

Thèse de Doctorat

Marième NDJIM

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Physiologie et biologie moléculaire*
Spécialité : *Physiologie Nutrition*

Unités de recherche : *INRA UMR 1280 PhAN Physiopathologie des Adaptations Nutritionnelles*

INSERM UMR 1235 TENS The Enteric Nervous System in gut and brain disorders

Soutenu le *12 Décembre 2017*

Nutrition périnatale et axe intestin-cerveau: rôle de la fonction CCKergique dans le « sensing » nutritionnel intestinal et la prise alimentaire chez le rat

JURY

Président :	Dominique DARMAUN Professeur des universités et praticien hospitalier, INRA UMR 1280, Université de Nantes
Rapporteurs :	André BADO , Directeur de recherche, INSERM UMR 1149, Université Paris Diderot Christophe MAGNAN , Professeur des universités, CNRS UMR 8251, Université Paris Diderot
Examineurs :	Nicolas DARCEL , Maître de conférences, UMR 914, Agro Paris Tech Dominique DARMAUN Professeur des universités et praticien hospitalier, INRA UMR 1280, Université de Nantes
Directeur de Thèse :	Michel NEUNLIST , Directeur de recherche, INSERM UMR 1235, Université de Nantes
Co-encadrante de thèse :	Gwenola LE DREAN , Chargée de recherche, INRA UMR 1280, Université de Nantes

*Always shoot for the moon. Even if
you miss you will land among the
stars. (Oscar WILDE)*

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé dans le cadre du projet PARIMAD par la Région Pays de la Loire, l'INRA et la fondation LCL.

Je tiens tout d'abord à remercier Madame la Docteur Patricia Parnet et le Professeur Dominique DARMAUN pour m'avoir accueillie au sein de l'unité INRA UMR 1280 PHAN. Merci Patricia pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour avoir bien voulu relire notre article publié dans *Frontiers in Endocrinology*. Merci aussi à Dominique pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse malgré un emploi du temps chargé.

Mes remerciements vont au Docteur Michel NEUNLIST, mon directeur de thèse pour son encadrement et pour m'avoir ouvert les portes de son unité INSERM UMR 1235 TENS. Merci également pour le temps accordé à réfléchir sur nos protocoles expérimentaux, votre expertise et pour avoir fait avancer le projet.

Un grand merci à madame la Docteur Gwenola LE DREAN pour tout son soutien et sa disponibilité au cours de ces trois dernières années. Au-delà de l'encadrement tes nombreuses qualités humaines, ta douceur, ton sens de l'écoute et ta patience m'ont énormément marquée. Travailler avec toi a été une très belle expérience et à travers ces quelques lignes je ne saurais te témoigner toute ma gratitude pour la confiance que tu m'as accordée et pour m'avoir donnée l'occasion de poursuivre en thèse. Je te remercie de m'avoir encadrée chaque jour sans relâche et ceci jusqu'au bout et de m'avoir transmis ton bagage scientifique. J'aurais énormément appris avec toi tant sur le plan humain que scientifique et je t'en remercie.

Je remercie chaleureusement Messieurs les Docteurs André BADO et Christophe MAGNAN pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je remercie également Monsieur le Docteur Nicolas DARCEL pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Je vous remercie tous pour l'intérêt porté à ce travail de thèse.

Aux chercheurs et ingénieurs, merci à tous pour votre disponibilité, votre sympathie et pour toutes les discussions animées et intéressantes.

Merci Aurélie pour ton aide au cytomètre de flux et pour ta gentillesse. Merci Pierre pour m'avoir toujours aidée dans les manip en chambre d'Ussing et au cours des « abattages ». Merci aussi pour ton sens de l'écoute et tes encouragements. A Philippe, merci

pour ta disponibilité, grâce à toi les manips en chambre de Ussing n'ont plus de secret pour moi. Merci à toi Geneviève pour m'avoir toujours facilitée la tâche avec toutes les démarches administratives.

Mes remerciements vont à tous les techniciens du labo. Sans vous ce travail n'aurait pu se faire. Merci d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions. Isabelle, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et pour les manips que tu as réalisées au cours de ces dernières semaines (entre nous j'avoue que la microscopie ce n'est pas trop mon truc). Tu m'auras été d'une grande aide. Agnès, merci pour ta sollicitude, arrivée le matin au labo en sachant que tu seras là pour me demander si je vais bien, m'a toujours mis du baume au cœur. Grâce à toi se lever tôt pour venir travailler ne m'a jamais paru être une corvée. Anthony, merci pour avoir réalisé les manips de génotypage, ton expertise en PCR et tes conseils. Martine, je te remercie pour les comptages de cellules, pour ta gentillesse, ta sollicitude et surtout pour le temps que tu as consacré à la relecture de ma thèse. Christian, bien que tu ne fasses plus partie du labo je ne saurais rédiger ces remerciements sans te témoigner ma profonde reconnaissance pour ta patience, ta disponibilité plus que pour m'avoir initiée au western blot. Blandine, merci pour avoir fait avancer ce projet alors même que je n'étais pas encore arrivée et pour la prise en charge du modèle transgénique. Guillaume, merci infiniment pour avoir compris que je n'étais pas spécialement à l'aise avec les animaux et pour avoir toujours été là pour prendre le relais.

Ce projet n'aurait pu avancer sans l'aide des nombreuses stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : Rose, Louise et Chloé vous m'avez appris à prendre sur moi, à être compréhensive et pédagogue. Vous avez participé à la réussite de ce projet et je vous en remercie. Je ne doute pas que vous réussirez quelle que soit la voie que vous aurez choisie.

Un grand merci à toute l'équipe « open space » (doctorants, stagiaires, et jeunes chercheurs) qui sont passés par ce labo: A Charlotte, merci pour avoir été ma co-labo durant ces trois dernières années, organiser et planifier des sorties labo avec toi aura été la partie la plus agréable de ces trois années de thèse, merci pour m'avoir écouté râler, pfffer, me plaindre de tout et de rien, merci pour ta bonne humeur contagieuse. Axel, je te remercie infiniment pour ton bon cœur et pour avoir égayé mes journées. Ces quelques mots ne suffiront jamais à exprimer toute mon affection à ton égard. Anne Lise ma « pitchounette d'amour », je te remercie pour ta gentillesse, les bisous au vent et les petits cœurs sur mon bureau. Marine, Diane, Julie et Morgane je vous remercie pour votre sympathie, votre

gentillesse et votre bonne humeur. Bien sûr je n'oublie pas les N+1. Nico, tes petits mots d'encouragement et ta gentillesse m'ont toujours fait chaud au cœur. Romuald, je te remercie pour tes discussions enrichissantes, ta sollicitude et ta gentillesse.

A toutes mes connaissances sénégalaises, je vous dis merci pour avoir fait de ces années à Nantes mes plus belles années en France. A Fanta, merci pour ton amitié, ton bon cœur et pour les balades au château et nos sorties kebab. Ramatoulaye et Ndiémé je vous remercie pour nos fous rires, votre sollicitude, tous les bons repas et les moments de palabre à la sénégalaise. A ma « team thérapie » merci d'avoir toujours été là. A Ndeye Khady, Coumba, Denise, Nafissa, Aicha et Anita je vous dis merci pour les encouragements.

Je ne saurais clore ces remerciements sans quelques mots à ma famille. Je remercie particulièrement mes parents qui se préoccupent toujours pour moi. A maman merci pour les discussions animées du dimanche matin, pour tes prières et tes encouragements. A papa merci pour toute la peine que tu te donnes pour ma réussite et d'être aussi attachant. Malgré mon caractère vous me supportez et me portez au plus haut. Je vous dois tout et j'espère que vous êtes fiers de moi. A Fatoumata, merci pour avoir toujours pris soin de moi depuis mon arrivée en France jusqu'à aujourd'hui, pour tes encouragements, ta présence et pour avoir dépensé sans compter. A Aminata merci d'être aussi pleine de vie, de prendre soin des parents, d'être mon amie love et ma conseillère. A mes frères je vous dis merci pour les encouragements.

A Mansour, mon amour, loin des yeux mais toujours près du cœur, merci pour m'avoir encouragée à me lancer dans cette thèse. Malgré les hauts et les bas tu as toujours su être là. J'aurai appris à tes côtés, à être humble, surtout moins orgueilleuse et beaucoup plus souriante autant de qualité qui m'auront servi pour cette thèse. Merci pour toutes ces années.

A Kadidia, ma sœur ma meilleure amie merci d'avoir fait du mot « cholecystokinine » ton mot préféré depuis trois ans. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu fais pour moi. Merci de me faire oublier mes soucis. Merci d'être toujours présente, d'avoir aussi bon cœur, pour tout l'amour que tu me portes, pour tes encouragements et de toujours parler de moi et de ma thèse avec fierté.

A toute l'équipe de l'unité INRA UMR PhAN 1280, encore merci. Je quitte le labo pour une nouvelle aventure mais avec vous tous dans le cœur !

Dieureudieuf

COMMUNICATION SCIENTIFIQUE

Publications

Article 1

Ndjim M., Poinsignon C., Parnet P., Le Dréan G. Loss of vagal sensitivity to cholecystokinin in rats born with intrauterine growth retardation and consequence on food intake *Frontiers in endocrinology* 8, 65. doi: 10.3389/fendo.2017.00065.

Article 2

Ndjim M., Aubert P., de Coppet P., Tesson L., Rémy S, Bonnet C, Neunlist M., Le Dréan G., Perinatal protein restriction in rats promotes palmitoleate sensing by duodenal enteroendocrine cells, but leads to increased-intestinal permeability

(En cours de préparation pour soumission à Neurogastroenterology and motility)

Article 3

Ndjim M., Grit I., Mériaux R., Falcon L., Segain JP, Tesson L., Rémy S., Le Drean G. Maternal protein restriction increases duodenal enteroendocrine cells in young rats.

(En cours de préparation)

Article 4

Aubert P., Oleynikova E., Rizvi R., Ndjim M., Le Berre-Scoul C., Grohard PA., Chevalier J., Segain JP., Le Drean., Neunlist M., Boudin H. Maternal protein restriction induced digestive dysfunctions and enteric nervous system remodeling in rat offspring

(En cours de préparation pour soumission à Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology)

Communications orales

Ndjim M, Poinsignon C, Parnet P, Le Dréan G. Intrauterine growth restriction (IUGR) induces a loss of vagal sensitivity to cholecystokinin. *Journées scientifiques de l'école doctorale biologie santé, Nantes, Décembre 2014.*

Ndjim M., Aubert P., de Coppet P., Grit I., Bonnet C., Poupeau G., Neunlist M, Le Drean G. Le retard de croissance intra-utérin favorise une sensibilité aux effets satiétogènes du

palmitoléate chez le rat jeune adulte. *Journée scientifique Jeunes Chercheurs de l'IMAD (Institut des maladies de l'appareil digestif) Nantes, Juin 2015.*

Ndjim M., de Coppet P., Grit I., Bonnet C., Poupeau G., Neunlist M, Le Drean G. Effet d'un retard de croissance intra-utérin sur la fonction de "sensing nutritionnel" intestinal chez le rat adulte. *3^{ème} colloque de la Société Francophone sur les Origines Développementales, Environnementales et Epigénétiques de la Santé et des Maladies (SF DOHaD) Paris, Décembre 2016.*

Ndjim M., Aubert P., de Coppet P., Grit I., Bonnet C., Poupeau G., Neunlist M, Le Drean G. Intrauterine growth retardation in rats promotes palmitoleate sensing by duodenal enteroendocrine cells, leading to increased-intestinal permeability. *NeuroGASTRO, European Society of Neurogastroenterology and Motility (ESNM) Cork, Irlande, Août 2017.*

Ndjim M., de Coppet P., Tesson L., Rémy S., Le Drean G.. Effet d'une dénutrition périnatale sur le sensing nutritionnel chez le rat. *Journées francophones de nutrition, Nantes, Décembre 2017*

Communications affichées

Ndjim M., Aubert P., de Coppet P., Grit I., Bonnet C., Poupeau G., Neunlist M, Le Drean G. Intrauterine growth retardation (IUGR) alters intestinal long chain fatty acid sensing in young rats. *RegPep, International Regulatory Peptide Society, Rouen, Juillet 2016.*

Ndjim M., Mériaux R., Falcon L., Segain JP, Tesson L., Rémy S., Le Drean G. Maternal protein restriction increases duodenal enteroendocrine cells in young rats. *10^{ème} congrès international DOHaD, Rotterdam, Pays-Bas, Octobre 2017.*

Ndjim M., Aubert P., de Coppet P., Grit I., Bonnet C., Poupeau G., Neunlist M, Le Drean G. Maternal protein restriction in young rats alters long chain fatty acid sensing by duodenal entero-endocrine cells, leading to increased-intestinal permeability. *10^{ème} congrès international DOHaD, Rotterdam, Octobre 2017.*

SOMMAIRE

SOMMAIRE

RESUME	17
ABSTRACT	18
ABREVIATIONS.....	20
LISTE DES FIGURES.....	25
LISTE DES TABLEAUX	27
AVANT PROPOS	29
INTRODUCTION GENERALE	32
INTRODUCTION : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	37
CHAPITRE I : ORIGINE DEVELOPPEMENTALE DE LA SANTE ET DES MALADIES	39
1- Théorie de l'origine développementale de la santé et des maladies	39
a- Programmations fœtale et postnatale : le phénotype économe.....	39
b- Principales données épidémiologiques qui ont donné naissance à la théorie du DOHaD	42
2- Retard de croissance intra-utérin.....	44
a- Aspects cliniques et prévalence du retard de croissance intra-utérin.....	44
b- Facteurs de risques du retard de croissance intra-utérin.....	45
c- Prise en charge des nouveau-nés avec un petit poids à la naissance : le rattrapage de	
croissance.....	46
d- Conséquences à l'âge adulte d'un petit poids de naissance	47
3- Modèles animaux de retard de croissance intra-utérin	49
a- Modèles d'hypoxie	49
b- Modèles nutritionnels	50
CHAPITRE II : PROGRAMMATION DE L'AXE INTESTIN-CERVEAU	52
1- Régulation de la prise alimentaire par l'axe intestin cerveau.....	53
a- Intestin : premier acteur de la régulation de la PA par l'axe intestin - cerveau.....	54
b- Nerf vague afférent : principal relais de l'axe intestin-cerveau.....	57
c- Tronc cérébral : relais intégrateur des signaux afférents.....	59
d- Hypothalamus : centre régulateur homéostatique de la prise alimentaire	61
2- Programmation des centres hypothalamiques	62
3- Programmation du nerf vague	64
CHAPITRE III : PROGRAMMATION DE LA FONCTION ENDOCRINE INTESTINALE ?.....	65
1- Programmation fœtale de l'intestin : des données issues des modèles animaux nés avec un	
RCIU.....	65
2- Cellules entéro-endocrines : une composante de la muqueuse intestinale elle-même	
programmable	67

a-	Cellules entéro-endocrines : un organe diffus au sein de l'épithélium intestinal.....	67
b-	Nomenclature évolutive grâce aux modèles transgéniques de Knock-In	68
c-	Programmation de l'intestin endocrine : des données indirectes et/ou éparses	71
3-	Renouvellement des CEE adultes : une cible potentielle de la PM.....	72
4-	Intestin endocrine : un acteur majeur du « sensing » nutritionnel.....	75
a-	Plusieurs populations de cellules détectent le glucose et contribuent à l'effet incrétine .	77
b-	CEE et sensibilité aux acides aminés expriment le récepteur au Ca (CaSR)	80
c-	Expression d' une batterie de GPCR spécifiques des acides gras au niveau des CEE	80
d-	Fonction de « sensing nutritionnel » des CEE peut-elle être une cible de la programmation métabolique?	85
5-	Système nerveux entérique : relais de l'intestin endocrine dans la fonction de « sensing » nutritionnel ?	86
a-	Composition et fonction du système nerveux entérique.....	86
b-	Sensibilité du SNE aux métabolites bactériens.....	88
c-	Interaction entre CEE et SNE : Les CEE interagissent-elles avec le SNE pour transmettre le signal nutritionnel/peptidergique vers le vague?	89
6-	Les circuits et le codage chimique des neurones du SNE sont-ils programmables ?	91
	HYPOTHESES.....	95
	STRATEGIES	97
	MODELE EXPERIMENTAL.....	100
	RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	103
	RESULTATS 1 ^{ère} PARTIE : PROGRAMMATION NUTRITIONNELLE DES CELLULES ENTEROENDOCRINES	105
	ARTICLE 1:	105
	Maternal protein restriction increases duodenal density of cholecystokinin-producing enteroendocrine cells in young rats (<i>En cours de préparation</i>)	105
	RESULTATS 2 ^{ème} PARTIE : PROGRAMMATION DE LA FONCTION DE « SENSING » NUTRITIONNEL INTESTINAL	136
	ARTICLE 2:	136
	Perinatal protein restriction in rats promotes cholecystokinin-mediated fatty acid sensing, but leads to increased-intestinal permeability (<i>En cours de préparation pour soumission dans Neurogastroenterology and motility</i>).	136
	RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET DISCUSSIONS.....	171
	La restriction protéique maternelle n'affecte pas le « sensing » du palmitate	171
	Les effets d'une restriction protéique maternelle sur le « sensing nutritionnel » ne perdurent pas à l'âge adulte	175

La restriction protéique maternelle serait à l'origine d'un défaut d'absorption et/ou de métabolisme de ces AGCL	182
RESULTATS 3 ^{ème} PARTIE : PROGRAMMATION DU NERF VAGUE	187
ARTICLE 3:	187
Loss of Vagal sensitivity to cholecystokinin in rats born with intrauterine growth retardation and consequence on Food intake (Frontiers in endocrinology 8, 65. doi: 10.3389/fendo.2017.00065.).....	187
DISCUSSION GENERALE	201
Les cellules entéro-endocrines sont-elles programmables ?	201
La fonction de « sensing » nutritionnel des CEE est-elle programmable ?.....	205
Le nerf vague afférent est-il programmable ?	209
CONCLUSION	214
REFERENCES	221
ANNEXE : ARTICLE SUPPLEMENTAIRE	262
ARTICLE 4:	262
Maternal protein restriction induced digestive dysfunctions and enteric nervous system remodeling in rat offspring (En cours de préparation pour soumission dans Cellular and molecular gastroenterology and hepatothology).....	262

RESUME

Un environnement nutritionnel périnatal délétère est à l'origine d'une programmation métabolique conduisant à un risque accru de développer un syndrome métabolique à l'âge adulte. Chez le rat, une dénutrition protéique maternelle induit une hyperphagie au cours du développement postnatal, et des défauts de satiété persistent à l'âge adulte. Ainsi, la composante homéostatique du comportement alimentaire reposant sur l'intégration centrale des signaux gastro-intestinaux pourrait être dérégulée. Cet axe intestin-cerveau implique les cellules entéro-endocrines (CEE) sécrétrices de peptides satiétogènes tels que la cholécystokinine (CCK) dont les effets sont médiés par le nerf vague et probablement le système nerveux entérique (SNE). L'objectif de cette thèse était de déterminer chez le rat l'impact d'une dénutrition périnatale sur: (i) la régulation vagale de la prise alimentaire par la CCK (ii) la maturation et la fonction de « sensing » nutritionnel des CEE sécrétant la CCK, (iii) les interactions CEE-SNE. Nous avons montré qu'une restriction protéique maternelle induisait une perte de sensibilité vagale à la CCK à l'âge adulte. La densité de CEE sécrétrices de CCK était augmentée, contribuant vraisemblablement à la plus forte sécrétion de CCK en réponse au stimulus nutritionnel (acide gras). Néanmoins, cette réponse était accompagnée d'une augmentation de la perméabilité intestinale. Pour la première fois, un effet de la CCK sur cette fonction régulée par le SNE a été montré *in vitro*. Les interactions CEE-SNE constituent donc une cible nouvellement identifiée de la programmation métabolique et ouvrent de nouvelles pistes de compréhension des pathologies de l'axe intestin-cerveau, notamment du comportement alimentaire.

Mots clés : Nutrition périnatale, origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD), cellules entéro-endocrines, cholécystokinine, nerf vague, système nerveux entérique, sensing nutritionnel, prise alimentaire.

ABSTRACT

A deleterious nutritional environment induces a metabolic programming thus leading to an increased risk of developing metabolic pathologies. In rat perinatal protein restriction induced hyperphagia during the postnatal development and default in satiety establishment at adulthood. Therefore the homeostatic component of eating behavior ensured by the central integration of gastro-intestinal signals could be deregulated. This gut-brain axis involves the enteroendocrine cells (EEC) which secrete satietogenic peptides such as cholecystokinin (CCK) which physiological effects are mediated through the vagus nerve and probably the enteric nervous system (ENS). The aim of this thesis was to determine in rat the impact of perinatal denutrition on (i) the vagal regulation of food intake by CCK (ii) the maturation and the function of nutrient sensing of CCK secreting EEC (iii) the interaction between EEC and ENS. We demonstrated that perinatal protein restriction leads to a loss of vagal sensitivity to CCK at adulthood. The density of CCK-secreting EEC was increased likely contributing to the higher CCK secretion in response to nutritional stimulus such as long chain fatty acid. Nevertheless this response was accompanied by an increased intestinal permeability. For the first time a CCK effect on this function ensured by the ENS has been shown in vitro. The interactions between ENS and EEC constitute a novel identified target for metabolic programming thus opening new approaches for understanding gut brain axis pathologies notably eating behavior.

