269-80.
88. Smith TK, Koh SD. A model of the enteric neural circuitry underlying the generation of rhythmic motor patterns in the colon: the role of serotonin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1 janv 2017;312(1):G1-14.
89. Dariel A, Grynberg L, Auger M, Lefèvre C, Durand T, Aubert P, et al. Analysis of enteric nervous system and intestinal epithelial barrier to predict complications in Hirschsprung's disease. *Sci Rep*. 10 déc 2020;10(1):21725.
90. Iantorno G, Bassotti G, Kogan Z, Lumi CM, Cabanne AM, Fisogni S, et al. The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon. *Am J Surg Pathol*. mars 2007;31(3):460-8.
91. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*. déc 2003;15(6):763-70.
92. Bonis V, Rossell C, Gehart H. The Intestinal Epithelium - Fluid Fate and Rigid Structure From Crypt Bottom to Villus Tip. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:661931.
93. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. nov 2009;9(11):799-809.
94. France MM, Turner JR. The mucosal barrier at a glance. *J Cell Sci*. 15 janv 2017;130(2):307-14.
95. Turner JR. « Putting the squeeze » on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol*. août 2000;11(4):301-8.
96. Ménard S, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol*. mai 2010;3(3):247-59.

97. Schoultz I, Keita ÅV. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*. 17 août 2020;9(8):E1909.
98. Choi W, Yeruva S, Turner JR. Contributions of intestinal epithelial barriers to health and disease. *Exp Cell Res*. 1 sept 2017;358(1):71-7.
99. Fasano A. Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;915:214-22.
100. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 8 nov 2012;491(7423):254-8.
101. Araújo JR, Tomas J, Brenner C, Sansonetti PJ. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie*. oct 2017;141:97-106.
102. He C, Yu T, Shi Y, Ma C, Yang W, Fang L, et al. MicroRNA 301A Promotes Intestinal Inflammation and Colitis-Associated Cancer Development by Inhibiting BTG1. *Gastroenterology*. mai 2017;152(6):1434-1448.e15.
103. Suenaeert P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. août 2002;97(8):2000-4.
104. Schwiertz A, Spiegel J, Dillmann U, Grundmann D, Bürmann J, Faßbender K, et al. Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. mai 2018;50:104-7.
105. Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Coron E, Bourreille A, Le Dily S, Vavasseur F, et al. Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 10 mars 2015;3:12.
106. Köhler CA, Maes M, Slyepchenko A, Berk M, Solmi M, Lanctôt KL, et al. The Gut-Brain Axis, Including the Microbiome, Leaky Gut and Bacterial Translocation: Mechanisms and Pathophysiological Role in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des*. 2016;22(40):6152-66.
107. Camara-Lemarroy CR, Metz L, Meddings JB, Sharkey KA, Wee Yong V. The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain J Neurol*. 1 juill 2018;141(7):1900-16.
108. Sturm A, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 21 janv 2008;14(3):348-53.
109. Portela-Gomes GM. Chromogranin A immunoreactivity in neuroendocrine cells in the human gastrointestinal tract and pancreas. *Adv Exp Med Biol*. 2000;482:193-203.
110. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in

ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. juin 2004;126(7):1657-64.