Key words: Perinatal nutrition, developmental origins of health and disease, enteroendocrine cell, cholecystokinin, vagus nerve, enteric nervous system, nutrient sensing, food intake

ABBREVIATIONS

5-HT	Sérotonine
αMSH	α Melanocyte stimulating hormone
AGCC	Acide gras à chaîne courte
AGCL	Acide gras à chaîne longue
AGCM	Acide gras à chaîne moyenne
AgRP	Agouti-related protein
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Acide monophosphate cyclique
ARC	Noyau arqué
ARN	Acide ribonucléique
Ath1	Protein atonal homolog 1
ATP	Adénosine triphosphate
bHLH	basic helix-loop-helix
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent kinase II
CART	Cocaine and amphetamine-regulated transcript
CaSR	Calcium sensing receptor
CB1	Cannabinoid receptor 1
CD36	Cluster differentiation 36
ChAT	Acetylcholine transférase
ChgrA	Chromogranine A
CREB	C-AMP Response Element-binding
DMH	Noyau dorso median
DRN	Noyau dorsal du tronc cérébral
DOHaD	Developmental origins of health and disease

CCK	Cholécystokinine
CCK-R	Récepteur à la CCK
PDX1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
CGRP	Calcitonin gene related peptide
CEE	Cellules entéro-endocrines
DIO	Diet induced obesity
EEC	Enteroendocrine cells
ENK	Enkephaline
ERK	Extracellular regulated kinase
GABA	Acide gamma aminobutyique
GFP	Green protein fluorescence
GH	Growth hormone
GIP	Peptide insulino-trope dépendant du glucose
GLP-1	Glucagon like peptide 1
GLP-2	Glucagon like peptide 2
GLUT	Glucose transporter
GPCR	G Protein coupled receptor
HO	Haem oxygenase
IGF2	Insulin like factor 2
INSL5	Insulin like 5
KLF4	Kruppel like factor 4
KI	Knock in
FACS	Fluorescence assisted cell sorting
FFAR	Free fatty acid receptor
LHA	Aire hypothalamique latérale

LCFA	Long chain fatty acid
LP	Low protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MC4-R	Melanocortin 4 receptor
MCH	Melanin concentrating hormone
MPR	Maternal protein restriction
mRNA	ARN messenger
NEUROD1	Neurogenic differentiation 1
NGN3	Neurogenin 3
NPY	Neuropeptide Y
NP	Normo proteic
NTS	Noyau du tractus solitaire
PA	Palmitate
PAL	Palmitoléate
PAX	Paired Box
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PEPT1	Peptide transporter 1
PGP9.5	Protein gene product 9.5
POMC	Pro-opiomélanocortine
PVN	Noyau paraventriculaire
PYY	Peptide Y Y
RT-qPCR	Real time Polymerase Chain Reaction
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
SGLT1	Sodium Glucose transporter 1
SII	Syndrome de l'intestin irritable
SNC	Système nerveux central

SNE	Système nerveux entérique
SOM	Somatostatine
SP	Substance P
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
UNICEF	Fonds des nations unies pour l'enfance
VIP	Peptide vasoactif intestinal
VMH	Noyau ventromédian
Y2R	Y2 receptor

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Concept de programmation fœtale.....	43
Figure 2 : La balance énergétique	52
Figure 3 : Régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire par les signaux périphériques en provenance de la sphère digestive.	54
Figure 4 : La cholécystokinine : mécanismes de sécrétion et effets.....	56
Figure 5 : Switch phénotypique vagal opéré par la CCK.	58
Figure 6 : Régulation de la prise alimentaire par les neurones Vgat et VGLUT3 situés au niveau du noyau dorsal du tronc cérébral.	60
Figure 7 : Neurones du noyau arqué de l'hypothalamus.	61
Figure 8 : Représentation schématique des structures fermée et ouverte des cellules entéro-endocrines.	67
Figure 9 : Nomenclature classique des différentes sous population de cellules entéro-endocrines et leur localisation dans le tractus gastro-intestinal.	71
Figure 10 : Les sept différentes populations de cellules épithéliales intestinales.....	72
Figure 11 : Différenciation des cellules épithéliales intestinales	74
Figure 12 : Communication neuroendocrine au niveau intestinal.	76
Figure 13 : Niveau d'expression des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) le long du tractus digestif.....	77
Figure 14 : Différents récepteurs impliqués dans le sensing et le métabolisme du glucose.....	79
Figure 15 : Différents récepteurs impliqués dans le sensing des acides gras et des acides aminés.....	84
Figure 16 : Représentation schématique des deux plexi ganglionnaires principaux du SNE.....	87
Figure 17 : Gut connectome. Les CEE sont en contact direct avec le SNE grâce à leur prolongement appelé « neuropode ».....	91
Figure 18 : Protocole expérimental du modèle de rats dénutris en période pré et postnatale.....	101
Figure 19 : Schéma de la construction CCK-eGFP (transgène en brun), au sein du locus Rosa26 (en violet).	101
Figure 20 : Photos de cellules entéro-endocrines issues de notre modèle de rat transgénique qui expriment la GFP sous le contrôle du promoteur du gène qui code pour la CCK (CEE-CCK).....	102
Figure 21 : Cellules entéro-endocrines qui expriment la GFP sous le contrôle du promoteur du gène qui code pour la CCK (CEE-CCK) mais qui ne sont pas immunoréactives pour la chromogranine A.	203
Figure 22 : Effet d'une injection intrapéritonéale de CCK à dose croissante sur la prise alimentaire chez des rats âgés de 60 jours.....	211
Figure 23 : Schéma de synthèse des principaux résultats montrant les effets d'une restriction protéique maternelle sur l'axe intestin-cerveau impliqué dans la régulation de la prise alimentaire à court terme.	219

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Pathologies à court terme associées au retard de croissance intra-utérin.	45
Tableau 2 : Liste non exhaustive des facteurs de risques d'un retard de croissance intra-utérin.	46
Tableau 3 : Pathologies à long terme associées au retard de croissance intra-utérin.	48
Tableau 4 : Modèles d'étude de retard de croissance intra-utérin.	49
Tableau 5 : Les différents peptides gastrointestinaux qui contrôlent la prise alimentaire.....	57
Tableau 6 : Liste non exhaustive des modèles knock In utilisés pour étudier les CEE.....	69
Tableau 7 : Récepteurs et co-transporteurs impliqués dans le « sensing » nutritionnel.	83
Tableau 8 : Les différents neurones du système nerveux entérique de l'homme et leurs fonctions.	88
Tableau 9 : Composition des régimes expérimentaux.....	100

AVANT PROPOS

La régulation homéostatique de la prise alimentaire implique une communication bidirectionnelle entre l'intestin et le cerveau et est le reflet de l'intégration des signaux digestifs, métaboliques et hormonaux, relayés par le nerf vague vers le noyau du tractus solitaire du tronc cérébral qui initie la satiété par voie réflexe. Ces informations périphériques reçues par le tronc cérébral sont ensuite également intégrées dans l'hypothalamus, centre régulateur de la prise alimentaire et de la balance énergétique. Tout dysfonctionnement de cet axe intestin-cerveau, depuis la détection des signaux émis par la sphère digestive jusqu'à leur intégration vagale et hypothalamique, peut altérer la prise alimentaire et conduire à des désordres métaboliques et au surpoids. Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à l'impact d'une restriction protéique maternelle, connue pour induire des défauts de prise alimentaire, sur les capacités endocrines de l'intestin et plus particulièrement le rôle d'un peptide gastro-intestinal satiétogène, la cholécystokinine (CCK) dans les mécanismes de « sensing » nutritionnel ainsi que sur l'intégration vagale du signal CCKergique. .

Avant de présenter les résultats obtenus, ce travail de recherche sera tout d'abord placé dans son contexte. Ainsi une première partie sera dédiée à **la présentation du concept de l'origine développementale des maladies (DOHaD)**. Dans un deuxième temps nous nous intéresserons aux données qui soutiennent **que l'axe intestin-cerveau impliqué dans la régulation du comportement alimentaire est soumis aux effets d'une malnutrition périnatale autrement dit est programmable**. Nous utiliserons d'ailleurs le terme « **programmable** » pour définir tout effet de la nutrition périnatale au cours de la vie et le plus souvent à l'âge adulte. Enfin nous poserons l'hypothèse **d'une possible programmation de la fonction endocrine intestinale**.

Par la suite, la présentation des résultats sera segmentée en trois parties rédigées sous forme d'articles. Nous avons montré chez le rat qu'une restriction protéique maternelle pendant la gestation et la lactation aurait un effet sur :

- la capacité endocrine en augmentant la densité des CEE plus spécifiquement des CEE sécrétrices de CCK dans le duodénum
- la fonction endocrine en favorisant le « sensing nutritionnel » des CEE sécrétrices de CCK au jeune âge et la communication entre les CEE et le SNE en entraînant une altération de l'intégrité de la barrière intestinale

- la communication intestin – cerveau principalement sur le relais vagal en induisant une perte de sensibilité vagale à la CCK à l'âge adulte et des défauts de la mise en place de la satiété

Chaque partie sera complétée par des résultats annexes et par un chapitre de discussion et perspectives. Enfin ce mémoire sera clos par une discussion générale des résultats.

INTRODUCTION GENERALE

A ce jour, il est largement admis qu'une perturbation des facteurs environnementaux notamment nutritionnels au cours des périodes de vie critique conduit à un petit poids de naissance associé à un risque accru de développer des pathologies métaboliques à l'âge adulte (Barker, 2004; Chatelain, 2000).

Face à une perturbation des facteurs nutritionnels au cours du développement *in utero*, le fœtus adopte un phénotype économe lui permettant d'aligner son métabolisme au contexte nutritionnel appauvri. Ce processus d'adaptation se traduit par une restriction de croissance qui, bien que bénéfique pour le développement des organes, conduit à un petit poids de naissance. L'association entre petit poids à la naissance et santé à long terme a été révélée par les études épidémiologiques de David Barker qui ont donné naissance à la théorie de l'origine développementale des maladies et de la santé (DOHaD) (Barker, 2007). Cette théorie du DOHaD repose essentiellement sur la plasticité des organes. En effet, au cours du développement, les conditions environnementales modulent le génotype d'un individu de sorte qu'il peut conduire à une panoplie d'états physiologique et morphologique (Barker, 2004). Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette programmation seraient principalement d'origine épigénétique dont les marques moduleraient la dynamique cellulaire, la structure des organes et le système endocrinien (Joss-Moore and Lane, 2009; Waterland, 2009). Toutefois, plus que le poids à la naissance, la trajectoire de croissance postnatale est déterminante dans le risque d'apparition de pathologies métaboliques à l'âge adulte (Koletzko et al., 2010; Luque et al., 2015; Raaijmakers et al., 2017; Roseboom et al., 2001; Rzehak et al., 2017; Stutte et al., 2017). En effet, un environnement nutritionnel post-natal riche en calories et à l'opposé du contexte fœtal favorise un rattrapage de croissance rapide qui prédispose au syndrome métabolique à l'âge adulte (Roseboom et al., 2001; Stanner et al., 1997). Ainsi, l'association entre trajectoire de croissance et santé à long terme est le reflet d'une programmation qui correspond au mécanisme par lequel une perturbation des facteurs environnementaux à des stades de croissance critiques pourrait avoir des répercussions sur la structure et la fonction des tissus (Calkins and Devaskar, 2011; Cameron and Demerath, 2002; Langley-Evans, 2009).

Un cas particulier et représentatif du concept du DOHaD est le retard de croissance intra-utérin (RCIU). Le RCIU se caractérise par un poids à la naissance à terme inférieur à 2,5 kg (Rosenberg, 2008). Bien que l'origine du RCIU soit multifactorielle, les facteurs de risque

notamment maternels, placentaires et fœtaux aboutissent à une réduction des apports fœtaux *in utero* (Gaccioli and Lager, 2016). En France, près de 8% des naissances par an correspondent à un RCIU cofacteur majeur de mortalité *in utero* et de morbidité néonatale (Longo et al., 2013) qui en font un problème majeur de santé publique. A plus long terme, des données épidémiologiques indiquent que le RCIU augmente le risque d'apparition d'obésité, de diabète de type 2 et d'hypertension (Bengtson et al., 2006; Flanagan et al., 2000; Green et al., 2010; Joss-Moore and Lane, 2009; Sharma et al., 2016; Szostak-Wegierek and Szamotulska, 2011). Les nombreux modèles animaux de RCIU ont permis de générer des preuves expérimentales qui viennent étayer les données épidémiologiques et permettre l'étude des mécanismes à l'origine de cette programmation fœtale (Swanson and David, 2015; Vuguin, 2002). Plus spécifiquement, des données obtenues grâce aux modèles de restriction calorique ou protéique de la mère pendant la gestation et/ou la lactation ont permis de démontrer qu'un stress nutritionnel périnatal conduit à un certain nombre de caractères décrivant le syndrome métabolique. En effet une malnutrition périnatale est à l'origine d'une hyperinsulinémie, d'une augmentation du poids corporel, du pourcentage de masse grasse et du taux de leptine (Desai et al., 2005; Edwards and McMillen, 2002; Kind et al., 2003; Vickers et al., 2000b). De manière intéressante, une restriction protéique maternelle entraîne à l'âge adulte une dérégulation du comportement alimentaire caractérisée selon l'intensité ou la nature de la restriction par une hyperphagie ou de façon plus subtile par des défauts de satiété pouvant conduire à la mise en place de l'obésité (Cottrell and Ozanne, 2008; Coupe et al., 2010; Orozco-Solis et al., 2009).

Le comportement alimentaire, un processus essentiel à la survie d'un individu est contrôlé par des processus homéostatiques, la faim, les envies et les sensations hédoniques. L'axe intestin cerveau joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie énergétique et de la prise alimentaire en intégrant les signaux périphériques digestifs et métaboliques vers le système nerveux central. Parmi les différents acteurs de l'axe intestin-cerveau on distingue l'intestin endocrine, le système nerveux intrinsèque (SNE) et extrinsèque (nerf vague), le tronc cérébral et l'hypothalamus. Dans le tractus digestif, les cellules entéro-endocrines (CEE) sont les acteurs majeurs de l'axe intestin-cerveau en détectant les nutriments de la lumière intestinale. Ce « sensing » nutritionnel est facilité par la présence de récepteurs spécifiques des nutriments à la surface des CEE et entraîne la libération de peptides gastrointestinaux. La fonction de ces peptides est essentiellement anorexigène et leur nature dépend de la localisation dans le tube digestif des CEE qui les produisent (Engelstoft et al., 2013b; Fothergill et al., 2017; Sykaras et al., 2012). Les effets physiologiques des peptides

gastrointestinaux sont médiés, via leurs récepteurs spécifiques, par voie endocrine sur des organes cibles (pancréas, intestin, cerveau) mais aussi et essentiellement de façon paracrine sur les relais nerveux situés à proximité des CEE, (Bohorquez et al., 2015; Dockray, 2009a; Patterson et al., 2002; Sternini et al., 1999). Parmi ces peptides on distingue la CCK qui est sécrétée dès l'arrivée des nutriments par les CEE du duodénum, en réponse notamment aux acides gras à longueur de chaînes supérieure à 12 C et qui stimule la sécrétion d'enzymes pancréatiques et inhibe la vidange gastrique (Cummings and Overduin, 2007; Dockray, 2012). Des données obtenues principalement chez le rat ont placé la CCK comme « chef d'orchestre » du codage phénotypique du nerf vague faisant passer celui-ci d'un phénotype orexigène favorisant la prise alimentaire vers un phénotype opposé anorexigène, selon le statut nutritionnel (Burdyga et al., 2008; Burdyga et al., 2004; Burdyga et al., 2006; de Lartigue et al., 2007; Dockray, 2009a, b; Koda et al., 2005; Zheng et al., 2002). Ces signaux de switch phénotypique du nerf vague sont ensuite intégrés par le tronc cérébral vers l'hypothalamus. De façon intéressante, des études récentes ont démontré que les CEE sont en contact physique à travers un neuropode avec le système nerveux entérique (SNE) (Bohorquez et al., 2011; Bohorquez et al., 2014) et que des interactions synaptiques existent entre CEE (au moins les cellules entérochromaffines (sérotonine) et le SNE (Bellono et al., 2017). Cet ensemble formé par les CEE et le SNE porte le nom de « gut connectome » et pourrait moduler la détection des nutriments, la motricité digestive et le comportement alimentaire (Ye and Liddle, 2017)

Une dérégulation de l'axe intestin-cerveau peut affecter de façon permanente la régulation de l'homéostasie énergétique or un déséquilibre de la balance énergétique même minime peut augmenter le risque de développer un syndrome métabolique. Si les effets de la malnutrition périnatale sur les centres hypothalamiques de la prise alimentaire sont très bien décrits (Coupe et al., 2010; Delahaye et al., 2008; Desai et al., 2005; Desai et al., 2011; Orozco-Solis et al., 2009), les impacts sur le premier maillon de l'axe intestin-cerveau régulant la PA, les CEE, ainsi que sur les relais neuronaux (SNE, composante vagale) le sont très peu. Cependant un certain nombre de données expérimentales permettent d'émettre l'hypothèse d'une programmation de ces différents acteurs de l'axe intestin-cerveau. En effet des études ont montré que la prolifération et la différenciation des cellules sécrétrices de l'épithélium intestinal notamment les cellules de Paneth et les cellules à mucus sont altérées par un RCIU suggérant ainsi que ces cellules puissent faire l'objet d'une programmation (Dong et al., 2014a; Fung et al., 2016). Les CEE étant issues des mêmes cellules souches que ces deux types cellulaires, il est tout à fait concevable que la prolifération et/ou la

différenciation de leurs progéniteurs soient impactées par la programmation, de même que leur fonction de « sensing » nutritionnel. Par ailleurs, il a été démontré que le phénotype et l'organisation du SNE sont également modulés par une restriction calorique maternelle chez le rat (Schoffen et al., 2014). Une restriction protéique maternelle pourrait donc avoir un impact sur la fonction du SNE, ainsi que ces interactions avec les autres systèmes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire notamment les CEE. Enfin, il a été démontré que le nerf vague est également sensible au statut nutritionnel puisque chez un modèle de rat obèse les effets satiétogènes de la CCK sont réduits (de Lartigue et al., 2012). Il est donc envisageable qu'une restriction protéique maternelle soit également à l'origine d'une perte de sensibilité vagale.

Sur la base de ces données, nous avons émis l'**hypothèse générale** qu'une restriction protéique maternelle pourrait être à l'origine d'une programmation de l'axe intestin cerveau contribuant ainsi aux défauts de régulation de la prise alimentaire observés chez le rat adulte ayant subi une dénutrition maternelle périnatale. Par conséquent, nous avons pour **objectifs** d'étudier chez le rat l'effet d'une restriction protéique pendant la gestation et la lactation sur : **(i)** la prolifération/ différenciation des CEE plus particulièrement celles sécrétrices de CCK dans l'intestin proximal **(ii)** la fonction de « sensing » nutritionnel des CEE, la fonction de barrière intestinale (perméabilité) régulée par le SNE ainsi que les interactions entre le SNE et les CEE dans le duodenum **(iii)** l'intégration vagale du signal CCKergique.

Etant donné la prévalence du RCIU ainsi que la pandémie du syndrome métabolique particulièrement l'obésité une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent la programmation des acteurs de l'axe intestin-cerveau pourrait permettre d'identifier de nouveaux marqueurs de dérégulation précoce de la prise alimentaire dans les cas de retard de croissance intra utérin.

INTRODUCTION : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : ORIGINE DEVELOPPEMENTALE DE LA SANTE ET DES MALADIES

1- Théorie de l'origine développementale de la santé et des maladies

a- Programmations fœtale et postnatale : le phénotype économe

De la conception jusqu'à l'âge de deux ans, les 1000 premiers jours de vie représentent une fenêtre de vie critique durant laquelle l'organisme est plastique. Ainsi, face à une perturbation des facteurs environnementaux, notamment nutritionnels au cours du développement *in utero*, le fœtus met en place un processus d'adaptation afin de pallier à l'environnement délétère. Ce processus d'adaptation consiste en la mise en place d'un métabolisme « économe » permettant de privilégier une trajectoire de croissance sélective favorisant le développement adéquat des organes clefs tels que le cerveau et les reins mais conduisant à un petit poids à la naissance. Cette restriction de croissance permet au fœtus d'aligner son métabolisme au contexte nutritionnel *in utero*.

Cependant, les effets à long terme d'une restriction calorique intra-utérine dépendent d'une part du stade de gestation auquel elle a eu lieu et d'autre part des tissus et systèmes qui se développent au cours de cette fenêtre critique (Roseboom et al., 2001). En effet, il a été démontré qu'une restriction calorique au cours du dernier trimestre de grossesse est à l'origine d'un petit poids de naissance et d'une tolérance réduite au glucose à l'âge adulte (Ravelli et al., 1976). A l'opposé, lorsque cette altération nutritionnelle a lieu durant les premières phases de grossesse, les enfants naissent avec un poids adéquat pour l'âge gestationnel mais développent néanmoins un profil lipidique athérogène et un risque accru d'obésité (Ravelli et al., 1976; Roseboom et al., 2001). Ainsi, bien que le poids à la naissance soit un bon marqueur pour le développement de pathologies à l'âge adulte, c'est l'environnement *in utero* qui est en partie à l'origine de l'apparition ultérieure de ces pathologies.

De plus, outre la fenêtre gestationnelle durant laquelle a eu lieu le stress nutritionnel, la trajectoire de croissance qui fait suite à celle-ci est encore plus déterminante dans la mise en place de pathologies à l'âge adulte (Raaijmakers et al., 2017; Rzehak et al., 2017; Stutte et al., 2017). Ainsi, face à un environnement nutritionnel post-natal plus riche qu'en période fœtale, le métabolisme « économe » ne sera plus en adéquation avec les apports nutritionnels plus importants. La réponse à ce nouveau stress nutritionnel, favorisera un rattrapage de croissance rapide mais augmentera également le risque de développer un syndrome métabolique à l'âge adulte (Calkins and Devaskar, 2011; Lucas, 1991). En effet, chez des individus exposés à une restriction calorique intra-utérine sévère (400 à 1000 calories par

jour) un rattrapage de croissance post natal grâce à un apport calorique élevé (2000 calories) est associé à un risque accru d'apparition de pathologies à l'âge adulte (Roseboom et al., 2001). En revanche, lorsque les apports nutritionnels sont similaires entre les périodes intra-utérine et post-natale, le phénotype économe mis en place limite ce risque d'apparition de pathologies métaboliques. En effet, les enfants conçus lors du siège de Leningrad caractérisé par une longue famine de 28 mois et nés avec un petit poids n'ont pas souffert de syndrome métabolique (Stanner et al., 1997). Toutefois, ces individus développent une dysfonction endothéliale à l'âge adulte (Stanner et al., 1997).

Ces observations démontrent qu'un décalage (« mismatch ») d'apport nutritionnel entre ces deux périodes de vie aurait des effets à long terme (Calkins and Devaskar, 2011; Kelishadi et al., 2015; Koletzko et al., 2017; Koletzko et al., 2010). Aujourd'hui, ces données sont largement confirmées par des études de cohortes contemporaines composées d'individus nés avec un petit poids et âgés de 8 à 10 ans. Plus spécifiquement, il a été démontré qu'une supplémentation importante en protéines au cours des premiers mois de vie post natale entraînera proportionnellement un rattrapage de croissance rapide mais sera associé à un impact négatif sur la masse grasse abdominale et le phénotype métabolique (Crume, 2014; Stutte et al., 2017). De façon intéressante, Koletzko et al., ont montré que même après une naissance à terme avec un poids normal, un allaitement avec des formules lactées riches en protéines (2.9 à 4.4 g protein/100 kcal vs 1.7 à 2.2 g protein/100 kcal) est associé à une prise de poids importante dès l'âge de 2ans (Koletzko et al., 2010).

Le lien entre trajectoire de croissance et santé à long terme est le reflet de la programmation des systèmes et organe. Elle correspond au processus par lequel un stimulus ou une altération des facteurs environnementaux à des stades de croissance critique pourrait avoir des répercussions sur la structure et la fonction des tissus (Calkins and Devaskar, 2011; Cameron and Demerath, 2002). De plus, la programmation ne se limitant pas à l'environnement *in utero*, elle peut s'étendre jusqu'à l'enfance où différents organes et systèmes continuent à être plastiques (Calkins and Devaskar, 2011; Lucas, 1991). En effet, le développement des systèmes et des organes au cours du développement périnatal est sensible à l'environnement. Ainsi les termes « programmation » et « programmables » seront utilisés pour faire état d'un effet de la malnutrition maternelle périnatale à court et/ou long terme.

La mise en place de la programmation foétale et/ou postnatale est le reflet de la modulation de divers paramètres notamment physiologiques et génétiques. D'une part, les mécanismes moléculaires qui la sous-tendent affectent le nombre de cellules et cette altération de la dynamique cellulaire conduit à une interruption des processus développementaux tels

que l'apoptose (Joss-Moore and Lane, 2009; Waterland and Garza, 1999). D'autre part, ils modifient le système endocrinien entraînant ainsi une perturbation des facteurs de régulation homéostatique et des changements dans la signalisation cellulaire (Fowden and Forhead, 2004; Joss-Moore and Lane, 2009). Au niveau moléculaire, des données récentes indiquent qu'au cours du développement, des facteurs environnementaux peuvent moduler plus spécifiquement l'expression des gènes par des mécanismes épigénétiques pouvant conduire à la modification de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation et la plasticité tissulaire (Joss-Moore and Lane, 2009; Vickers, 2014; Wadhwa et al., 2009; Waterland, 2009).

En effet, il a été démontré que le pourcentage de micronutriments contenus dans l'alimentation de la mère est important pour la méthylation de l'ADN chez la descendance. Ainsi, un déséquilibre de cette balance tel qu'une augmentation de la concentration en vitamine B12 lors de la grossesse est associée chez les nouveau-nés à une diminution globale de la méthylation génique particulièrement du gène IGFBP3 impliqué dans le développement intra-utérin (McKay et al., 2012). De plus, les individus exposés à une restriction calorique périnatale présentent à l'âge adulte, une diminution du taux de méthylation de l'hormone de croissance insulin-like growth factor (IGF2) (Desai et al., 2015; Heijmans et al., 2008; Tobi et al., 2009). Outre ces quelques données épidémiologiques, des données expérimentales viennent démontrer qu'une altération nutritionnelle périnatale peut moduler l'expression de gènes. Waterland et al., ont montré que le type de régime alimentaire après le sevrage affecte de façon permanente l'expression de IGF2 (Waterland et al., 2006). Par ailleurs, au cours de la période périnatale une restriction protéique maternelle associée à une supplémentation en nutriments donneurs de méthyl tels que la vitamine B12, la choline et la méthionine réduit le niveau d'expression de gènes impliqués dans la croissance fœtale (IGF2) et la régulation de l'homéostasie énergétique (Amarger et al., 2017). De plus, une supplémentation en folate au cours de la gestation entraîne une hypo-méthylation de gènes hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, conduisant à une hyperphagie. Toutefois, ces modifications sont réversibles par une alimentation riche en folate administrée à la descendance après le sevrage, démontrant ainsi une plasticité épigénétique de l'hypothalamus (Cho et al., 2013). Il a également été démontré qu'une malnutrition maternelle périnatale entraîne des changements de l'expression de micro ARNs impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline à l'âge adulte (Lie et al., 2014).

b- Principales données épidémiologiques qui ont donné naissance à la théorie du DOHaD

La corrélation entre petit poids à la naissance et maladies à l'âge adulte a été révélée par les études épidémiologiques de Barker qui ont donné naissance à la théorie de l'origine développementale des maladies (DOHaD) (Barker, 2004). Cette théorie repose essentiellement sur la plasticité développementale. En effet, au cours du développement, les conditions environnementales modulent le génotype d'un individu de sorte qu'il peut conduire à une panoplie d'états physiologique et morphologique (Barker, 2004; Calkins and Devaskar, 2011; Swanson et al., 2009).

Les données épidémiologiques ayant donné naissance au concept du DOHaD sont essentiellement basées sur des observations issues de populations ayant connues des restrictions caloriques en période périnatale. La cohorte anglaise du Hertfordshire constituée d'hommes et de femmes nés entre 1931 et 1939 et résidant toujours dans ce comté au moment de l'étude est la première à l'origine de ce concept. Les premières données obtenues grâce à l'étude de cette cohorte montrent qu'un petit poids de naissance est associé à un taux élevé de mortalité due à une ischémie cardiaque (Barker et al., 1989b) et à une maladie coronarienne (Eriksson et al., 1999; Fall et al., 1995). Par la suite, de nombreuses études de cette cohorte ont permis de faire le lien entre petit poids à la naissance et le risque de développer à l'âge adulte une intolérance au glucose (Hales et al., 1991), un diabète de type 2 (Phillips et al., 2005), une résistance à l'insuline (Hales and Barker, 1992) et des pathologies cardiovasculaires (Barker et al., 1989a; Fall et al., 1995; Osmond et al., 1993).

Ces associations ont largement été étayées par l'étude de la cohorte hollandaise (The Netherlands Cohort study) constituée d'individus nés ou conçus lors de la seconde guerre mondiale aux Pays Bas durant des périodes proches de la famine et au cours de l'hiver survenue vers la fin de cette guerre (The Hunger Winter). Cette famine était caractérisée par une restriction calorique sévère (400 à 800 calories par jour) sur une courte période suivie d'un apport calorique élevé pouvant atteindre 2000 calories (Roseboom et al., 2001). L'exposition à cette famine durant des phases critiques du développement a entraîné à l'âge adulte une modification du métabolisme, caractérisée par une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline (Ravelli et al., 1998; Ravelli et al., 1976). De plus cette cohorte a permis de mettre en évidence un effet sexe et un effet âge sur la prédisposition à l'obésité à l'âge adulte suite à une restriction calorique maternelle (Ravelli et al., 1999). Chez l'homme,

l'obésité apparaît à partir de l'âge de 20 ans (Ravelli et al., 1976) tandis que chez la femme elle survient plus tard, vers 50 ans (Ravelli et al., 1999).

Enfin, l'étude de la cohorte d'Helsinki (The Helsinki Birth Cohort) vient renforcer les données des 2 précédentes et met en avant qu'un rattrapage de croissance accéléré survenu entre l'âge d'un et deux ans est associé à l'apparition de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2 à l'âge adulte (Barker et al., 2009; Eriksson, 2006, 2011).

L'ensemble de ces données épidémiologiques a posé le concept selon lequel un petit poids à la naissance, conséquence d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU), suivie d'une croissance postnatale rapide, augmente le risque de développer un syndrome métabolique (Barker, 1990; Chatelain, 2000; Hales and Barker, 1992; Hales and Ozanne, 2003; Salam et al., 2014).

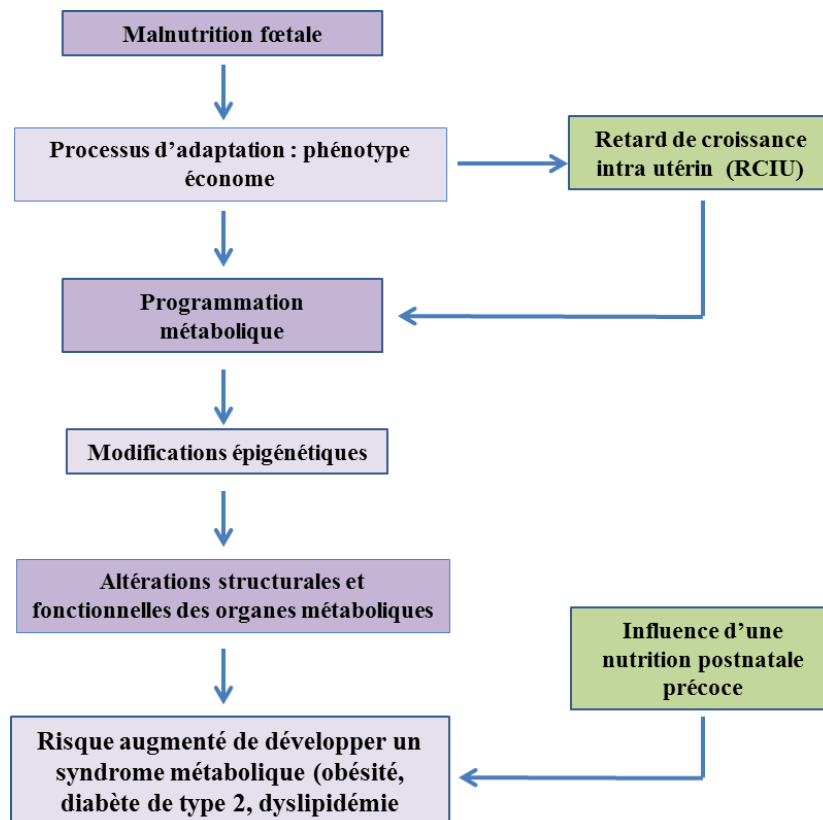


Figure 1 : Concept de programmation fœtale.

Une nutrition fœtale altérée est à l'origine d'un processus d'adaptation du fœtus qui adopte un phénotype économe à l'origine d'un retard de croissance intra-utérin. Ce processus d'adaptation induit une programmation métabolique associée à une altération de la structure et de la fonction des organes, pouvant être due à des modifications épigénétiques. Cette programmation métabolique ou empreinte nutritionnelle prédispose au syndrome métabolique à l'âge adulte modulé par la vitesse de rattrapage de croissance.

2- Retard de croissance intra-utérin

a- Aspects cliniques et prévalence du retard de croissance intra-utérin

Le retard de croissance intra-utérin est principalement caractérisé par un faible poids à la naissance qui est inférieur à 2500 grammes. Le RCIU se définit par une incapacité du fœtus à atteindre son potentiel de croissance malgré une naissance à terme (après 37 semaines d'aménorrhée) (Mandrizzato et al., 2008; Rosenberg, 2008). Selon les courbes morphométriques de référence, un nouveau-né souffre d'un RCIU lorsqu'il présente un poids inférieur au 10^{ème} percentile pour son âge gestationnel (Babson and Benda, 1976; Dancis et al., 1948; Lubchenco et al., 1966). Toutefois cette définition qui est plus spécifique du petit poids de naissance prend naturellement en compte les nouveau-nés prématurés (naissance avant la 37ème semaine d'aménorrhée). Le RCIU est différent du petit poids pour l'âge gestationnel puisqu'il comporte obligatoirement une composante pathologique à l'origine d'une restriction de la croissance. Alors que dans les sociétés occidentales le RCIU est plus souvent dû à des insuffisances placentaires, dans les pays en développement une malnutrition maternelle en est la cause.

Selon l'UNICEF, ces enfants représentent au moins 15% des naissances mondiales et sont particulièrement présents dans les pays en développement. Le RCIU affecte approximativement 5% à 15% des naissances aux Etats-Unis et en Europe mais varie largement selon les pays en développement : 30% à 35% des enfants nés en Asie centrale, 15% à 25% en Afrique et 10 à 20% en Amérique Latine (Gaccioli and Lager, 2016; Saleem et al., 2011).

A court terme, le RCIU est associé à un risque élevé de mortalité périnatale due entre autres à une hypoxie, une asphyxie, une thermorégulation altérée, des dysfonctionnements cardiaques et une hypoglycémie (Chen et al., 1993; Longo et al., 2013; Rosenberg, 2008) (Tableau 1). De plus les enfants nés avec un RCIU ont plus de risque de développer une entérocolite nécrosante et une intolérance alimentaire (Bozzetti et al., 2013; March et al., 2014; Qian et al., 2017). Dans une dizaine de pays européens, 10% des décès en période périnatale sont dus à un RCIU et 12% à un RCIU sévère souvent associé à la consommation de substances nocives par la mère et/ou à un décollement placentaire (Richardus et al., 2003). En France, le pourcentage d'enfants nés avec un RCIU a cessé d'augmenter en 2003. Le taux d'enfants de moins de 2500 grammes est passé de 6,4% à 5,1% entre 2003 et 2010, reflet de l'évolution de la prise en charge du RCIU ainsi que d'une baisse des nombreux facteurs de risque (Blondel et al., 2012).

Conséquences à court terme
Asphyxie à la naissance
Rétinopathie
Hypothermie
Hypoglycémie/Hyperglycémie
Hypocalcémie
Mort intrautérine
Concentration plasmatique de ferritine faible
Hémorragie pulmonaire
Immunodéficience
Dysfonction rénale
Entérocolite nécrosante
Intolérance alimentaire
Hypertension pulmonaire

Tableau 1 : Pathologies à court terme associées au retard de croissance intra-utérin.

Adapté de Sharma, Shastri et al. 2016

b- Facteurs de risques du retard de croissance intra-utérin

Les facteurs de risque associés à un RCIU peuvent être d'origine placentaire, fœtale ou maternelle (Baschat and Hecher, 2004; Hendrix and Berghella, 2008; Rosenberg, 2008; Sharma et al., 2016; Swanson et al., 2009) (Tableau 2).

Cependant, bien que l'origine d'un RCIU soit multifactorielle, tous les risques de RCIU aboutissent à une réduction des apports en oxygène et en nutriments fœtaux *in utero* (Gaccioli and Lager, 2016; Lager and Powell, 2012). La croissance fœtale est dépendante de la disponibilité des nutriments qui elle-même est liée à la capacité du placenta à transporter ces nutriments de la mère vers le fœtus. Ainsi la réduction du transport des nutriments et un apport nutritionnel maternel inadéquat sont les principaux facteurs d'origine placentaire à conduire à un RCIU (Sharma et al., 2016). De plus l'hypertension gestationnelle et l'insuffisance placentaire sont des facteurs de risque placentaire qui augmentent le risque de RCIU de 33% et 17% respectivement (Sehested and Pedersen, 2014).

Outre les facteurs d'origine placentaire, le diabète gestationnel, l'âge maternel et les infections sont d'autres facteurs de risque de prévalence d'un RCIU (Gaccioli and Lager, 2016; Ryckman et al., 2013; Vambergue and Fajardy, 2011). Enfin, au cours de la grossesse, la consommation de substances nocives par la mère réduit la fonction mitochondriale

(Bouhours-Nouet et al., 2005), le volume des capillaires du placenta (Burton et al., 1989) et le transport des acides aminés tels que l'arginine (Pastrakuljic et al., 2000) augmentant ainsi de 24% le risque de donner naissances à des enfants avec un RCIU (Gaccioli and Lager, 2016; Sehested and Pedersen, 2014).

Origine maternelle	Origine fœtale	Origine placentaire
Age maternel	Anomalies chromosomales	Réduction du transport des nutriments
Hypoxie maternelle	Syndrome génétique	Poids du placenta
Statut socioéconomique faible	Anomalies congénitales	Vascularisation uroplacentale insuffisante
Origine ethnique et raciale	Gestation multiple	Dysfonction placentaire
Abus de substances toxiques	Infections congénitales	Infections du placenta
Prise de médicaments	Troubles métaboliques	Lésions inflammatoires
Poids et taille		Gestation multiple
Intervalle de temps court entre les grossesses		Infarctus multiple
Suivi médical faible		
Hypertension		
Pré éclampsie		
Diabète gestationnel		
Infection, maladies		

Tableau 2 : Liste non exhaustive des facteurs de risques d'un retard de croissance intra-utérin.

Adapté de Sharma, Shastri et al. 2016.

c- Prise en charge des nouveau-nés avec un petit poids à la naissance : le rattrapage de croissance

Une des principales caractéristiques des nouveau-nés avec un RCIU, réside dans l'altération de la composition cérébrale caractérisée par une réduction de la matière grise et du volume de l'hippocampe (Lodygensky et al., 2008; Toft et al., 1995; Tolsa et al., 2004). Ces modifications résultent en une réduction des capacités cognitives et intellectuelles (Chen et al., 2016; Gutbrod et al., 2000; Lundgren et al., 2001; Yanney and Marlow, 2004). Cependant, ces déficits cérébraux peuvent être réversibles lorsqu'un rattrapage de croissance a lieu pendant une période postnatale (Hack and Breslau, 1986; Heird, 1999). Cette fenêtre critique se situe dans la première année de vie puisqu'un rattrapage de croissance est à l'origine d'un meilleur développement cérébral dès l'âge de huit mois et les effets positifs de

ce développement sont visibles à trois ans (Hack and Breslau, 1986) et plus tard à l'âge adulte (van Dommelen et al., 2014). De plus le rattrapage de croissance corporel, lorsqu'il a lieu, se fait dans les six mois après la naissance (Fitzhardinge and Steven, 1972; Hokken-Koelega et al., 1995). Par ailleurs, indépendamment du développement cognitif, un rattrapage de croissance est à l'origine d'une réduction de 75% du taux de mortalité à l'âge de cinq ans (Victora et al., 2001).

L'importance de la nutrition postnatale précoce a été mise en avant par Lucas et al., qui démontre que l'administration pendant 4 semaines de formules lactées contenant 2g/dL de protéines entraîne une amélioration du développement staturo-pondéral et cognitif à 18 mois chez les nouveau-nés prématurés (Lucas et al., 1990). Ces données indiquent que la prise en charge des individus nés avec un faible poids est essentielle pour rattraper une croissance corporelle normalement équivalente à leur âge gestationnel et ainsi limiter les conséquences sur le développement cérébral et la mortalité (Hokken-Koelega et al., 1995; Lucas, 1998; Lundgren et al., 2001). Ainsi, dans le double but d'assurer un rattrapage de croissance et un développement psychomoteur optimal les enfants nés avec un RCIU sont nourris en routine à l'aide de laits enrichis en protéines jusqu'à l'obtention d'un poids égal à au moins 2,8 kg (Lapillonne and Salle, 1996). Récemment, il a été recommandé de débiter le rattrapage de croissance avec un apport en acides aminés d'au moins 1,5 g/kg par jour dès le premier jour de vie puis d'augmenter cet apport quotidiennement et rapidement jusqu'à 3,5 à 4 g/kg par jour (Fenton et al., 2014; Lapillonne et al., 2011). Cependant à très forte dose (6 g/kg par jour) une supplémentation en protéines aurait des effets délétères à long terme tels qu'une diminution des performances cognitives (Schneider and Garcia-Rodenas, 2017).

Toutefois, comme évoqué en début de chapitre, bien qu'une amélioration de la trajectoire de croissance ait un effet positif sur la mortalité et le développement cérébral, elle reste à l'origine du risque accru de développer des pathologies métaboliques à l'âge adulte (Forsen et al., 2000; Hokken-Koelega et al., 1995; Kelishadi et al., 2015; Lucas, 1991; Tinnion et al., 2014).

d- Conséquences à l'âge adulte d'un petit poids de naissance

A long terme le RCIU est associé à de nombreuses pathologies (Tableau 3). Chez les nouveau-nés avec un RCIU l'apparition du syndrome métabolique à l'âge adulte est en lien avec une altération des différents organes et systèmes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique tels que le foie et le pancréas. Ainsi, une augmentation de la production de glucose hépatique, un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques et de la

recapture du glucose périphérique par le muscle sont à l'origine d'une perturbation de l'homéostasie glucidique chez les individus nés avec un RCIU (Green et al., 2010; Joss-Moore and Lane, 2009). De plus, un effet sexe lié à l'apparition de pathologies à l'âge adulte a été mis en évidence et certaines affections conduisant à ces pathologies sont plus prononcées chez les hommes. Chez ces derniers par exemple, un petit poids à la naissance est associé à une augmentation de la résistance à l'insuline et à une hyperinsulinémie (Flanagan et al., 2000).

D'autre part, des altérations structurelles d'organes sont aussi causées par le RCIU (Joss-Moore and Lane, 2009; Regev and Reichman, 2004). En effet, le RCIU pourrait contribuer au développement des pathologies intestinales telles que le syndrome de l'intestin irritable (SII) et le cancer colorectal, mais les études sur ce sujet restent pour le moment contradictoires (Bengtson et al., 2006; Sandhu et al., 2002). De plus, un développement vasculaire anormal, une dysfonction endothéliale et une altération de la fonction rénale contribuent au développement d'une hypertension à l'âge adulte (Szostak-Wegierek and Szamotulska, 2011).

Conséquences à long terme
Hypertension
Diabète de type 2
Obésité
Ischémie cardiaque
Pathologie rénale et hépatique
Dyslipidémie
Hypercholestérolémie
Cancer
Performance cognitive réduite
Problèmes neuro-développementaux
Maladies réactives des voies aériennes
Parkinson et Alzheimer
Dépression, anxiété, trouble bipolaire...

Tableau 3 : Pathologies à long terme associées au retard de croissance intra-utérin.