111. Öhman L, Törnblom H, Simrén M. Crosstalk at the mucosal border: importance of the gut microenvironment in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. janv 2015;12(1):36-49.
112. Bulbring E, Crema A. The release of 5-hydroxytryptamine in relation to pressure exerted on the intestinal mucosa. *J Physiol*. 23 avr 1959;146(1):18-28.
113. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. janv 2007;132(1):397-414.
114. Bertrand PP, Kunze WA, Furness JB, Bornstein JC. The terminals of myenteric intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig ileum are excited by 5-hydroxytryptamine acting at 5-hydroxytryptamine-3 receptors. *Neuroscience*. 2000;101(2):459-69.
115. Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin Signaling in the Gastrointestinal Tract: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. août 2013;10(8):473-86.
116. Costedio MM, Coates MD, Brooks EM, Glass LM, Ganguly EK, Blaszyk H, et al. Mucosal serotonin signaling is altered in chronic constipation but not in opiate-induced constipation. *Am J Gastroenterol*. mai 2010;105(5):1173-80.
117. Hoffman JM, Tyler K, MacEachern SJ, Balemba OB, Johnson AC, Brooks EM, et al. Activation of colonic mucosal 5-HT(4) receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity. *Gastroenterology*. avr 2012;142(4):844-854.e4.
118. Krogh K, Jensen MB, Gandrup P, Laurberg S, Nilsson J, Kerstens R, et al. Efficacy and tolerability of prucalopride in patients with constipation due to spinal cord injury. *Scand J Gastroenterol*. avr 2002;37(4):431-6.
119. Margolis KG, Cryan JF, Mayer EA. The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology*. avr 2021;160(5):1486-501.
120. Reigstad CS, Salmonson CE, Rainey JF, Szurszewski JH, Linden DR, Sonnenburg JL, et al. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. avr 2015;29(4):1395-403.
121. Callaghan B, Furness JB, Pustovit RV. Neural pathways for colorectal control, relevance to spinal cord injury and treatment: a narrative review. *Spinal Cord*. mars 2018;56(3):199-205.
122. Holmes GM, Van Meter MJ, Beattie MS, Bresnahan JC. Serotonergic fiber sprouting to external anal sphincter motoneurons after spinal cord contusion. *Exp Neurol*. mai 2005;193(1):29-42.
123. Chung EAL, Emmanuel AV. Gastrointestinal symptoms related to autonomic dysfunction following spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 2006;152:317-33.

124. White AR, Holmes GM. Anatomical and Functional Changes to the Colonic Neuromuscular Compartment after Experimental Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 1 mai 2018;35(9):1079-90.
125. Dothel G, Barbaro MR, Boudin H, Vasina V, Cremon C, Gargano L, et al. Nerve fiber outgrowth is increased in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. mai 2015;148(5):1002-1011.e4.
126. Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Transl Res J Lab Clin Med*. juill 2013;162(1):1-15.
127. Rao M, Gershon MD. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. sept 2016;13(9):517-28.
128. Qualls-Creekmore E, Tong M, Holmes GM. Time-course of recovery of gastric emptying and motility in rats with experimental spinal cord injury. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc*. janv 2010;22(1):62-9, e27-28.
129. Joo MC, Kim YS, Choi ES, Oh JT, Park HJ, Lee MY. Changes in the muscarinic receptors on the colonic smooth muscles of rats with spinal cord injury. *Ann Rehabil Med*. oct 2011;35(5):589-98.
130. Bai C hong, Ma X long. [The effects of sacral nerve root electrostimulation on the colon function and its mechanisms in a rat model of spinal cord injury]. *Chin J Appl Physiol*. janv 2016;32(1):34-8.
131. Frias B, Phillips AA, Squair JW, Lee AHX, Laher I, Krassioukov AV. Reduced colonic smooth muscle cholinergic responsiveness is associated with impaired bowel motility after chronic experimental high-level spinal cord injury. *Auton Neurosci Basic Clin*. janv 2019;216:33-8.
132. den Braber-Ymker M, Lammens M, van Putten MJAM, Nagtegaal ID. The enteric nervous system and the musculature of the colon are altered in patients with spina bifida and spinal cord injury. *Virchows Arch*. 1 févr 2017;470(2):175-84.
133. White AR, Werner CM, Holmes GM. Diminished enteric neuromuscular transmission in the distal colon following experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*. sept 2020;331:113377.
134. Kabatas S, Yu D, He XD, Thatte HS, Benedict D, Hepgul KT, et al. Neural and anatomical abnormalities of the gastrointestinal system resulting from contusion spinal cord injury. *Neuroscience*. 17 juill 2008;154(4):1627-38.
135. Besecker EM, Deiter GM, Pironi N, Cooper TK, Holmes GM. Mesenteric vascular dysregulation and intestinal inflammation accompanies experimental spinal cord injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1 janv 2017;312(1):R146-56.