Adapté de Sharma, Shastri et al. 2016

Ces données viennent étayer les observations faites suite aux études épidémiologiques qui ont donné naissance à la théorie du DOHAD et soutiennent l'existence d'un lien entre

petit poids de naissance et apparition de pathologies à l'âge adulte. Le développement de nombreux modèles animaux de RCIU a permis de confirmer ce lien.

3- Modèles animaux de retard de croissance intra-utérin

Du fait que le rat et la souris soient génétiquement et physiologiquement très proches de l'homme, 60% des modèles d'étude du RCIU ont été développés chez le rat et 10% chez la souris (Swanson and David, 2015; Vuguin, 2007). Chez le porc, l'obtention d'animaux nés avec un RCIU est naturelle du fait de la forte prolificité de l'espèce mais d'autres modèles animaux tels que le mouton, le cobaye et le primate ont été utilisés (Vuguin, 2007). Puisque les facteurs de risque d'un RCIU sont d'origine maternelle, placentaire ou fœtale, les modèles animaux de RCIU utilisent également des interventions pouvant affecter ces trois niveaux (Vuguin, 2007). Cependant, un des facteurs de risque majeur de RCIU étant l'insuffisance placentaire, la majorité des modèles animaux d'étude du RCIU est basée sur une altération des apports nutritionnels au cours de la période périnatale (Green et al., 2010) (Tableau 4).

Modèle nutritionnel (Mouton, porc et rongeur)	Modèle d'hypoxie (Mouton, porc, singe, cobaye, rongeur)	Autres modèles (rongeur, mouton)
Restriction calorique	Ligature unilatérale ou bilatérale des artères utérines	Traitement glucocorticoïdes
Restriction protéique	Embolisation uroplacentale	Diabète maternel
Déficiences en fer	Ligature de l'artère ombilicale	Stress
Suralimentation	Chambre d'hypoxie	Délétion de gènes

Tableau 4 : Modèles d'étude de retard de croissance intra-utérin.

Adapté de Vuguin 2007.

a- Modèles d'hypoxie

Un des modèles de RCIU le mieux caractérisé est celui de la ligature unilatérale ou bilatérale des artères utérines (Janot et al., 2014). En procédant à ce type de chirurgie, l'afflux sanguin de la mère vers le fœtus est considérablement réduit conduisant à un apport en nutriments et en oxygène limité. Un des avantages majeurs des modèles d'hypoxie réside dans un environnement métabolique ainsi qu'une composition corporelle maternelle non affectés.

Chez le rat, la ligature des artères se fait généralement à la fin de la gestation au 19^{ème} jour pour un temps de gestation variant entre 21 et 22 jours (Wigglesworth, 1964). Comme

pour le nouveau-né avec un RCIU, les ratons présentent un poids réduit de 20% et souffrent dès la naissance d'une résistance à l'insuline et d'une réduction du nombre de cellules bêta pancréatiques (Vuguin, 2002; Vuguin et al., 2004). En conséquence, ces rats présentent à l'âge adulte une obésité et une intolérance au glucose (Park et al., 2008; Simmons et al., 2001).

Outre la ligature des artères, d'autres modèles de chirurgie tels que la ligature unilatérale des artères ombilicales ont été développés chez le mouton et le cobaye. Ce modèle d'étude du RCIU permet d'induire une hypoxie, une modification des taux d'acides aminés et une hypocortisolémie tous à l'origine d'une restriction de croissance et d'une altération des organes (Jones et al., 1984; Supramaniam et al., 2006; Vuguin, 2007). De plus, une hypoxie en chambre induite entre le 14^{ème} et 21^{ème} jour de gestation s'accompagne d'une diminution de la quantité de nourriture ingérée par la mère telle que démontrée dans des modèles de restriction calorique (Huang et al., 2004; Tapanainen et al., 1994).

b- Modèles nutritionnels

Les modèles de RCIU les plus couramment étudiés sont ceux utilisant une restriction des apports nutritionnels telle qu'une restriction calorique ou une restriction protéique iso-calorique (Swanson and David, 2015; Vuguin, 2007). Ces modèles de RCIU sont d'autres bons modèles d'études de la programmation métabolique qui pour rappel correspond au processus par lequel un stimulus ou une altération des facteurs environnementaux à des stades de croissance critique pourrait avoir des répercussions sur la structure et la fonction des tissus.

Chez les rongeurs, une restriction calorique de 50% entre le 15^{ème} et le 21^{ème} jour de gestation (Garofano et al., 1997) ou de 30% entre le 7^{ème} jour et la fin de gestation (Vickers et al., 2000a) conduit à une réduction du poids de naissance d'environ 15%. En revanche, une restriction calorique entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour de gestation n'affecte pas le poids des petits à la naissance (Ergaz et al., 2005).

Une restriction calorique s'accompagne d'une réduction du nombre de cellules β pancréatiques (Garofano et al., 1997), d'une hyperphagie ainsi que d'une hyperinsulinémie (Vickers et al., 2000a). De plus, une restriction calorique de 50% conduisant à un RCIU, suivie d'un rattrapage de croissance, prédispose à l'obésité qui se reflète par une hyperphagie, une augmentation du poids corporel, du pourcentage de masse grasse ainsi que du taux plasmatique de leptine à l'âge adulte (Desai et al., 2005). Il apparaît donc dans ces modèles un certain nombre de caractères décrivant le syndrome métabolique chez l'homme. Des données obtenues dans d'autres modèles animaux de RCIU viennent renforcer la fiabilité du

phénotype induit par une malnutrition maternelle. En effet, chez le mouton, une restriction calorique de 50% entre le début et le milieu de gestation est à l'origine d'un RCIU qui entraîne à l'âge adulte une hypertension (Edwards and McMillen, 2002) et une hypertrophie ventriculaire (Vonnahme et al., 2003). Chez le cobaye, une restriction de 70% ou de 80% des apports nutritionnels au cours de la gestation réduit le développement fœtal et entraîne une hyperinsulinémie à l'âge adulte (Kind et al., 2003).

Une restriction protéique iso-calorique est également à l'origine d'un petit poids de naissance. Elle consiste à donner aux femelles gestantes un régime contenant un taux réduit de protéines (généralement 8% comparé à un régime standard contenant 20% de protéines chez les rongeurs) et ainsi à mimer un défaut de transfert placentaire des nutriments (Snoeck et al., 1990). Chez les rongeurs, une restriction protéique au cours de la période fœtale est à l'origine d'une hypertension (Langley and Jackson, 1994), d'une prédisposition au syndrome métabolique (obésité et diabète de type 2) et d'une dérégulation du comportement alimentaire caractérisée par une hyperphagie à l'âge adulte (Cottrell and Ozanne, 2008). Des données obtenues au laboratoire dans ce modèle viennent étayer ces observations et démontrent qu'une restriction protéique de 8% durant la période périnatale conduit à une hyperphagie transitoire pendant la période de croissance ainsi qu'à des défauts de satiété qui persistent à l'âge adulte (Coupe et al., 2009; Orozco-Solis et al., 2009). Ces animaux présentent également une préférence pour les aliments gras et sucrés (Coupe et al., 2009; Martin Agnoux et al., 2014).

L'ensemble de ces données expérimentales corrobore l'existence d'une association entre petit poids à la naissance et le risque de développer un syndrome métabolique notamment une obésité et un diabète de type 2 à l'âge adulte. De plus ces données étayent la théorie du DOHaD qui est le reflet de la programmation fœtale et de la nutrition précoce postnatale. Les données expérimentales issues des modèles animaux de RCIU mettent en avant l'intérêt qu'il y aurait à mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent les perturbations du comportement alimentaire associées à un RCIU. En effet, étant donné la prévalence du RCIU ainsi que la pandémie du syndrome métabolique et particulièrement de l'obésité, une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait permettre d'identifier de nouveaux marqueurs de dérégulation précoce de la prise alimentaire dans les cas de retard de croissance intra-utérin.

La régulation de la prise alimentaire implique une communication bidirectionnelle de l'axe intestin-cerveau. Elle est le reflet de l'intégration des signaux satiétogènes relayés par le nerf vague dans le noyau du tractus solitaire du tronc cérébral qui initie la satiété par voie réflexe. Ces informations périphériques sont également intégrées au niveau de

l'hypothalamus. S'il a été clairement démontré qu'un stress nutritionnel périnatal altère le système neuropeptidergique hypothalamique impliqué dans la régulation de la composante homéostatique de la prise alimentaire (Coupe et al., 2009; Orozco-Solis et al., 2009), il n'en est pas de même pour la communication entre l'intestin et le cerveau.

CHAPITRE II : PROGRAMMATION DE L'AXE INTESTIN-CERVEAU

Le comportement alimentaire, un processus essentiel à la survie d'un individu est contrôlé par des mécanismes homéostatiques, la faim, les envies et les sensations hédoniques. Un apport en nutriments nécessaires à l'équilibre énergétique (macronutriments et micronutriments) est soit utilisé pour des besoins métaboliques immédiats soit stocké sous forme de gras énergétique afin de faire face à une demande métabolique durant les phases de jeûne. La balance énergétique est dite équilibrée lorsque l'apport énergétique est égal aux dépenses énergétiques (**Figure 2**). L'adaptation aux besoins énergétiques de l'organisme fait suite à l'intégration des signaux sur le statut nutritionnel de l'organisme au niveau du SNC depuis la périphérie. Cette intégration est coordonnée par un ensemble de réseaux neuronaux retrouvés au sein des différents acteurs de régulation de la prise alimentaire. Ainsi, la balance énergétique est régulée de façon fine par un ensemble d'acteurs de l'axe intestin cerveau.

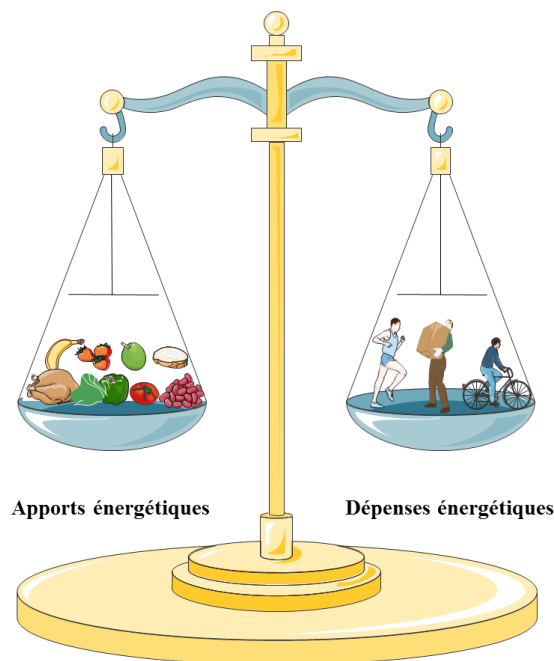


Figure 2 : La balance énergétique

La balance énergétique est équilibrée lorsque les apports énergétiques sont équivalents aux dépenses énergétiques.

1- Régulation de la prise alimentaire par l'axe intestin cerveau

La régulation de la prise alimentaire est dépendante des signaux périphériques métaboliques mais aussi digestifs, en provenance du tractus gastro-intestinal vers le système nerveux central (Havel, 2001; Rui, 2013; Sobrino Crespo et al., 2014) (Figure 3).

Au niveau cérébral, les centres régulateurs majeurs impliqués dans le contrôle du comportement alimentaire sont situés dans l'hypothalamus. Le tronc cérébral, et notamment le noyau du tractus solitaire, joue un rôle central dans ce processus puisqu'il intègre au niveau du complexe dorso-vagal moteur les signaux périphériques relayés par le nerf vague afférent vers les centres hypothalamiques. L'intestin est le premier acteur de cette régulation (Berthoud et al., 2006; Cummings and Overduin, 2007). En effet, les signaux qui régulent la prise alimentaire à court terme sont issus de la distension gastrique et la détection des nutriments grâce à des mécanorécepteurs et récepteurs sensoriels du tractus gastro-intestinal. En présence des nutriments, une réponse hormonale est initiée par la libération de peptides gastro-intestinaux par les cellules entéro-endocrines (CEE) du tractus digestif (Badman and Flier, 2005). Ces signaux peptidergiques sont par la suite intégrés par voie endocrine mais majoritairement *via* le nerf vague au niveau du tronc cérébral puis vers l'hypothalamus. Outre les signaux intestinaux de court terme, d'autres facteurs métaboliques tels que la sécrétion de leptine et d'insuline, des signaux indicateurs du statut énergétique de l'organisme, régulent l'homéostasie énergétique à long terme et le poids corporel (Rui, 2013; Shamansurova et al., 2016) (Figure 3).

La leptine est sécrétée par les adipocytes et le taux de leptine plasmatique est corrélé à la taille du tissu adipeux (Ahima et al., 2000; Myers et al., 2008; Schwartz and Porte, 2005). D'autres sources de leptine telles que l'intestin et l'estomac ont cependant été mises en évidence (Bado et al., 1998; Tavernier et al., 2014; Yarandi et al., 2011). L'insuline quant à elle est sécrétée par les cellules β du pancréas et sa libération est stimulée par la prise alimentaire notamment par les nutriments tels que le glucose et les acides aminés mais aussi par les hormones incrétines libérées par les CEE (Seino et al., 2010). Comme pour la leptine, la concentration plasmatique d'insuline est proportionnellement associée à la masse du tissu adipeux (Havel, 2001). Toutefois, ceci semble être la conséquence d'une diminution de la sensibilité à l'insuline lors d'un gain de poids. Les signaux adipeux sont intégrés dans le noyau arqué de l'hypothalamus qui exprime leurs récepteurs.

Le comportement alimentaire ne relève pas de cette seule composante homéostatique puisqu'il est aussi la résultante de l'intégration par le système cognitif de signaux qui

contribuent à l'hédonisme et à l'aversion (Berthoud, 2002, 2003; Laque et al., 2015; Rui, 2013; Simpson and Bloom, 2010).

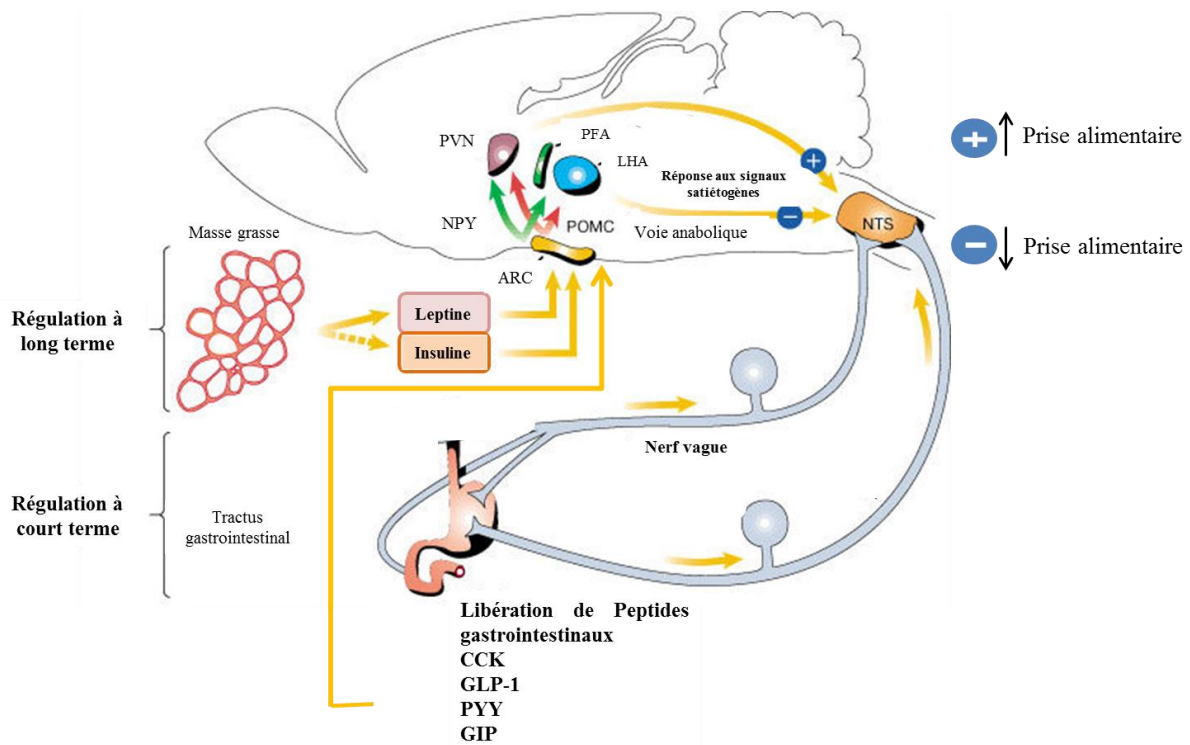


Figure 3 : Régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire par les signaux périphériques en provenance de la sphère digestive.

La régulation de la prise alimentaire dépend de signaux périphériques métaboliques et digestifs qui sont intégrés vers les centres hypothalamiques, régulateurs majeurs du comportement alimentaire. Les signaux qui régulent la prise alimentaire à court terme proviennent de l'intestin plus particulièrement des cellules entéroendocrines intestinales qui libèrent des peptides gastrointestinaux. Ces signaux peptidergiques sont intégrés via le nerf vague afférent dans le tronc cérébral puis vers l'hypothalamus. D'autres facteurs métaboliques tels que la leptine et l'insuline sont libérées par le tissu adipeux et régulent l'homéostasie énergétique à long terme et le poids corporel. *Adapté de Schwartz et al., 2000*

a- Intestin : premier acteur de la régulation de la PA par l'axe intestin - cerveau

En augmentant la surface d'échange (30 à 40 m²) avec la lumière intestinale, les villosités de la muqueuse intestinale participent à l'absorption des nutriments (Helander and Fandriks, 2014). L'épithélium de la muqueuse intestinale est constitué d'une monocouche de différents types cellulaires aux fonctions hyperspécialisées : absorption (entérocytes), sécrétion de mucus (cellules à gobelet), niche nourricière pour les cellules souches (cellules de Paneth) et production de peptides gastro-intestinaux (cellules entéro-endocrines (CEE))

pour ne citer que les principaux (De Santa Barbara, 2003; Kelly et al., 2004; Noah et al., 2011).

Les CEE sont des acteurs majeurs de la détection des nutriments qui arrivent dans la lumière intestinale. Ce « sensing nutritionnel » est opéré par une batterie de récepteurs aux nutriments exprimés par les CEE qui en réponse vont libérer des peptides gastro-intestinaux qui contrôlent les fonctions digestives et la prise alimentaire à court terme (Cummings and Overduin, 2007). Comme évoqué plus haut, lors de la prise alimentaire, la satiété est initiée par la distension gastrique et la libération des peptides gastrointestinaux (Kissileff et al., 2003). Cet état de non-faim détermine l'intervalle entre les repas et régule leur fréquence (Strubbe and Woods, 2004). Souvent confondu avec la satiété, le rassasiement est le processus qui favorise l'arrêt de la prise alimentaire limitant par conséquent la taille du repas (Blundell and Halford, 1994) et un des peptides clef impliqués dans sa régulation est la cholecystokinine (CCK) (Gibbs et al., 1973; Rehfeld, 2017b).

La CCK est sécrétée majoritairement par les CEE localisées dans le duodénum et régule principalement la prise alimentaire en ralentissant la vidange gastrique et en stimulant la sécrétion d'enzymes pancréatiques (Antin et al., 1975; Chandra and Liddle, 2007; Muurahainen et al., 1988; Rehfeld, 2017a). Elle est libérée en réponse aux acides gras à chaîne moyenne à longue ainsi que par les hydrolysats de protéines qui possèdent des récepteurs sur les CEE (Foltz et al., 2008; McLaughlin et al., 1999; Sidhu et al., 2000; Wang et al., 2002). Lors de la régulation de la prise alimentaire, les effets satiétogènes de la CCK sont potentialisés par la leptine et inhibés par la ghréline (Buyse et al., 2001; Date et al., 2005; de Lartigue et al., 2007; Peters et al., 2004) (Figure 4).

La libération de la CCK se produit 20 à 30 mn après l'ingestion d'un repas, au moment où l'estomac commence à déverser son contenu dans l'intestin grêle et ses effets physiologiques sur le comportement alimentaire sont médiés *via* le récepteur CCKR1. Moran et al., (Moran et al., 1998) ont démontré que l'hyperphagie et l'obésité observées chez le rat Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) sont associées à l'absence de récepteurs à la CCK. De plus, chez l'homme son blocage par des antagonistes spécifiques tels que le lorglumide favorise la prise alimentaire et induit une sensation de faim continue (Beglinger et al., 2001). Par ailleurs, le rat soumis à un régime obésogène (DIO) ainsi que le rat Sprague Dawley standard sous régime gras présentent une diminution de la sensibilité aux effets satiétogènes de la CCK pouvant conduire à une hyperphagie et par conséquent un gain de poids (Duca et al., 2013; Niederau et al., 1997; Swartz et al., 2010). Les afférences du nerf vague sont les cibles majeures de la CCK pour la stimulation des sécrétions enzymatiques et

l'inhibition de la vidange gastrique par voie réflexe. Toutefois la CCK agit aussi directement sur les cellules pancréatiques et les cellules musculaires de l'estomac.

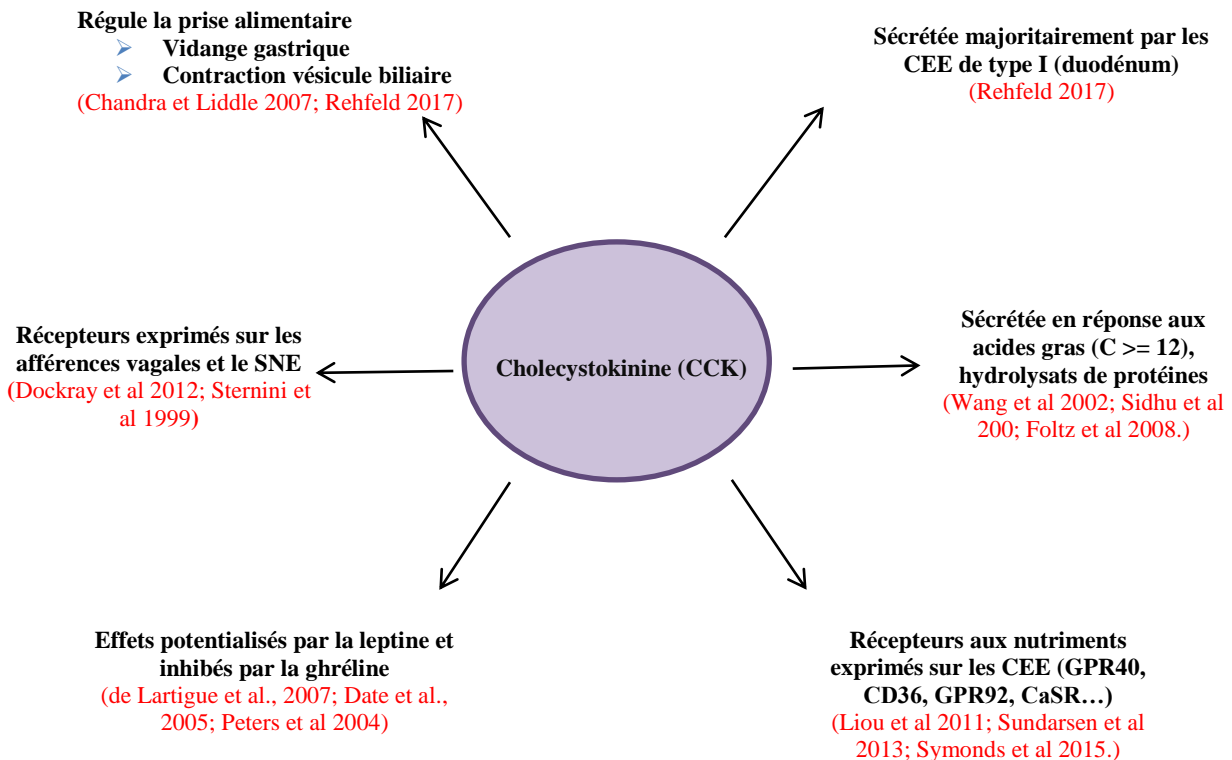


Figure 4 : La cholécystokinine : mécanismes de sécrétion et effets

La cholécystokinine (CCK) régule la prise alimentaire et est le peptide clef de la satiété. Elle est principalement libérée par les cellules entéroendocrines (CEE) de type I localisées majoritairement dans le duodénum en réponse aux nutriments tels que les acides gras à chaînes moyennes et longues. Sa libération nécessite que les CEE qui la sécrètent expriment des récepteurs spécifiques aux nutriments. Les effets de la CCK sont potentialisés par la leptine et les afférences du nerf vague qui expriment des récepteurs à la CCK sont les principales cibles de cette dernière.

Alors que l'inhibition de la prise alimentaire est contrôlée par une multitude d'hormones (CCK, PYY, GLP-1, GIP...), sa stimulation serait uniquement sous le contrôle de la ghréline une hormone orexigène (Cummings et al., 2005; Furness et al., 2013; Strader and Woods, 2005) (Tableau 5). Bien que ce rôle orexigène de la ghréline soit controversé, chez le rongeur et chez l'homme quelques études expérimentales ont permis de montrer que la ghréline augmente la prise alimentaire (Cummings et al., 2004; Tschop et al., 2000; Wren et al., 2001). Cependant, quelques données indiquent que plus que la ghréline, ce serait l'activité de l'enzyme ghrelin O-acetyltransferase (GOAT) qui l'acyle qui stimulerait la prise alimentaire (Kirchner et al., 2010; Tong et al., 2008). En effet cette acétylation spécifique à la

ghréline semble importante pour l'activation de son récepteur et pour son activité (Al Massadi et al., 2011; Stengel and Tache, 2012).

Cellules	Peptides	Localisations	Principaux effets dans la PA
A	Ghréline, Nefastine-1	Estomac	Stimule la PA,
G	Gastrine	Estomac	Stimulation de la sécrétion d'acide gastrique
D	Somatostatine	Estomac, intestin grêle (et pancréas)	Inhibition de la libération de gastrine (de tous les peptides GI) Modulation de la libération d'insuline
EC	5-HT	Estomac, intestin grêle, côlon	Stimulation de la motricité intestinale
I	CCK	Intestin grêle proximal	Contraction de la vésicule biliaire Libération d'enzymes pancréatiques
K	GIP	Intestin grêle proximal	Stimulation de la libération d'insuline
L	GLP-1, GLP-2, PYY, oxyntomoduline	Intestin grêle distal	Stimulation de l'absorption des glucides Ralentissement du transit intestinal,
M	Motiline	Intestin grêle	Motricité
N	Neurotensine	Intestin grêle, côlon	Inhibition des contractions intestinales
p	Leptine	Estomac	Réduction de la prise alimentaire
S	Sécrétine	Intestin grêle proximal	Réduction de l'acidité dans l'intestin grêle proximal suite à la libération de bicarbonate (HCO ₃ ⁻)

Tableau 5 : Les différents peptides gastrointestinaux qui contrôlent la prise alimentaire.

GIP = Peptide insulino dépendant du glucose, PYY = Peptide Y Y, GLP-1 = Glucagon like peptide 1, EC = cellules entérochromaffines, sécrétrices de sérotonine (5-HT). Adapté de Furness et al., 2013

b- Nerf vague afférent : principal relais de l'axe intestin-cerveau

Les afférences du nerf vague sont des cibles des peptides gastro-intestinaux, et notamment de la CCK dont les effets satiétogènes sont inhibés chez le rat vagotomisé (Schwartz et al., 1999; Smith et al., 1985). Elles possèdent des récepteurs à la CCK (Li et al., 1997; Rogers and Hermann, 2008) et leur lésion favorise la prise alimentaire alors qu'une lésion des voies efférentes n'a pas d'effet (Smith et al., 1985).

Plus récemment, il a été montré chez le rat que le nerf vague afférent pouvait synthétiser des neuropeptides orexigènes tels que le neuropeptide Y et la mélanin-concentrating hormone (NPY, MCH) ou anorexigènes comme le cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) et exprimait les récepteurs à ces neuropeptides (Burdyga et al., 2006; de Lartigue, 2014; de Lartigue et al., 2007; Zheng et al., 2002). Ces études chez le rat ont montré que cette plasticité neurochimique était modulable par le statut nutritionnel des animaux, permettant ainsi une régulation fine du déclenchement ou de l'arrêt de la prise alimentaire. De façon très intéressante, ces auteurs ont montré que la CCK était le chef d'orchestre de ce « switch » du phénotype vagal (Burdyga et al., 2004; de Lartigue et al., 2007; Dockray, 2009a) (Figure 5).

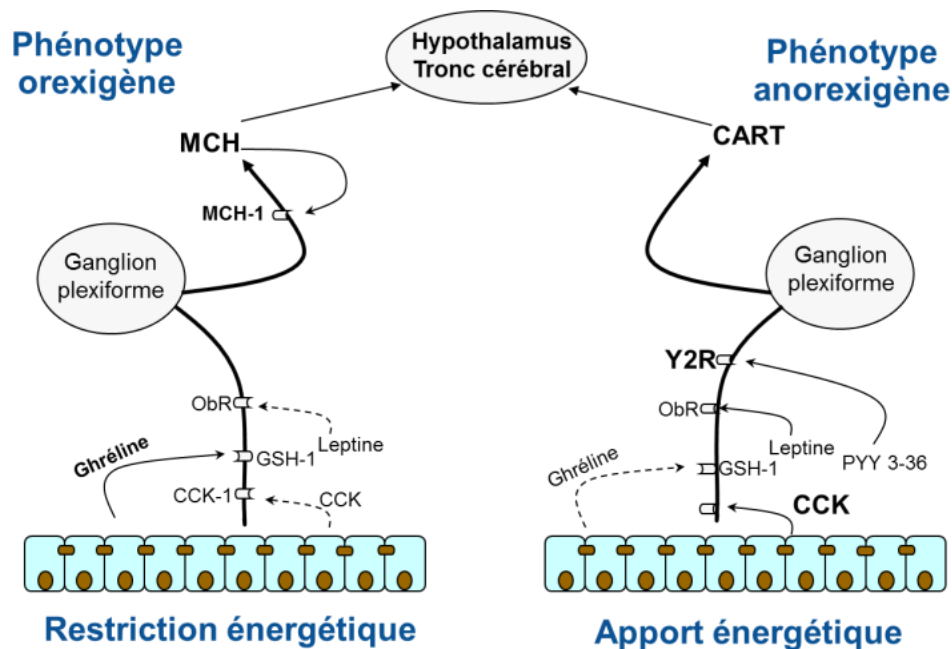


Figure 5 : Switch phénotypique vagal opéré par la CCK.

Selon le statut énergétique, les afférences du nerf vague adopte deux états. Face à un apport énergétique, la sécrétion de CCK est stimulée et les afférences vagues adoptent un phénotype anorexigène associé à la libération de molécules qui inhibent la prise alimentaire (CART, Y2R). En revanche, face à une restriction énergétique l'expression de molécules impliquées dans la stimulation de la prise alimentaire est stimulée conduisant à un phénotype orexigène (MCH). *Adapté de Dockray 2009, 2012*

En condition de jeûne, lorsque la concentration plasmatique de CCK est faible, les afférences vagues présentent un phénotype qui va être en faveur d'une stimulation de l'appétit. Ceci se traduit par une augmentation de l'expression vagale de MCH et de la diminution de CART. Ces modifications s'accompagnent de l'augmentation de l'expression

des récepteurs aux neuropeptides anorexigènes cannabinoïde (CB1) et MCH-R (Burdyga et al., 2006; Dockray, 2009a). A l'opposé, un apport énergétique est à l'origine de la libération de la CCK. Ceci entraîne une diminution de l'expression de MCH, CB1 et MCH-R et une augmentation de CART et des récepteurs Y2R sur lesquels se fixe le PYY, conduisant ainsi à l'inhibition de la prise alimentaire (Burdyga et al., 2008; Burdyga et al., 2004; Burdyga et al., 2006; Koda et al., 2005).

L'ensemble de ces études a apporté des données novatrices dans la compréhension de la communication de l'axe intestin-cerveau. Dans le cadre de notre question sur la programmation de l'appétit, nous nous sommes particulièrement intéressés à ce switch phénotypique vagal en faisant l'hypothèse que son altération par une dénutrition périnatale pourrait contribuer aux défauts de satiété de nos rats nés avec un RCIU.

c- Tronc cérébral : relais intégrateur des signaux afférents

Le rôle du tronc cérébral dans la régulation de la prise alimentaire a été mis en évidence chez des rats décérébrés chez qui une satiété peut être induite (Grill and Norgren, 1978) prouvant ainsi que le tronc cérébral seul suffit à induire une satiété.

Le tronc cérébral occupe une place centrale dans l'intégration des signaux périphériques et centraux impliqués dans la régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire, puisqu'il reçoit au sein du NTS les afférences du nerf vague, des projections efférentes hypothalamiques, et possède également des récepteurs aux peptides gastro-intestinaux (Badman and Flier, 2005; Ellacott and Cone, 2004; Schwartz, 2006). Les neurones du NTS expriment également des récepteurs à la leptine et à l'alpha mélanocyte stimulating hormone (α MSH) deux autres facteurs impliqués dans la mise en place de la satiété. En effet l'administration de ces hormones active le tronc cérébral et réduit la prise alimentaire (Emond et al., 2001; Kishi et al., 2003; Mountjoy et al., 1994; Sutton et al., 2005). Ces données sont en concordance avec celles obtenues dans d'autres études qui montrent que lors de la prise alimentaire, l'expression du marqueur d'activité neuronale c-fos est augmentée dans le NTS et que cette activation est associée à une réduction de la prise alimentaire (Berthoud et al., 2001; Rinaman et al., 1998; Zittel et al., 1994).

Des études plus récentes ont permis d'identifier de nouveaux réseaux neuronaux du tronc cérébral pouvant être impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire. Ainsi, dans le noyau dorsal (DRN), l'activation des neurones exprimant le GABA (Vgat) et le glutamate (VGLUT3) est directement régulée par la balance énergétique (Nectow et al., 2017). En effet chez le rat en période de jeûne, l'activation des neurones Vgat inhibe les neurones VGLUT

induisant ainsi une stimulation de la prise alimentaire (Nectow et al., 2017). A l'opposé un apport nutritionnel stimule les neurones VGLUT3 et conduit à un arrêt de la prise alimentaire (Nectow et al., 2017) (Figure 6).

Ces données indiquent que ces neurones du DRN avec ceux du NTS, joueraient également un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire.

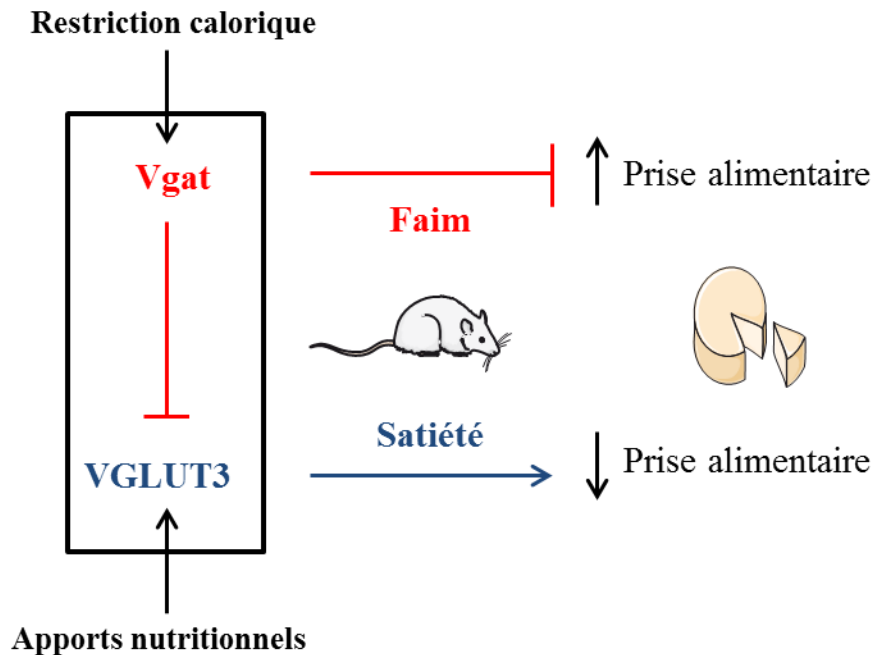


Figure 6 : Régulation de la prise alimentaire par les neurones Vgat et VGLUT3 situés au niveau du noyau dorsal du tronc cérébral.

Dans le tronc cérébral, l'activation des neurones Vgat et VGLUT3 est régulée par la balance énergétique. Lors d'un apport nutritionnel, l'activation des neurones VGLUT3 conduit à un arrêt de la prise alimentaire. En revanche en période de restriction calorique, l'activation des neurones Vgat entraîne une inhibition des neurones VGLUT3 stimulant ainsi la prise alimentaire. Adapté de Nectow et al., 2017.

Les interactions entre le tronc cérébral et l'hypothalamus sont cependant essentielles pour mettre en place la réponse adéquate face aux signaux métaboliques tels que la leptine et l'insuline (Grill and Kaplan, 2002). En effet, les projections du tronc cérébral particulièrement celles émanant du NTS innervent les centres paraventriculaire (PVN), ventro-médian (VMH), dorso-médian (DMH) et l'aire hypothalamique latérale (LHA) de l'hypothalamus (Bellinger and Bernardis, 2002; Renner et al., 2010). De plus des connexions afférentes des neurones de l'hypothalamus exprimant les neurones pro-opiomélanocortine (POMC)/CART et NPY/l'agouti related peptide (AgRP) ont été identifiés (Geerling et al., 2010; Woods, 2005).

d- Hypothalamus : centre régulateur homéostatique de la prise alimentaire

Le rôle de l'hypothalamus dans la régulation de la prise alimentaire a été mis en évidence suite à des expériences de lésions hypothalamiques. En effet chez le rat, une lésion du centre de satiété situé dans le noyau ventromédian entraîne une hyperphagie continue et par conséquent conduit à l'obésité (Hetherington and Ranson, 1983; Penicaud et al., 1983; Suga et al., 1999). A l'opposé, une lésion du noyau latéral où se trouve le centre de l'appétit, entraîne une diminution de la prise alimentaire spontanée pouvant conduire à la mort (Hetherington and Ranson, 1983; Lytle and Campbell, 1975).

Chacun des centres hypothalamiques synthétise des neuropeptides impliqués dans la régulation positive ou négative du comportement alimentaire. Les neurones du noyau latéral expriment la MCH un peptide orexigène qui régule la prise alimentaire à court et long terme. L'injection de MCH augmente la prise alimentaire et le poids chez le rat (Della-Zuana et al., 2002). Outre ces deux noyaux majeurs, l'hypothalamus possède d'autres centres régulateurs du comportement alimentaire dont le noyau arqué (ARC).

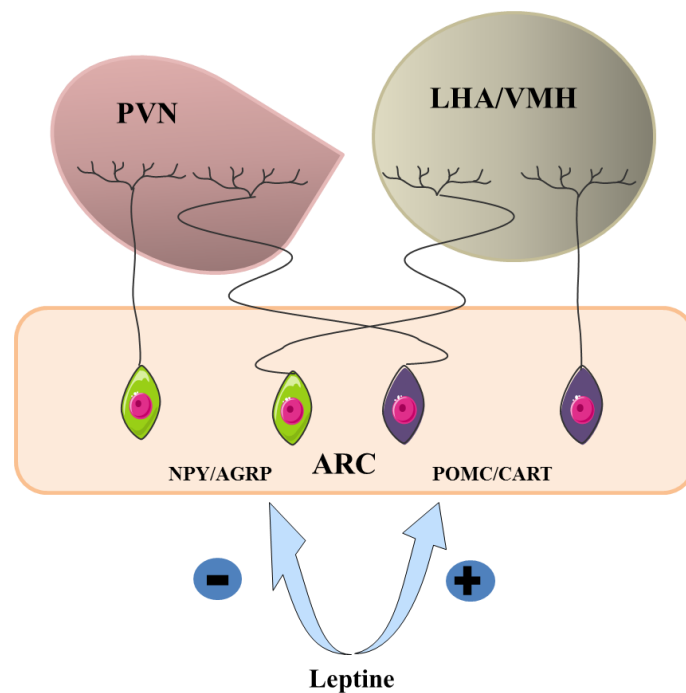


Figure 7 : Neurones du noyau arqué de l'hypothalamus.

Dans le noyau arqué (ARC) on distingue en vert les neurones orexigènes et en violet les neurones anorexigènes respectivement inhibés et activés par la leptine. Ces neurones émettent des projections vers les neurones de second ordre contenus dans le noyau paraventriculaire (PVN), l'aire hypothalamique latérale (LHA), le noyau ventromédian (VMH) et le noyau dorsomédian (DMH). NPY : neuropeptide Y, AGRP : agouti-related protein, POMC : proopiomélanocortine, CART : cocaine and amphetamine-regulated transcript. Adapté de Schwartz et al., 2000

L'ARC situé à la base de l'hypothalamus (Millington, 2007) contient deux populations de neurones ayant des fonctions opposées et régulées par la leptine (Coll et al., 2007; Sahu, 2003, 2004) (Figure 7). D'une part, on distingue les neurones orexigènes inhibés par la leptine qui co-expriment le NPY dont le niveau d'expression est modulé par le statut nutritionnel (Kalra et al., 1991) et les effets compensés par l'AgRP (Beck, 2001) et qui, à forte dose, entraîne une hyperphagie (Hagan et al., 2000). D'autre part, les neurones anorexigènes stimulés par la leptine co-expriment la POMC dont la délétion résulte en une obésité (Challis et al., 2004; Yaswen et al., 1999) et CART. Le clivage de la POMC génère plusieurs peptides dont l' α -MSH un peptide également anorexigène co-exprimé avec CART (Tritos et al., 1998). Ces deux populations de neurones projettent leurs axones vers d'autres noyaux tels que le PVN situé à proximité de l'ARC mais aussi le VMH, le DMH et la LHA (Figure 7).

Ainsi, les différents acteurs de l'axe intestin-cerveau contrôlent la prise alimentaire en assurant une communication bidirectionnelle allant de l'intégration des signaux périphériques vers une régulation par voie réflexe à partir du complexe dorso-vagal du tronc cérébral. L'intégration de ces signaux au niveau de l'hypothalamus permet une réponse adaptative aux besoins métaboliques de l'individu en modulant la fréquence et la taille des repas. Une dérégulation de l'axe intestin-cerveau peut affecter de façon permanente la régulation de l'homéostasie énergétique et un déséquilibre de la balance énergétique même minime peut augmenter le risque de développer un syndrome métabolique. Cependant, si les effets d'un stress nutritionnel périnatal sur le système hypothalamique sont actuellement bien décrits, ses effets sur la composante vagale et le système enteroendocrine le sont très peu.

2- Programmation des centres hypothalamiques

Le développement du système nerveux consiste en la différenciation et la migration des neurones, la formation des synapses et la croissance des axones. Le cerveau étant toujours plastique lors du développement postnatal, l'environnement périnatal est donc déterminant pour le développement des voies de régulation physiologique, métabolique et nerveuse de l'homéostasie énergétique.

De nombreuses études ont démontré que les altérations nutritionnelles périnatales ont un impact sur le système neuropeptidergique hypothalamique. Chez le rat, une restriction calorique maternelle de 50% entre le 10^{ème} et le 21^{ème} jour réduit le niveau d'expression génique de POMC au cours du développement postnatal et cette réduction s'explique par une baisse considérable du niveau plasmatique de la leptine (Delahaye et al., 2008). De plus il a été démontré que la leptine a un effet neurotrope contrôlant ainsi le développement des

circuits hypothalamiques (Ahima et al., 1998; Bouret et al., 2004; Bouret and Simerly, 2004; Proulx et al., 2002). En effet, au cours du développement postnatal, plus précisément au cours de la deuxième semaine de vie, la concentration de leptine est plus importante chez le raton que chez le rat adulte (Ahima et al., 1998). Toutefois, ce pic néonatal de leptine n'est associé ni à une augmentation de la masse du tissu adipeux ni à une diminution de la prise, alimentaire, mais refléterait une résistance aux effets de la leptine chez le nouveau-né.