136. O'Connor G, Jeffrey E, Madorma D, Marcillo A, Abreu MT, Deo SK, et al. Investigation of Microbiota Alterations and Intestinal Inflammation Post-Spinal Cord Injury in Rat Model. *J Neurotrauma*. 15 sept 2018;35(18):2159-66.
137. Bazzocchi G, Turrone S, Bulzamini MC, D'Amico F, Bava A, Castiglioni M, et al. Changes in gut microbiota in the acute phase after spinal cord injury correlate with severity of the lesion. *Sci Rep*. 17 juin 2021;11(1):12743.
138. Li J, Morrow C, Barnes S, Wilson L, Womack ED, McLain A, et al. Gut Microbiome Composition and Serum Metabolome Profile Among Individuals With Spinal Cord Injury and Normal Glucose Tolerance or Prediabetes/Type 2 Diabetes. *Arch Phys Med Rehabil*. avr 2022;103(4):702-10.
139. Valido E, Bertolo A, Fränkl GP, Itodo OA, Pinheiro T, Pannek J, et al. Systematic review of the changes in the microbiome following spinal cord injury: animal and human evidence. *Spinal Cord*. avr 2022;60(4):288-300.
140. Bannerman CA, Douchant K, Sheth PM, Ghasemlou N. The gut-brain axis and beyond: Microbiome control of spinal cord injury pain in humans and rodents. *Neurobiol Pain Camb Mass*. juill 2021;9:100059.
141. Liu X, Liang F, Zhang J, Li Z, Yang J, Kang N. Hyperbaric Oxygen Treatment Improves Intestinal Barrier Function After Spinal Cord Injury in Rats. *Front Neurol*. 15 oct 2020;11:563281.
142. Liu X, Liang F, Song W, Diao X, Zhu W, Yang J. Effect of Nrf2 signaling pathway on the improvement of intestinal epithelial barrier dysfunction by hyperbaric oxygen treatment after spinal cord injury. *Cell Stress Chaperones*. mars 2021;26(2):433-41.
143. Liu J, An H, Jiang D, Huang W, Zou H, Meng C, et al. Study of bacterial translocation from gut after paraplegia caused by spinal cord injury in rats. *Spine*. 15 janv 2004;29(2):164-9.
144. Bai CH, Liu H, Li SY, Peng P, Ning LN. [The protective effects of sacral nerve electrostimulation on intestinal mucosal mechanical barrier in rats with spinal cord injury]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi Chin J Appl Physiol*. sept 2014;30(5):471-4.
145. Bai CH, Zhang WL, Hu SZ. [Sacral nerve stimulating on intestinal mucosal immune barrier function of rats with acute complete spinal cord injury]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi Chin J Appl Physiol*. nov 2020;36(6):539-43.
146. Aimetti AA, Kirshblum S, Curt A, Mobley J, Grossman RG, Guest JD. Natural history of neurological improvement following complete (AIS A) thoracic spinal cord injury across three registries to guide acute clinical trial design and interpretation. *Spinal Cord*. sept 2019;57(9):753-62.

147. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. mai 2006;23(5):635-59.
148. Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P, et al. Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol*. 1 avr 2008;586(7):1963-75.
149. Soret R, Chevalier J, De Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, Segain JP, et al. Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology*. mai 2010;138(5):1772-82.
150. Suply E, de Vries P, Soret R, Cossais F, Neunlist M. Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 15 juin 2012;302(12):G1373-1380.
151. Gungor B, Adiguzel E, Gursel I, Yilmaz B, Gursel M. Intestinal Microbiota in Patients with Spinal Cord Injury. *PloS One*. 2016;11(1):e0145878.
152. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. déc 2020;113(12):2019-40.
153. Faber W, Stolwijk-Swuste J, van Ginkel F, Nachtegaal J, Zoetendal E, Winkels R, et al. Faecal Microbiota in Patients with Neurogenic Bowel Dysfunction and Spinal Cord Injury or Multiple Sclerosis-A Systematic Review. *J Clin Med*. 9 avr 2021;10(8):1598.
154. Jing Y, Bai F, Yu Y. Spinal cord injury and gut microbiota: A review. *Life Sci*. 1 févr 2021;266:118865.
155. Zhang C, Zhang W, Zhang J, Jing Y, Yang M, Du L, et al. Gut microbiota dysbiosis in male patients with chronic traumatic complete spinal cord injury. *J Transl Med*. 13 déc 2018;16(1):353.
156. Sharkey KA, Kroese AB. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat Rec*. 2001 Jan 1;262(1):79-90.
157. Mitsui R, Ono S, Karaki S, Kuwahara A. Neural and non-neural mediation of propionate-induced contractile responses in the rat distal colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2005 Aug;17(4):585-94.

Titre : Remodelage du système nerveux entérique et de la barrière épithéliale intestinale après lésion médullaire.

Mots clés : lésion médullaire, système nerveux entérique (SNE), barrière épithéliale intestinale (BEI), troubles digestifs d'origine neurologique

Résumé : Les lésions de la moelle épinière entraînent des déficiences multiples, dont des troubles digestifs invalidants, alliant constipation et incontinence. Ces troubles ont des conséquences à la fois physiques avec de multiples complications locorégionales et générales ; et à la fois des conséquences psychologiques avec une altération majeure de la qualité de vie à cause des troubles digestifs. Bien que les patients considèrent la prise en charge de leurs troubles digestifs comme une priorité parmi leurs autres déficiences, la physiopathologie de ces déficiences digestives est assez mal connue. La première partie de la thèse a pour but de synthétiser les déficiences multi-systèmes des blessés médullaires avec un focus sur les troubles digestifs et leur prise en charge.

La seconde partie décrit le fonctionnement du SNE et de la BEI, et présente une revue de littérature sur les modifications connues de ces deux éléments après lésion médullaire. La troisième partie présente nos résultats, d'abord dans deux modèles murins de lésion médullaire permettant une approche fondamentale puis dans une étude translationnelle à partir de biopsies digestives humaines afin d'identifier les acteurs du remodelage du SNE et de la BEI. Puis une dernière étude clinique met en évidence l'intérêt d'une nouvelle technique thérapeutique, la caecostomie percutanée endoscopique, qui pourrait également devenir un moyen d'administration locorégionale de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles mises en évidence dans nos études fondamentales.

Title : Remodeling of the enteric nervous system and of the intestinal epithelial barrier after spinal cord injury.

Keywords : spinal cord injury, enteric nervous system (ENS), intestinal epithelial barrier (IEB), neurogenic bowel dysfunction.

Abstract : Spinal cord injury leads to multiple impairments, including disabling digestive disorders, combining constipation and incontinence. These disorders have both physical consequences with multiple locoregional and general complications; and psychological consequences with a major alteration of the quality of life due to digestive disorders. Although patients consider the management of their digestive disorders as a priority among their other impairments, the pathophysiology of these digestive disorders is not well known. The first part of the thesis aims to summarize the multi-system impairments of spinal cord injury patients with a focus on digestive disorders and their management.

The second part describes the functioning of the ENS and the IEB, and presents a review of the literature on their known modifications after spinal cord injury. The third part presents our results, first in two murine models of SCI allowing a fundamental approach, then in a translational study using human digestive biopsies in order to identify the actors of the remodeling of the ENS and the IEB. Then a last clinical study highlights the interest of a new therapeutic technique, i.e. the percutaneous endoscopic caecostomy, which could also become a means of locoregional administration of new potential therapeutic targets highlighted in our fundamental studies.