En revanche, chez l'Homme un RCIU entraîne une diminution du taux de leptine à la naissance qui pourrait contribuer à la programmation du syndrome métabolique à long terme (Djiane and Attig, 2008; Jaquet et al., 1998). Cette même observation a été faite chez le rat chez qui, une restriction calorique maternelle de 50% est à l'origine d'une diminution du taux plasmatique de leptine pouvant contribuer au petit poids de naissance (Desai et al., 2005). Cette programmation nutritionnelle est réversible lorsqu'un traitement à la leptine a lieu durant les phases où les organes sont encore plastiques. En effet un traitement à la leptine au cours du développement postnatal (du 3^{ème} au 13^{ème} jour) permet de rattraper la croissance et de restaurer les paramètres métaboliques (Attig et al., 2008; Vickers et al., 2005)

Comme évoqué précédemment, une restriction protéique maternelle altère la régulation de la prise alimentaire au cours de la croissance et à l'âge adulte. Ces altérations sont associées à une augmentation du niveau d'expression hypothalamique des neuropeptides orexigènes (AgRP et NPY) et à une diminution des peptides anorexigènes tels que POMC (Coupe et al., 2010; Orozco-Solis et al., 2009). Ces modifications sont à l'origine d'une hyperphagie transitoire au cours du développement postnatal et d'une dérégulation de la satiété à l'âge adulte (Orozco-Solis et al., 2009). De plus, une restriction protéique périnatale module le phénotype des neurones hypothalamiques puisqu'elle diminue le nombre de neurones AgRP et α -MSH. Toutefois, ces modifications sont atténuées lorsque les animaux ont fait face à un rattrapage de croissance (Coupe et al., 2010).

La prolifération et la différenciation des neurones de l'ARC sont aussi affectées par une restriction calorique de 50% chez le rat. Dans ce modèle de RCIU, il a été démontré que le niveau d'expression des gènes Notch1 et Hair/Enhancer of Split (Hes1) qui contrôlent la différenciation et la prolifération des neurones est significativement diminué. Cette réduction de l'expression génique est associée à la diminution du nombre de cellules progénitrices qui donnent naissance aux neurones de l'ARC (Desai et al., 2011).

L'ensemble de ces données expérimentales indique que les circuits hypothalamiques impliqués dans la régulation de la PA sont sensibles à l'environnement nutritionnel maternel.

Cette programmation métabolique en période fœtale et postnatale semble donc bien contribuer au risque d'apparition du syndrome métabolique à l'âge adulte

3- Programmation du nerf vague

Contrairement aux études sur les centres hypothalamiques, très peu d'études se sont intéressées à la programmation du nerf vague et de ses fonctions. A ce jour une seule étude supporte l'hypothèse d'une possible programmation du nerf vague dû à un stress nutritionnel maternel. En effet au cours de la lactation, une restriction protéique maternelle chez le rat est à l'origine d'une inhibition de l'activité électrique des afférences vagales à l'âge adulte (de Oliveira et al., 2011). Ceci est associé à une réduction des effets insulinothropes cholinergiques des cellules β pancréatiques conduisant à une dérégulation de l'homéostasie glucidique notamment une intolérance au glucose et une hypo-insulinémie (de Oliveira et al., 2011).

Toutefois, d'autres données indiquent que le nerf vague serait sensible au statut nutritionnel. Chez le rat obèse, une modulation de la fonction du nerf vague pouvant conduire à une résistance à la leptine et à une réduction des effets satiétogènes de la CCK a été décrite (de Lartigue et al., 2012). Dans une autre étude chez la souris, il a été démontré une réduction significative de la sensibilité des afférences du nerf vague aux effets satiétogènes d'un régime obésogène (Daly et al., 2011). A ceci s'ajoute une diminution de l'excitabilité de la membrane cellulaire des neurones afférents du nerf vague (Daly et al., 2011).

Comme démontré chez le rat obèse, il est envisageable qu'une malnutrition périnatale puisse également être à l'origine d'une programmation du nerf vague pouvant conduire à une diminution de la sensibilité vagale. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que les principaux systèmes intégrateurs des signaux périphériques sont programmables. De plus, outre les centres hypothalamiques et le nerf vague, le NTS semble également programmable puisqu'une restriction protéique périnatale augmente l'activation des neurones du NTS et par conséquent la taille des repas chez le rat adulte (Lira et al., 2014).

La régulation du comportement alimentaire est dépendante de l'intégration des signaux provenant de la périphérie vers le SNC. Au niveau central, elle est sous le contrôle du nerf vague qui sert de relais d'information, du tronc cérébral principal centre intégrateur et de l'hypothalamus centre régulateur de l'homéostasie, tous trois faisant l'objet d'une programmation pouvant conduire à un syndrome métabolique. Cette modulation est également associée à une dérégulation de la prise alimentaire et de la mise en place de la satiété. Les CEE jouent un rôle majeur dans cette régulation grâce au « sensing nutritionnel »

qui consiste en la détection des nutriments. Ce sensing nutritionnel comme évoqué en début de chapitre conduit à la libération de peptides gastrointestinaux dont la CCK.

CHAPITRE III : PROGRAMMATION DE LA FONCTION ENDOCRINE INTESTINALE ?

Les CEE sont le premier maillon de cette régulation et de façon très intéressante, il a été démontré que les CEE sont en contact physique avec le système nerveux entérique (SNE) qui servirait de relais pour l'intégration des signaux périphériques *via* le nerf vague (Bohorquez et al., 2014; Bohorquez et al., 2015; Ye and Liddle, 2017). Les cellules entéro-endocrines sont issues de la même cellule souche que les autres types cellulaires de l'épithélium intestinal notamment les cellules absorbatives (**entérocytes**) et les cellules sécrétrices (**cellules de Paneth** et **cellules à mucus**) (Andrew et al., 1998; Barker et al., 2010; van der Flier and Clevers, 2009). Un certain nombre de données qui vont être présentées dans ce chapitre, suggère que ces types cellulaires font l'objet d'une programmation. Aussi, il est tout à fait concevable que les CEE puissent également être une cible de programmation par l'environnement périnatal. Un stress nutritionnel lors de la période périnatale pourrait ainsi moduler : (i) la prolifération, la différenciation et la fonction endocrine intestinale des CEE (ii) les interactions entre les CEE et le SNE.

1- Programmation fœtale de l'intestin : des données issues des modèles animaux nés avec un RCIU

Chez les mammifères, le développement de l'intestin est très organisé et résulte en la formation d'un épithélium intestinal spécialisé ayant pour rôle principal d'assurer la digestion et l'absorption des nutriments. Chez l'homme, le développement du tube digestif débute précocement dès le premier trimestre de gestation, tandis que chez le rat, les phases de maturation sont de courte durée mais se produisent tardivement à la fin de la gestation (Sangild, 2006). Le développement et la maturation de l'intestin, ainsi que les fonctions qu'il régule (notamment la motricité et la perméabilité), dépendent des facteurs environnementaux notamment nutritionnel durant cette période qui orientent son profil de développement (Commare and Tappenden, 2007; Sangild, 2006). La perte des entérocytes à vacuoles, qui permettent le passage des protéines du colostrum et du lait de la lumière intestinale à travers l'épithélium, est un processus caractéristique de la maturation intestinale (Skrzypek et al., 2007). Chez le porc, les entérocytes à vacuoles disparaissent progressivement vers le 21^{ème}

jour postnatal et sont remplacés par des entérocytes matures (Skrzypek et al., 2007). De récentes études ont montré que, selon le segment intestinal considéré, le RCIU augmente de 4 à 10% le nombre d'entérocytes à vacuoles (Ferenc et al., 2017) et retarde leur perte, entraînant ainsi une maturation de l'intestin (Ferenc et al., 2014; Mickiewicz et al., 2012) et un rattrapage de croissance tardifs (Mickiewicz et al., 2012).

Comme évoqué dans le premier chapitre, les enfants nés avec un RCIU ou prématurément présentent une susceptibilité accrue à développer des pathologies gastro-intestinales telles que l'entérocolite nécrosante, une intolérance alimentaire et le SII (Bengtson et al., 2006; Bernstein et al., 2000; Bozzetti et al., 2013; Commare and Tappenden, 2007; March et al., 2014). Ces pathologies s'accompagnent souvent d'une architecture intestinale altérée. Des données expérimentales obtenues dans des modèles de RCIU (rat (Fanca-Berthon et al., 2009) et porc (Dong et al., 2014a; Ferenc et al., 2014; Mickiewicz et al., 2012)) indiquent que l'intestin est bien soumis à une programmation fœtale qui se traduit par des altérations de son développement et de son architecture. Chez le porc, le RCIU réduit le poids et la taille de l'intestin dès la naissance et à ces altérations morphologiques s'ajoutent une réduction du niveau d'expression des hormones de croissance (récepteur à l'insuline et de l'hormone de croissance GH), reflétée par une perturbation de l'homéostasie endocrine intestinale et une diminution de la vitesse de croissance (Wang et al., 2005). Outre ces altérations morphologiques, chez le rat, le RCIU altère la structure des villosités (Dong et al., 2014b). Il entraîne également une diminution de la dynamique cellulaire des organes gastrointestinaux (Xu et al., 1994), plus spécifiquement du nombre de cellules sécrétrices iléales telles que les cellules à mucus et les cellules de Paneth (Dong et al., 2014b; Fung et al., 2016) et des cellules prolifératives (Fung et al., 2016). Comme pour le RCIU, une restriction calorique postnatale du sevrage jusqu'à l'âge adulte réduit aussi le nombre de cellules à mucus suggérant ainsi que les cellules épithéliales sécrétrices sont sujettes à une programmation nutritionnelle (Schoffen et al., 2014). Du fait que les CEE se différencient à partir des mêmes cellules progénitrices produisant ces cellules, il est tout à fait possible que leur prolifération et/ou leur différenciation soit de la même façon affectée par un stress nutritionnel périnatal altérant ainsi leur fonction de « sensing » nutritionnel.

2- Cellules entéro-endocrines : une composante de la muqueuse intestinale elle-même programmable

a- Cellules entéro-endocrines : un organe diffus au sein de l'épithélium intestinal

Les CEE sont disséminées dans l'épithélium des muqueuses digestives et ne sont donc pas regroupées en un organe défini. Elles sont localisées tout le long du tractus digestif dans les villosités mais également dans les cryptes. Pour la majorité, ces cellules ont une forme ovale avec un pôle apical présentant des microvillosités qui pour certaines CEE avec une structure « ouverte » s'étendent jusque dans la lumière intestinale contrairement à celles avec une structure « fermée » (Date et al., 2000; Eissele et al., 1992) (Figure 8). Les CEE ont pour fonction principale de réguler la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique grâce à la libération de peptides gastro-intestinaux faisant suite à la détection des nutriments de la lumière intestinale (Kaji and Kaunitz, 2017). Les produits de synthèse des CEE sont accumulés dans des granules sécrétoires situés au pôle basal et libérés par exocytose du côté de la membrane basolatérale où ils peuvent agir localement de façon paracrine ou sur des cibles plus éloignées par voie endocrine (Sternini et al., 2008). En revanche, les CEE qui ont une structure « fermée » seraient indirectement régulées par voie nerveuse (Hofer et al., 1999; Sternini et al., 2008).

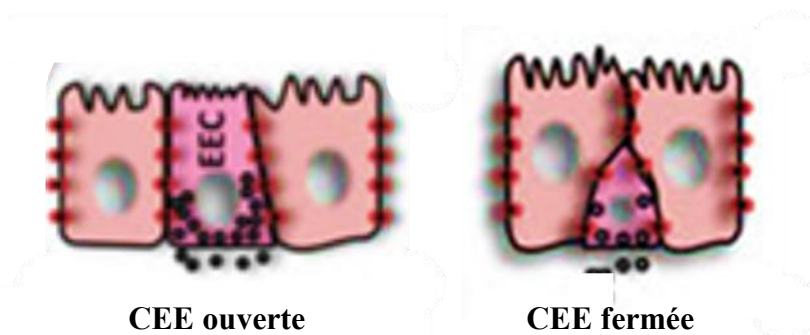


Figure 8 : Représentation schématique des structures fermée et ouverte des cellules entéro-endocrines.

Adapté de Latorre et Sternini 2016.

Les CEE représentent 1% des cellules épithéliales du tractus digestif mais sont malgré tout très diversifiées constituant ainsi le plus vaste système endocrinien de l'organisme (Ahlman and Nilsson, 2001; Moran et al., 2008; Posovszky, 2017). En effet on dénombre au moins 15 différents types cellulaires qui ont été classés sur la base du principal peptide sécrété, leur localisation et l'ultrastructure de leurs granules de sécrétion (Engelstoft et al., 2013a; Rindi et al., 2004) (Figure 9) (Tableau 5). Ces différents types de CEE produisent une

trentaine de peptides impliqués dans la régulation de la balance énergétique (Moran-Ramos et al., 2012). En dehors des peptides qu'elles sécrètent, les CEE expriment la chromogranine A (Chgr A), un marqueur spécifique à tous les types de CEE et qui joue un rôle essentiel dans la libération des peptides gastro-intestinaux. En effet, la Chgr A est stockée dans les vésicules de sécrétion où elle clive les pro-hormones en hormone fonctionnelle et est libérée en même temps que les autres peptides (Deftos, 1991; Mahata et al., 2002). Cependant, il a été démontré que la Chgr A ne serait pas le seul marqueur caractéristique des CEE (Nagatake et al., 2014; Rindi et al., 2004; Thanasupawat et al., 2013). En effet, quelques études indiquent qu'il existerait d'autres marqueurs caractéristiques de toutes les CEE tels que la synaptophysine (Rindi et al., 2004). Néanmoins, cette dernière semble être spécifique d'une sous-population de CEE caractérisée par la présence de vésicules synaptiques (SLMVs) tandis que la ChgrA serait spécifique des CEE à larges vésicules (LDCVs) (Gunawardene et al., 2011; Rindi et al., 2004; Varndell et al., 1985; Wiedenmann et al., 1986). Par ailleurs, les CEE partagent avec les cellules neuronales un certain nombre de marqueurs neuroendocriniens tels que le PGP9.5 retrouvés dans le cytoplasme et qui pourrait également être considéré comme un autre marqueur potentiel des CEE (Bishop et al., 1988; Rindi et al., 2004). De plus, il a été démontré qu'au niveau de l'intestin proximal la claudine 4 une protéine de jonction serrée impliquée dans la régulation de la perméabilité paracellulaire pourrait être considérée comme un autre marqueur des CEE (Nagatake et al., 2014). En effet, Nagatake et al., ont démontré que les CEE qui expriment Chgr A expriment également la claudine 4 de façon sélective et abondante. En revanche dans le côlon, le peptide insulín like-5 (INSL5) une hormone orexigène qui stimule donc la prise alimentaire serait un marqueur des CEE de type L sécrétrices de GLP-1 (Grosse et al., 2014; Thanasupawat et al., 2013).

b- Nomenclature évolutive grâce aux modèles transgéniques de Knock-In

Traditionnellement, la nomenclature des CEE est basée sur le type de peptide majoritaire sécrété (**Figure 9**). Cependant, cette nomenclature devrait disparaître puisqu'il a été démontré qu'une CEE donnée peut sécréter un ou plusieurs peptides différents (Egerod et al., 2012; Habib et al., 2012; Sykaras et al., 2014). Grâce à la disponibilité des modèles de souris transgéniques (**Modèles Knock In (KI)**) qui expriment une protéine fluorescente sous le contrôle du promoteur d'un gène codant pour un peptide spécifique, l'étude des différentes populations de cellules est facilitée (**Tableau 6**). Ces modèles sont utilisés pour la caractérisation spécifique des différentes sous-populations de CEE. En effet, l'expression sélective d'une protéine fluorescente permet d'isoler et de purifier les cellules par des

approches de tri cellulaire (fluorescence assisted cell sorting (FACS)) (Engelstoft et al., 2013a). A l'issue de ce tri, des analyses ciblées de transcriptome permettent d'étudier d'une part la différenciation et d'autre part la fonction des CEE (Egerod et al., 2012; Engelstoft et al., 2013a; Sykaras et al., 2014).

De plus, le développement d'organoïdes intestinaux permet de suivre le devenir des cellules souches intestinales (Basak et al., 2017; Sato et al., 2011). Ainsi, les modèles organoïdes in vitro représentent un outil incontournable pour l'étude de processus physiologique in vivo tels que le renouvellement tissulaire, les fonctions des cellules souches et la réponse tissulaire à des stimuli (Fatehullah et al., 2016). Grâce à cet outil, les mécanismes moléculaires à l'origine de la différenciation des cellules souches en cellules intestinales ont été mieux caractérisés (Drozdowski et al., 2010; Jung et al., 2017).

Espèces	Promoteur	Reporteur	Références	Cellules marquées
Souris	Pro-CCK	eGFP	Chandra et al., 2010 Egerod et al., 2012 Sykaras et al., 2014 Liou et al., 2011,	Cellules CCK
Souris	Pro-GLP-1	Venus	Tolhurst et al., 2011 Habib et al., 2012	Cellules GLP-1
Souris	Pro-GIP	Venus	Habib et al., 2012	Cellules GIP
Souris	Pro-CCK	eGFP	Wang et al., 2011	Cellules CCK
Souris	Pro-PYY	eGFP	Bohorquez et al., 2011, 2014, 2015	
Souris	LGR5	eGFP	Basak et al., 2017	Cellules souches duodénales
Souris	Chromogranine A	eGFP	Bellono et al., 2017	EC

Tableau 6 : Liste non exhaustive des modèles knock In utilisés pour étudier les CEE.

EC = cellules entérochromaffines, sécrétrices de sérotonine (5-HT). Adapté de Furness 2013

Egerod et al., ont montré chez des souris CCK-eGFP que les cellules qui sécrètent la CCK dans le duodénum co-expriment la sécrétine, le GIP, le GLP-1 et le PYY (Egerod et al., 2012). De la même façon, les cellules L qui sont connues pour produire le GLP1, le GLP2 et

le PYY sécrètent aussi d'autres hormones telles que le GIP et la CCK (Habib et al., 2012). De même, chez l'homme, une analyse immunohistochimique du côlon a démontré que la somatostatine, la sérotonine (5-HT) le GLP-1 et le PYY peuvent être sécrétés par les mêmes CEE (Martins et al., 2017). Cependant, si une CEE peut sécréter plusieurs types de peptides, il semblerait que ces derniers soient stockés à des niveaux subcellulaires différents, au sein d'une même cellule (Fothergill et al., 2017). Ainsi, selon leur localisation dans le tube digestif, ces cellules sécrètent un peptide spécifique de la fonction attendue à cet endroit. En conséquence, dans l'intestin, chaque peptide est sécrété **majoritairement** dans un segment donné (duodénum, jéjunum, iléon ou côlon) (Furness et al., 2013; Latorre et al., 2016; Martin et al., 2017). Par exemple, la CCK est principalement sécrétée dans le duodénum tandis que le GLP-1 est produit dans le côlon (Moran-Ramos et al., 2012). Toutefois, il existe des différences selon les espèces : alors que la CCK n'est pas exprimée dans le côlon chez l'homme et le rat, elle l'est chez la souris (Fakhry et al., 2017). Au vu de ces nouvelles données, d'autres auteurs ont proposé une nouvelle nomenclature des CEE prenant en compte d'une part la localisation de la CEE, l'espèce étudié et l'expression du gène d'un peptide spécifique (Drucker, 2016) ou d'autre part le peptide majoritaire sécrété et la localisation de la CEE (Helander and Fandriks, 2012).

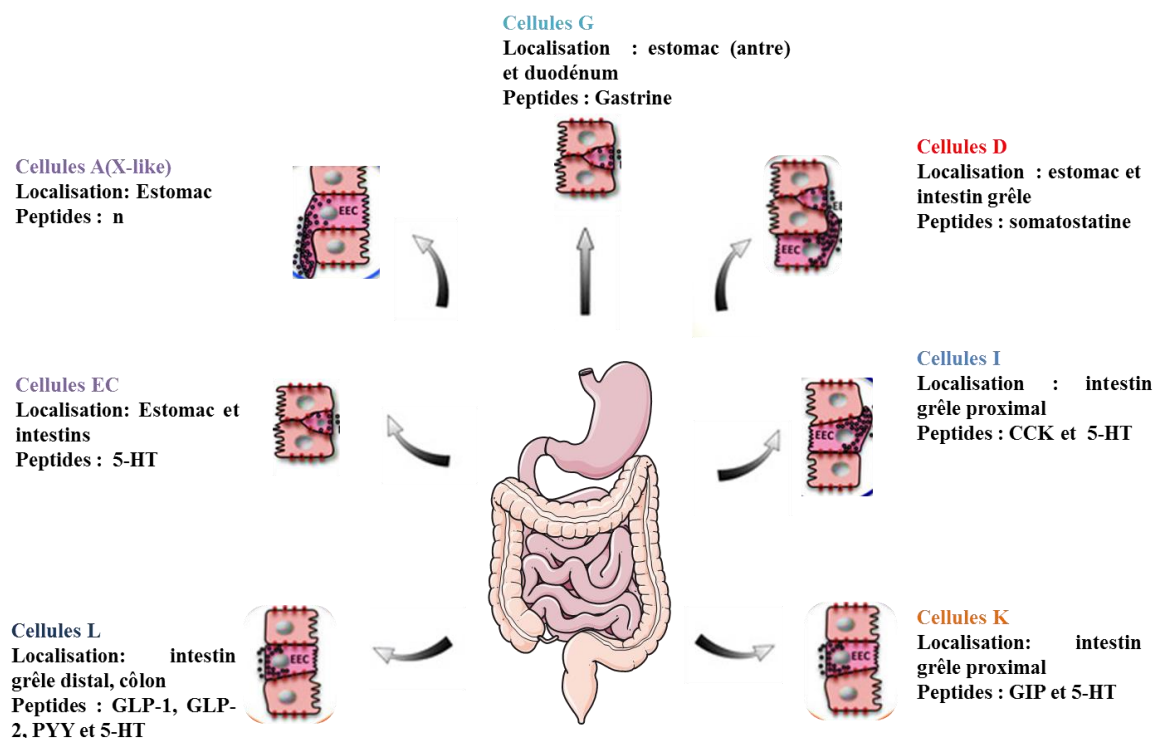


Figure 9 : Nomenclature classique des différentes sous population de cellules entéro-endocrines et leur localisation dans le tractus gastro-intestinal.

Traditionnellement, la nomenclature des cellules entéroendocrines est basée sur le type de peptide majoritairement sécrété. [Adapté de Latorre, Sternini et al. 2016.](#)

c- Programmation de l'intestin endocrine : des données indirectes et/ou éparses

CEE et syndrome de l'intestin irritable, des données indirectes: Les CEE jouant un rôle majeur dans la régulation des fonctions digestives en lien avec la régulation de la prise alimentaire telles que l'absorption et la motricité, il a été démontré dans certaines pathologies gastro-intestinales que le développement du système endocrine était altéré ([El-Salhy et al., 2014](#); [Mazzawi and El-Salhy, 2017](#); [Moran and Leslie, 2008](#)). Dans l'intestin distal des individus souffrant du SII, les populations de cellules progénitrices de la lignée endocrine ([El-Salhy and Gilja, 2017](#); [El-Salhy et al., 2013](#)) particulièrement la sous population de CEE sécrétrices de sérotonine ([El-Salhy and Gilja, 2017](#); [El-Salhy et al., 2012](#)) et de PYY ([El-Salhy et al., 2012](#)) sont réduites. De même, au sein du duodénum, la densité des CEE sécrétrices de CCK, GIP, somatostatine et sécrétine, toutes majoritairement retrouvées au niveau de l'intestin proximal, est également diminuée ([El-Salhy et al., 2010](#)). Toutefois, cette réduction du nombre de CEE est réversible puisqu'un régime alimentaire appauvri en monosaccharides et en fibres insolubles en combinaison avec des probiotiques conduit à un rétablissement du nombre de CEE ([El-Salhy and Gundersen, 2015](#); [Mazzawi and El-Salhy, 2017](#); [Mazzawi et al., 2015](#)). Ces données indiquent que les CEE peuvent faire l'objet d'une programmation puisqu'une modulation du régime alimentaire peut impacter la différenciation des CEE

Stress nutritionnel périnatal et CEE, quelques études chez le porc : D'autres études toutes aussi récentes que celles précédemment décrites ont montré qu'une perturbation nutritionnelle au cours de la lactation pourrait altérer le développement du système endocrine. Chez le porc, le RCIU réduit le nombre de CEE duodénales (positives en immunomarquage Chgr A) de la naissance jusqu'à l'âge de 14 jours ([Radlowski et al., 2014](#)). De plus, comparé à un allaitement maternel, un allaitement exclusif par des formules lactées augmente le nombre de CEE suggérant un effet du régime au cours du développement postnatal ([Radlowski et al., 2014](#)). Ces modifications du nombre de CEE en fonction du poids de naissance ou du régime de lactation sont associées à des altérations plus spécifiques du nombre de CEE sécrétrices de

sérotonine et de somatostatine (Radlowski et al., 2014)¹. De plus, une restriction calorique postnatale du sevrage jusqu'à l'âge de 90 jours, augmente considérablement le nombre de CEE sécrétrices de sérotonine chez le porc (Schoffen et al., 2014).

Ces données, bien que peu nombreuses, viennent étayer l'hypothèse d'une programmation des CEE par une altération nutritionnelle au cours de la période périnatale. La différenciation de la lignée endocrine étant sous le contrôle d'une multitude de gènes cette programmation périnatale pourrait particulièrement affecter leur expression.

3- Renouvellement des CEE adultes : une cible potentielle de la PM

Les cellules souches intestinales situées au fond des cryptes sont pluripotentes et ont la capacité de produire des cellules progénitrices transitoires qui elles-mêmes donnent naissance aux différents types cellulaires de l'épithélium intestinal (Noah et al., 2011; van der Flier and Clevers, 2009) (Figure 10).

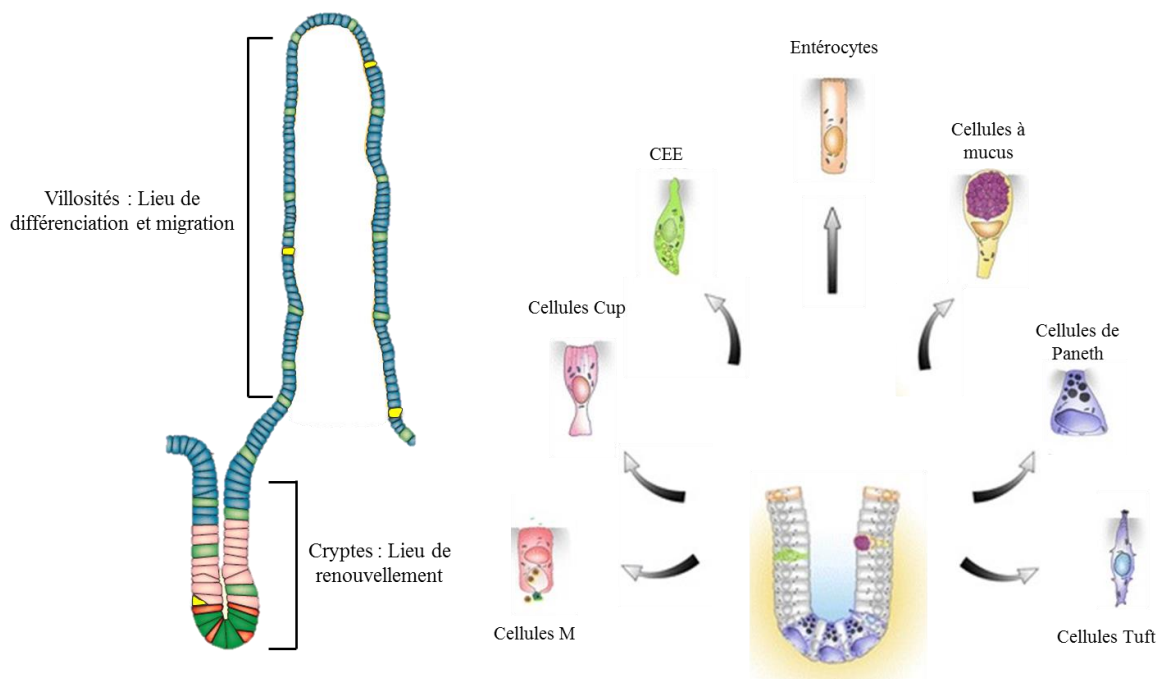


Figure 10 : Les sept différentes populations de cellules épithéliales intestinales.

Les cellules souches intestinales donnent naissance aux différents types cellulaires de l'épithélium intestinal : les entérocytes, les cellules sécrétrices (cellules de Paneth, cellules à mucus, CEE et cellules tuft), Les cellules M et les cellules Cup. Adapté de Gerbe et al., 2011 et Gerbe et al., 2012

¹ Xuejin ZHANG, Influence of food intervention on enteric nervous system and enteroendocrine cells development in a small for gestational age piglet model, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2015, p 83

Les cellules souches intestinales s'auto-renouvellent indéfiniment permettant ainsi une différenciation permanente des cellules épithéliales. En effet, chez l'homme le renouvellement des cellules souches a lieu toutes les 24 à 36 heures tandis que la différenciation et la migration des progéniteurs transitoires à laquelle elles donnent naissance se font toutes les 24 à 48 heures (Radtke and Clevers, 2005). Ces cellules différenciées migrent à l'apex des villosités où elles sont éliminées par un mécanisme apoptotique appelé l'anoïkis. Elles sont ainsi exfoliées dans la lumière intestinale en 2 à 3 jours chez le rat et en 4 à 5 jours chez l'homme (Radtke and Clevers, 2005).

La différenciation et la maturation des CEE se produisent au cours de la migration des cellules dans la villosité. Comme pour toutes les cellules épithéliales, la différenciation des CEE sécrétrices est assurée par une cascade de signalisation qui fait intervenir différents gènes de différenciation (**Figure 11**) (Brittan and Wright, 2004; Cheng and Leblond, 1974; Engelstoft et al., 2013a; Li et al., 2011; May and Kaestner, 2010a; Posovszky, 2017; Qi and Chen, 2015; Schonhoff et al., 2004a, b; van der Flier and Clevers, 2009).

Les voies de signalisation Wnt et Notch sont essentielles pour garder les cellules souches intestinales situées au fond des cryptes dans un état indifférencié. L'activation de la voie de signalisation Notch entraîne la transcription des gènes de la famille Hes qui codent pour des répresseurs transcriptionnels (Jarriault et al., 1995; Tian et al., 2015). Dans l'intestin, Hes1 réprime Math1, un facteur de transcription pro endocrinien de la famille bHLH (basic helix-loop-helix) favorisant ainsi la différenciation des progéniteurs en entérocytes au détriment de la lignée sécrétrice (Jensen et al., 2000; van der Flier and Clevers, 2009). De plus, l'activation de la voie de signalisation Notch empêche la différenciation de deux cellules épithéliales adjacentes en CEE par inhibition latérale, isolant ainsi les CEE les unes des autres (Apelqvist et al., 1999; Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Gunawardene et al., 2011).

A l'opposé, l'activation de la voie de signalisation Wnt favorise la transcription de Math1 et cette étape est indispensable pour la différenciation des progéniteurs en cellules sécrétrices² (Li et al., 2012; May and Kaestner, 2010b; Schonhoff et al., 2004b; Shroyer et al., 2007; Yang et al., 2001). Math1 agit en amont de Neurogenin3 (Ngn3) le principal facteur de différenciation du progéniteur de la lignée sécrétrice en CEE (Gradwohl et al., 2000; Jenny et al., 2002). Enfin, Ngn3 va activer différents facteurs de transcription qui jouent un rôle important dans la différenciation terminale de la population endocrine (Desai et al., 2008; Hill et al., 1999; Larsson et al., 1998; May and Kaestner, 2010a; Mutoh et al., 1997a; Mutoh et al.,

² Les cellules épithéliales sécrétrices sont les cellules entéro-endocrines, les cellules à mucus et les cellules de Paneth.

1998; Naya et al., 1997; Offield et al., 1996). Parmi eux, on peut citer quelques facteurs de la famille paired box (Pax4 et Pax6), homeobox (Nkx2.2, PDX1) et bHLH (NeuroD/Bêta2) (May and Kaestner, 2010b). Des données obtenues par des études de traçage de la lignée endocrine ont démontré que dans le duodénum et le jéjunum, une délétion de Pax4 réduit significativement le nombre de CEE sécrétrices de sérotonine, sécrétine, CCK, GIP et PYY tandis que dans l'estomac elle diminue uniquement celles sécrétrices de sérotonine et de somatostatine (Beucher et al., 2012; Larsson et al., 1998). La délétion de Pax6 un facteur de transcription de la même famille, activé par Ngn3 empêche la formation des cellules à GIP dans le duodénum (Larsson et al., 1998). Ces données suggèrent que les gènes Pax4 et Pax6 orientent le devenir des CEE majoritairement localisées au niveau de l'intestin proximal. Plus spécifiquement, la différenciation des CEE qui sécrètent la CCK est sous le contrôle de NeuroD (Mutoh et al., 1997b; Naya et al., 1997).

Ces données, relativement anciennes pour la plupart, sont à ce jour les seules à démontrer l'implication de ces gènes dans la différenciation plus fine des différentes sous-populations de CEE.

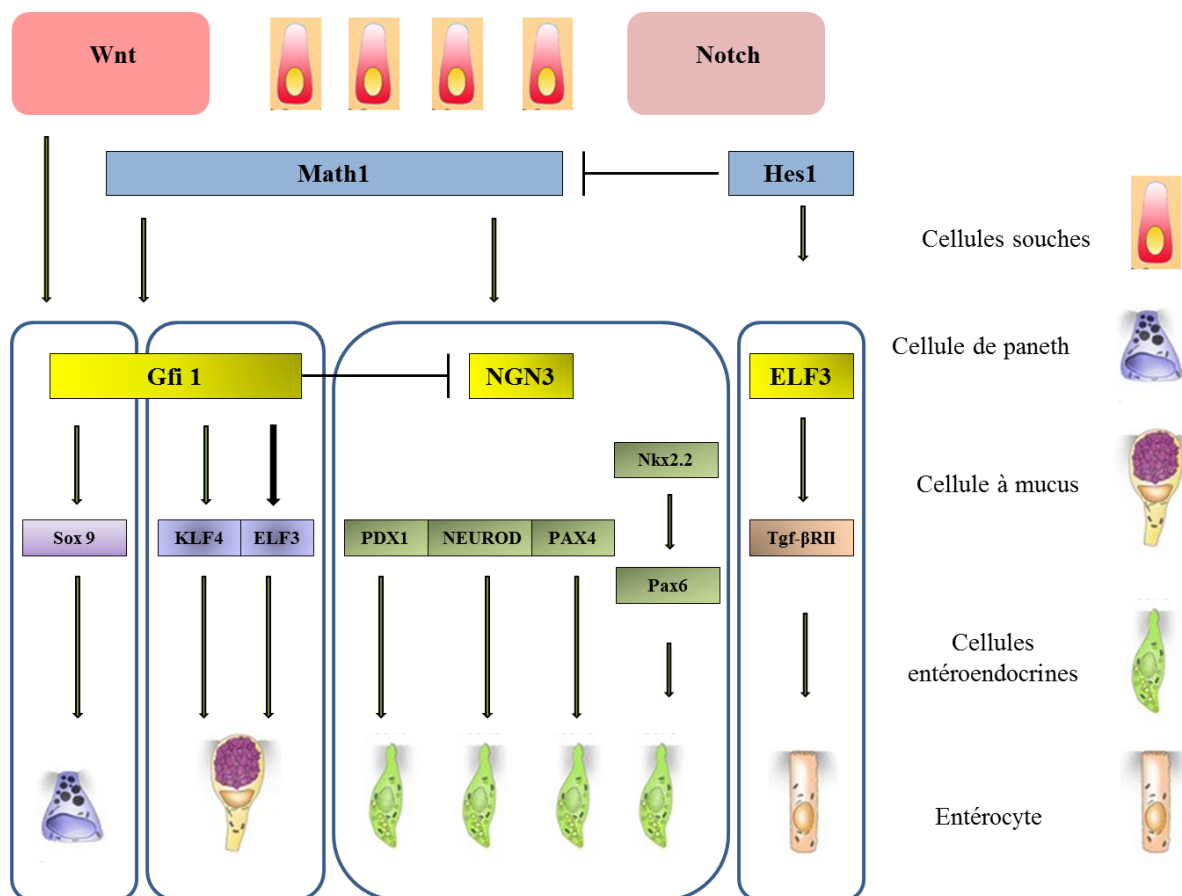


Figure 11 : Différenciation des cellules épithéliales intestinales

Cascade de gènes impliqués dans la différenciation des principales cellules qui composent l'épithélium intestinal. Adapté de Van der Flier et al., 2009

4- Intestin endocrine : un acteur majeur du « sensing » nutritionnel intestinal

Dans l'intestin, le contenu luminal est détecté par les cellules de l'épithélium intestinal. S'agissant des nutriments, on parle de « sensing » nutritionnel.

L'activation des CEE suite à la détection des nutriments résulte en la sécrétion de peptides gastro-intestinaux. Pour les CEE, le « sensing » nutritionnel est facilité par le fait qu'elles sont polarisées avec de longues microvillosités du côté apical qui se projettent vers le côté basolatéral. Les peptides gastro-intestinaux ainsi libérés agissent notamment via le nerf vague et le système nerveux entérique afférent qui expriment les récepteurs correspondants afin de moduler une multitude de réponses physiologiques telles que la motricité gastro-intestinale, l'homéostasie glucidique et l'appétit (Buchan, 1999; Dockray, 2004; Parker et al., 2009; Rasoamanana et al., 2012; Sufian et al., 2006) (Figure 12).

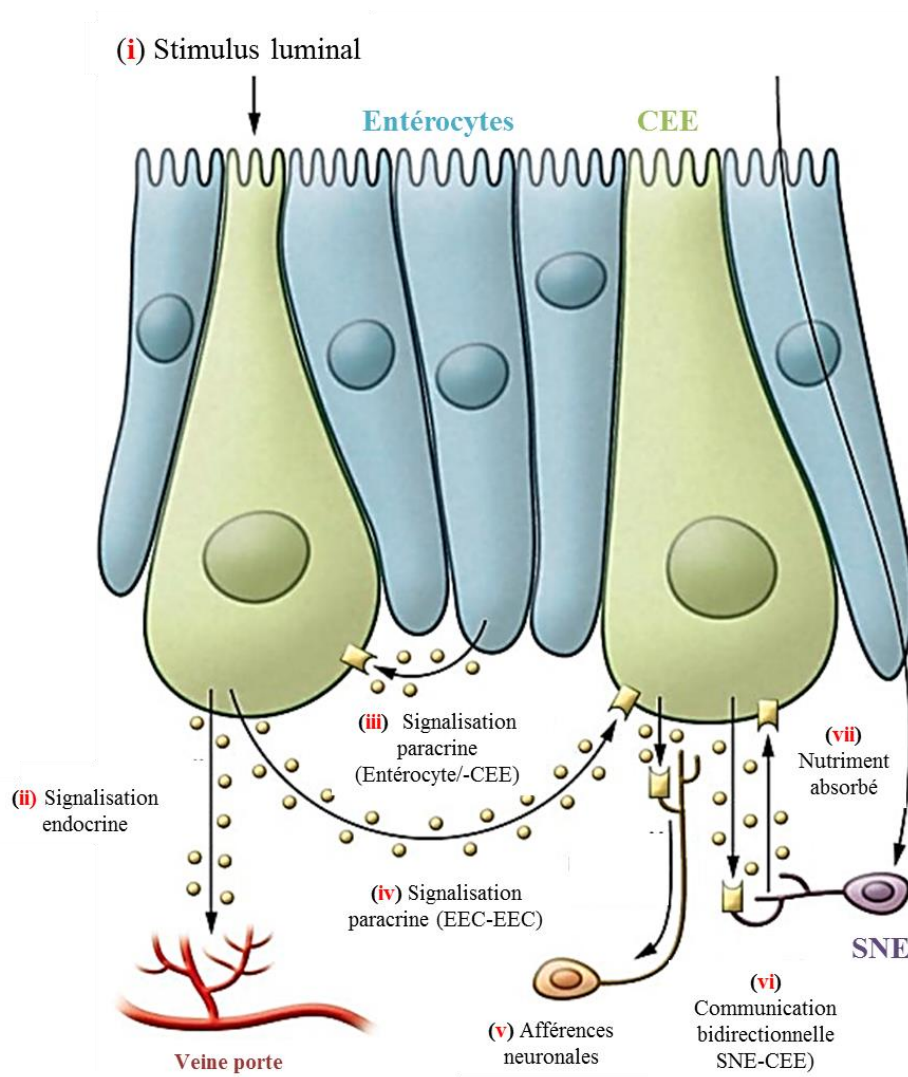


Figure 12 : Communication neuroendocrine au niveau intestinal.

(i) La sécrétion des peptides gastrointestinaux par les CEE est stimulée par les stimuli de la lumière intestinale notamment à travers des récepteurs couplés aux protéines G et des transporteurs. Les peptides ainsi sécrétés médient leurs effets par différentes voies de signalisation : (ii) par voie endocrine ; par voie paracrine impliquant (iii) les entérocytes et (iv) les CEE ; (v) les afférences vagales, (vi) le système nerveux entérique. (vii) Les neurones entériques sont aussi capables de détecter directement les nutriments absorbés. [Adapté de Psichas et al., 2015](#)

Il existe également d'autres voies de signalisation qui permettent de relayer les effets des peptides gastrointestinaux. Celles-ci impliquent la voie endocrine qui correspond à l'absorption de ces signaux dans la circulation sanguine et la voie paracrine à travers la stimulation de récepteurs situés du côté basolatéral des entérocytes ou des CEE à proximité (**Figure 12**).

Par ailleurs, la sécrétion d'un peptide gastro-intestinal peut être elle-même modulée par d'autres peptides gastro-intestinaux. En effet, il a été démontré que la somatostatine, sécrétée par des CEE localisées tout le long de l'intestin grêle, régule négativement la libération des autres peptides gastro-intestinaux ([Brubaker, 1991](#); [Engelstoft et al., 2013b](#)). De plus, d'autres interactions entre la libération de GIP et de ghréline d'une part ([Rudovich et al., 2011](#)) et la CCK, le PYY et la ghréline d'autre part ont été décrites ([Degen et al., 2007](#)).

Chaque peptide est sécrété en réponse à un ou des nutriments spécifiques issus de la digestion des protéines, des glucides et des lipides ([Ezcurra et al., 2013](#)). Les CEE possèdent à leur surface une batterie de récepteurs leur permettant de répondre à une variété de stimuli faisant d'elles des senseurs nutritionnels « idéaux » ([Hofer et al., 1999](#); [Symonds et al., 2015](#)) (**Tableau 7**). Du fait qu'elles soient dispersées et très peu représentées au sein de l'épithélium intestinal, les CEE sont difficiles à étudier. Cependant, comme évoqué précédemment, la disponibilité des modèles KI a permis l'identification des récepteurs impliqués dans leur fonction de « sensing » nutritionnel ([Liou et al., 2011a](#); [Psichas et al., 2015a](#); [Wang et al., 2011](#)) (**Tableau 6**). La prédominance de ces récepteurs dans un segment ou l'autre du tractus digestif est très variable chez l'homme comme chez la souris et leur stimulation conduit à l'activation de diverses voies de signalisation ([Symonds et al., 2015](#)).

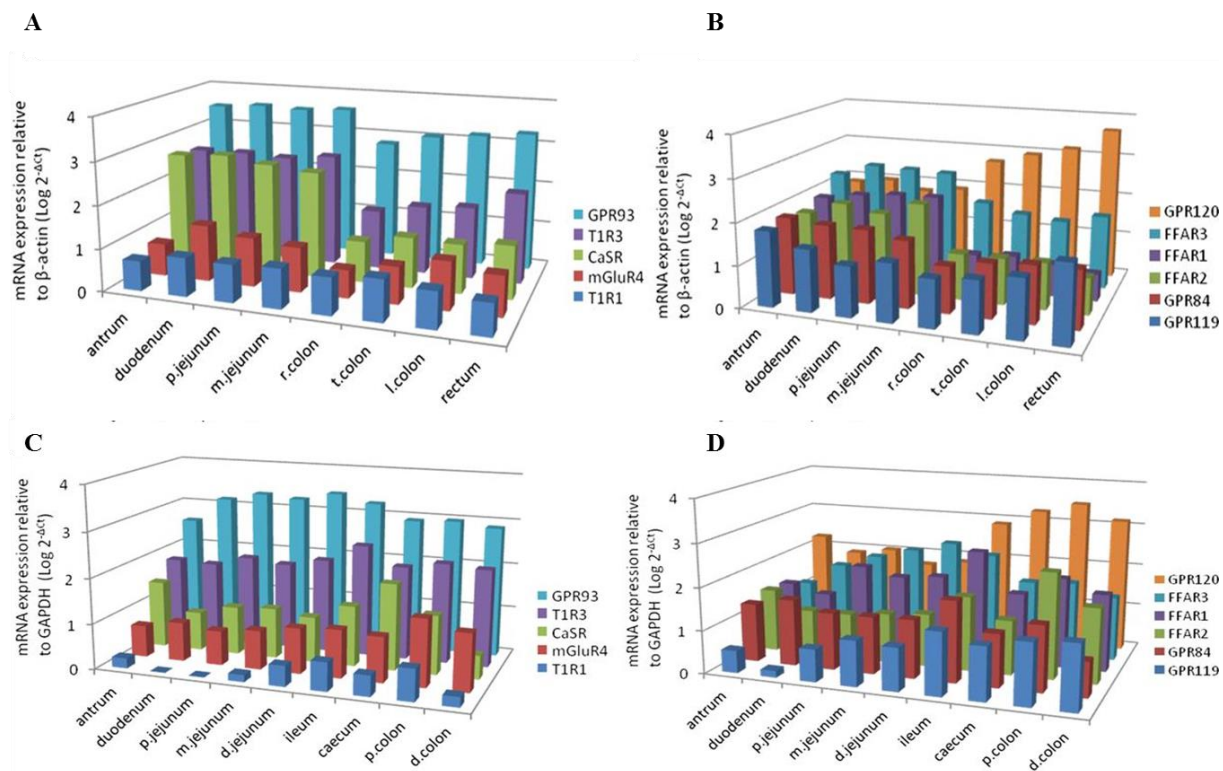


Figure 13 : Niveau d'expression des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) le long du tractus digestif.

Pour les glucides et les acides aminés chez l'homme (A) et chez la souris (C) ; pour les acides gras à chaînes longues et courtes chez l'homme (B) et chez la souris (D). Selon l'espèce considérée, ces récepteurs sont exprimés différemment le long du tractus digestif. [D'après Symonds et al., 2015.](#)

Bien que le système entéro-endocrine constitue un « senseur » majeur des nutriments, il a été démontré, grâce à l'utilisation d'organoïdes, que les entérocytes ont également la capacité de détecter, après absorption par le transporteur GLUT5, les métabolites du fructose ([Patel et al., 2015a](#); [Patel et al., 2015b](#)). De plus des données nouvelles indiquent qu'en plus des entérocytes, les cellules de Paneth et les cellules à mucus sont aussi capables de détecter le fructose ([Kishida et al., 2017](#)).

a- Plusieurs populations de cellules détectent le glucose et contribuent à l'effet incrétine

L'effet incrétine

Le GIP et le GLP-1 sont des hormones incrétines libérées respectivement par les CEE K et L en réponse au glucose circulant ([Gutierrez-Aguilar and Woods, 2011](#); [Zietek and Daniel, 2015](#)) (**Figure 9**). Lorsque la glycémie est élevée, leur libération favorise la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques qui possèdent des récepteurs spécifiques au GIP

(GIPR) et au GLP1 (GLP1-R) (Gremlich et al., 1995; Kazafeos, 2011; Stoffel et al., 1993; Thorens, 1992; Wheeler et al., 1995). Chez le rat, l'activation de ces récepteurs conduit à la libération d'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPC) et par conséquent à la libération d'insuline (Drucker et al., 1987; Seino et al., 2010; Szczowka et al., 1982). Ces données ont été confirmées chez l'homme (Vollmer et al., 2008) et le porc (Knapper et al., 1995) chez qui une administration orale de glucose stimule la sécrétion de GIP et de GLP-1 conduisant à une augmentation du taux d'insuline plasmatique. Ainsi, chez les individus qui souffrent d'un diabète de type 2, la diminution de la concentration de GIP et de GLP-1 conduit à une diminution de la sécrétion d'insuline et par conséquent à une perturbation de l'homéostasie glucidique (Holst et al., 2011; Toft-Nielsen et al., 2001; Vilsbøll and Holst, 2004; Vilsboll et al., 2001).

Mécanismes moléculaires du « sensing » du glucose

L'effet du glucose sur la sécrétion des hormones incrétines est médié par le co-transporteur de glucose /sodium (SGLT1) localisé du côté luminal des cellules L mais aussi au niveau des entérocytes (Ezcurra et al., 2013; Gorboulev et al., 2012; Gribble et al., 2003) (Tableau 7). Il s'agit d'un transport actif de type symport qui utilise un gradient sodique pour faire entrer du glucose dans la cellule même à très faibles concentrations. Ces entrées sodiques génèrent des courants faibles estimés insuffisants pour stimuler les canaux calciques voltage-dépendants. La fermeture des canaux potassiques ATP dépendants permet la genèse de courants à l'intérieur de la cellule conduisant à la dépolarisation membranaire et à la naissance d'un potentiel d'action. Cette activité électrique sera alors suffisante pour permettre une entrée calcique (Reimann et al., 2008; Reimann et al., 2012). La compréhension de ces voies de signalisation a été facilitée grâce à la genèse de lignées cellulaires telles que les cellules GLUTag une lignée murine stable de CEE qui sécrète le GLP-1 et les cellules Venus qui expriment le proglucagon isolées d'un modèle de souris KI (Reimann et al., 2008) (Tableau 6) (Figure 14).

Une inhibition pharmacologique de ce co-transporteur par la phlorizine réduit la libération du GLP-1 et du GIP. En revanche, son activation par des substrats métabolisables conduit à une dépolarisation membranaire, une entrée massive de calcium dans la cellule et par conséquent à la libération d'hormones (Parker et al., 2012; Reimann et al., 2008; Ritzel et al., 1997; Sykes et al., 1980). Bien que la stimulation des peptides en réponse au glucose luminal passe majoritairement par le co-transporteur SGLT1, un autre mécanisme pouvant impliquer les récepteurs au goût sucré a été décrit (Kojima and Nakagawa, 2011). En effet, il

a été démontré que l' α -gustducine est exprimée par les CEE qui produisent le GIP et le GLP-1 suggérant une détection directe du goût sucré par ces cellules (Jang et al., 2007; Laffitte et al., 2014; Margolskee et al., 2007; Nomura and Kawahara, 2015; Sutherland et al., 2007). Cependant d'autres études viennent infirmer cette hypothèse en ne reproduisant pas la libération de GLP-1 et de GIP suite à une administration d'édulcorants artificiels chez le rat (Fujita et al., 2009) ou l'Homme (Ma et al., 2009). Du côté basolatéral, le glucose est détecté par le transporteur GLUT2 situé au niveau des CEE notamment les CEE L (Mace et al., 2012; Reimann et al., 2008; Roder et al., 2014) et des entérocytes (Ait-Omar et al., 2011; Kellett and Helliwell, 2000; Thorens, 2015) (Figure 14). Dans l'intestin, GLUT2 un transporteur impliqué dans le métabolisme du glucose régule son absorption et assure sa distribution aux autres organes. Des données récentes indiquent que chez la souris, une invalidation du gène qui code pour GLUT2 conduit à une malabsorption du glucose et retarde sa distribution (Schmitt et al., 2017).

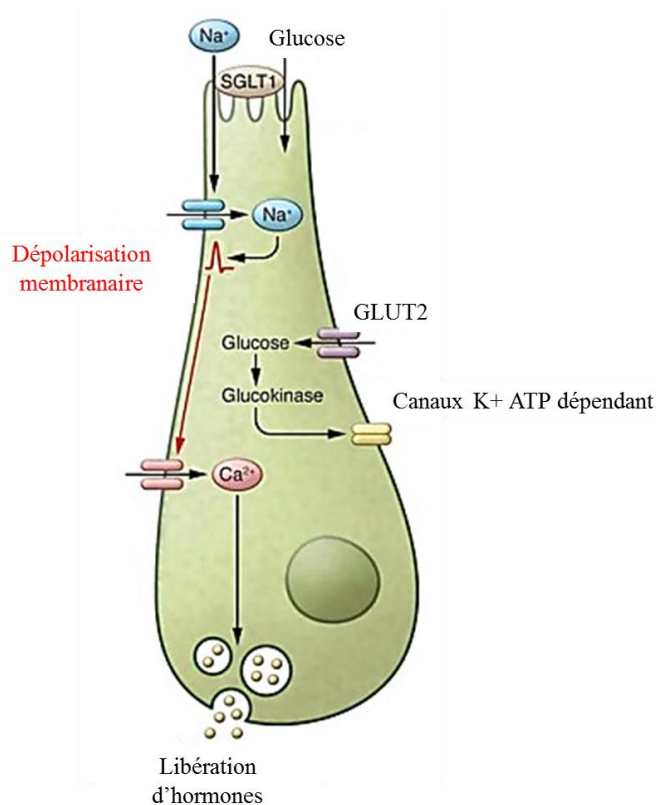


Figure 14 : Différents récepteurs impliqués dans le sensing et le métabolisme du glucose.

Du côté luminal, le glucose est détecté par les cellules entéroendocrines grâce au cotransporteur de sodium SGLT1 dont l'activation génère des courants. La genèse de ces courants entraîne une dépolarisation et une libération de calcium via le canal Ca^{2+} voltage dépendant. En revanche du côté basolatéral, le glucose est détecté par le transporteur GLUT2. Le métabolisme du glucose implique également la glucokinase et les canaux sensibles à l'ATP. Adapté de Psichas et al., 2015

b- CEE et sensibilité aux acides aminés expriment le récepteur au Ca (CaSR)

Les produits issus de l'hydrolyse des protéines tels que les acides aminés stimulent la sécrétion de GIP, GLP1, PYY et CCK (Batterham et al., 2006; Elliott et al., 1993; Nemoz-Gaillard et al., 1998). Chez l'homme, une administration orale de glutamine augmente la concentration plasmatique de GLP-1, de glucagon et d'insuline, aussi bien chez des patients sains (Tolhurst et al., 2011) que chez des patients obèses ou atteints de diabète de type II (Greenfield et al., 2009). De plus, cette augmentation de GLP-1 est associée à une libération d'insuline suggérant ainsi que la glutamine pourrait être utilisée comme agent thérapeutique pour la régulation de l'homéostasie glucidique (Greenfield et al., 2009). Des modèles d'études cellulaires ont permis de mieux caractériser l'effet des acides aminés sur la sécrétion des peptides gastro-intestinaux. A partir des cellules GLUTag, il a été démontré que la glutamine favorise la libération de GLP-1 (Reimann et al., 2004). De plus, l'étude de CEE natives isolées à partir d'un modèle KI GLP1-GFP chez la souris a démontré que la glutamine, l'asparagine et la phénylalanine stimulent la libération de GLP-1 (Tolhurst et al., 2011) (Tableau 6). Enfin, les acides aminés tels que la phénylalanine favorisent la sécrétion de CCK des CEE CCK-eGFP de rat (Wang et al., 2011) (Tableau 6).

La libération des peptides gastro-intestinaux par les CEE en réponse aux acides aminés est dépendante du calcium et l'effet des acides aminés sur la sécrétion des peptides serait principalement médié par le récepteur sensible au calcium (CasR) (Rogers et al., 2011; Tolhurst et al., 2011). En absence de calcium extracellulaire, la libération de GLP-1, GIP, CCK et PYY en réponse aux acides aminés est complètement abolie et ce même effet est observé lorsque le récepteur CasR est bloqué (Haid et al., 2011; Liou et al., 2011b; Mace et al., 2012). Toutefois le transporteur PEPT1 spécifique des di et tripeptides est exprimé par les entérocytes et les CEE et semble impliqué dans une moindre mesure et de façon indirecte dans la libération de peptides gastro-intestinaux (Liou et al., 2011a; Matsumura et al., 2005). De plus, la cascade de signalisation induite par l'activation de Pept1 est également à l'origine d'une dépolarisation cellulaire et par conséquent d'une libération de calcium qui conduit à la libération de GLP-1 (Diakogiannaki et al., 2013).

c- Expression d'une batterie de GPCR spécifiques des acides gras au niveau des CEE

Les acides gras sont très diversifiés et sont répartis en catégories selon la longueur de leur chaîne carbonée. On distingue ainsi les acides gras à chaîne courte (AGCC) et à chaîne moyenne à longue (AGCM et AGCL) qui peuvent posséder des insaturations.

Les récepteurs aux AGCC sont majoritairement impliqués dans la libération de GLP-1 et de PYY.

Les AGCC tels que le butyrate, le propionate et l'acétate sont les produits finaux issus de la fermentation bactérienne des glucides. Chez la souris, il a été démontré qu'une supplémentation en probiotiques prévient l'obésité et le diabète. Cet effet bénéfique se traduit par une augmentation de la production de butyrate qui favorise la sécrétion de GLP-1 (Yadav et al., 2013). De plus, une infusion intra-colique de propionate ou encore une incubation *in vitro* de cellules GLUTag avec de l'acétate ou du propionate stimulent majoritairement la sécrétion de GLP1 et de PYY (Psichas et al., 2015b; Tolhurst et al., 2012). La libération de ces peptides en réponse aux AGCC fait suite à l'activation des récepteurs FFAR2 et FFAR3 (ex-orphelins GPR43 et GPR41) et à une augmentation de calcium intracellulaire. Ces récepteurs sont couplés aux protéines Gq/Gi pour FFAR2 et uniquement Gi pour FFAR3 et leur stimulation active la voie de signalisation MAPK (Brown et al., 2003; Le Poul et al., 2003; Seljeset and Siehler, 2012) (Figure 15).

Chez l'homme, le rat et la souris, ces récepteurs sont exprimés principalement par les CEE sécrétrices de GLP1 localisées dans des segments intestinaux où a lieu la fermentation bactérienne, au niveau distal de l'intestin grêle et dans le côlon (Nohr et al., 2013; Tazoe et al., 2009; Tolhurst et al., 2012). Bien que les AGCC ne stimulent pas particulièrement la sécrétion de CCK ou de ghréline, les récepteurs FFAR2 et FFAR3 sont quand même exprimés par les CEE qui produisent ces peptides (Engelstoft et al., 2013b; Sykaras et al., 2012). Ces données indiquent que la localisation des CEE est importante pour que fonctionnent les récepteurs qu'elles expriment.

Les récepteurs aux AGCM et AGCL sont majoritairement impliqués dans la libération de CCK.

Un des peptides majeurs sécrétés en réponse aux AGCL est la CCK. Cependant, les AGCL stimulent également la sécrétion d'hormones incrétines et de PYY (Edfalk et al., 2008; Hirasawa et al., 2005) (Matzinger et al., 2000; McLaughlin et al., 1999) et ces effets sont principalement médiés par les récepteurs aux AGCL FFAR4 et FFAR1 (ex-orphelins GPR40 et GPR120) (Edfalk et al., 2008; Hara et al., 2011; Hirasawa et al., 2005).

L'étude de la lignée murine de cellules enteroendocrines STC-1 a permis de démontrer que la libération de CCK est principalement stimulée par les acides gras dont la chaîne carbonée est supérieure à 12 atomes de carbone (McLaughlin et al., 1998; Tanaka et al., 2008). Ainsi des AG tels que l'oléate, le palmitoléate et l'acide linoléique stimulent la production de CCK. Chez le rat, l'administration par voie orale de palmitoléate (C16:1)

favorise la sécrétion de CCK de façon dose dépendante et cette libération s'accompagne d'une diminution de la prise alimentaire (Yang et al., 2013). Chez la souris, un gavage d'oléate (C18 :1) conduit à une sécrétion de CCK (Liou et al., 2011a). En revanche dans le même type d'expérience, le palmitate (C16 :0) n'a d'effet ni sur la libération de CCK ni sur la prise alimentaire (Yang et al., 2013). Ces données suggèrent que la libération de CCK serait principalement induite par des AGCL monoinsaturés. Toutefois, il a été démontré *in vitro* que la libération de CCK serait également stimulée par des AGCL polyinsaturés tels que la DHA (Hand et al., 2009; Harden et al., 2012) (Figure 15).

Grâce à un modèle de souris KI (CCK-eGFP), Liou et al., 2011 ont montré que les CEE sécrétrices de CCK expriment FFAR1 qui médie les effets de l'oléate (Liou et al., 2011a) (Tableau 6). De plus, il a été démontré qu'une déficience en FFAR1 chez la souris réduit la sécrétion de CCK (Edfalk et al., 2008). Cependant, les effets des AG sur la sécrétion de CCK *in vitro* seraient médiés spécifiquement par FFAR4 puisque son inhibition avec des SiRNA réduit considérablement la libération de CCK en réponse aux AG tandis que l'inhibition de FFAR1 n'a aucun effet (Tanaka et al., 2008). Ces deux récepteurs étant couplés aux protéines Gq, leur activation induit la cascade intracellulaire de messagers classiques (phospholipase C, diacylglycérol, inositol triphosphate) conduisant à la libération du calcium intracellulaire (Hara et al., 2011; Liou et al., 2011a; Ozdener et al., 2014; Reimann et al., 2012; Sundaresan et al., 2013). (Figure 15).

Un autre mécanisme par lequel les AGCL stimulent la sécrétion de CCK implique le transporteur CD36 (Cluster determinant 36). Connue pour son rôle dans le transport des AG dans les entérocytes (Nassir et al., 2007; Pepino et al., 2014), il est également exprimé par les CEE (Pepino et al., 2014; Sundaresan and Abumrad, 2015; Sundaresan et al., 2013). Dans le duodénum la libération de CCK suite à l'activation de ce récepteur favorise l'absorption des acides gras par les entérocytes (Demenis et al., 2017). Comme pour les récepteurs précédemment cités, l'activation de CD36 par les AGCL favorise la libération intracellulaire de calcium via un mécanisme dépendant de l'AMPc conduisant ainsi à la sécrétion de CCK (Ozdener et al., 2014; Sundaresan et al., 2013) (Figure 15).

Enfin, les AGCL stimulent également la sécrétion de GLP-1 et de GIP (Edfalk et al., 2008) et ces effets passent principalement par le récepteur FFAR1 également situé sur les cellules L et K (Reimann et al., 2012).

Nom usuel	Autre nom	Protéines G	Effecteurs	Agonistes	Cellules
FFAR1	GPR40	Gq/11	Ca ²⁺ ↑	AGCM	CEE I, K, L
			Gi/o, Gs	AMPc ↑	
FFAR2	GPR43	Gq/11	Ca ²⁺ ↑	AGCC	CEE I, L
			Gi/o	AMPc ↑	
FFAR3	GPR41	Gi/o	AMPc ↓	AGCC	CEE I, L
FFAR4	GPR120	Gq/11	Ca ²⁺ ↑	AGCL	CEE I, L
GPR119	HM74A	Gi/o	Ca ²⁺ ↑	Métabolites	CEE L, K
			AMPc ↑	des TG	
CD36			Ca ²⁺ ↑	Acides gras	CEE
			AMPc ↑		Entérocytes
SGLT1			Ca ²⁺ ↑	Glucose	CEE L, K
CaSR			Ca ²⁺ ↑	Acides	
				aminés	
PEPT1			Ca ²⁺ ↑	Dipeptides	CEE
				Tripeptides	Entérocytes

Tableau 7 : Récepteurs et co-transporteurs impliqués dans le « sensing » nutritionnel.

AGCL = acides gras à chaîne longue, AGCM = acides gras à chaîne moyenne, AGCC = acides gras à chaîne courte.

Les récepteurs aux AG endogènes (issus du métabolisme intermédiaire)

Dans l'intestin, les triglycérides alimentaires sont hydrolysés en AGCL par les lipoprotéines lipases (LPL) du côté basolatéral. Les AGCL ainsi libérés sont estérifiés par l'acylCoA synthase pour former des AGCL acyl CoAs. Il a été montré que ces AGCL-acylCoA stimulent la sécrétion de CCK qui agirait par voie vagale (Breen et al., 2011) (Cheung et al., 2009) pour induire une régulation nerveuse de la néoglucogénèse hépatique (Sharabi et al., 2015). Cette détection des acyls CoA par l'axe intestin-cerveau contribue ainsi à la régulation de l'homéostasie glucidique. Ces acyls CoA peuvent également être détectés directement au niveau hypothalamique. Par ailleurs il a été démontré que les CEE L et K expriment GPR119 un récepteur aux AGCL couplé aux protéines Gs qui médient les effets des produits dérivés du métabolisme intermédiaire des triglycérides, tels que le monoacylglycerol et l'oléylethanolamide, connus pour leur rôle anorexigène (Chu et al., 2008; Hansen et al., 2011) (Figure 9). En effet, les lipides endogènes favorisent la réduction de la prise alimentaire (Serrano et al., 2011) et cet effet est altéré chez le rat soumis à un régime obésogène (Igarashi et al., 2015). L'activation de ce récepteur, soit par

l'oléylethanolamide, soit par des agonistes pharmacologiques synthétiques, résulte en l'activation de l'adénylate cyclase suivie d'une libération d'AMPC et en la sécrétion de GIP et de GLP1 (Chu et al., 2008; Lauffer et al., 2009) (Figure 15).

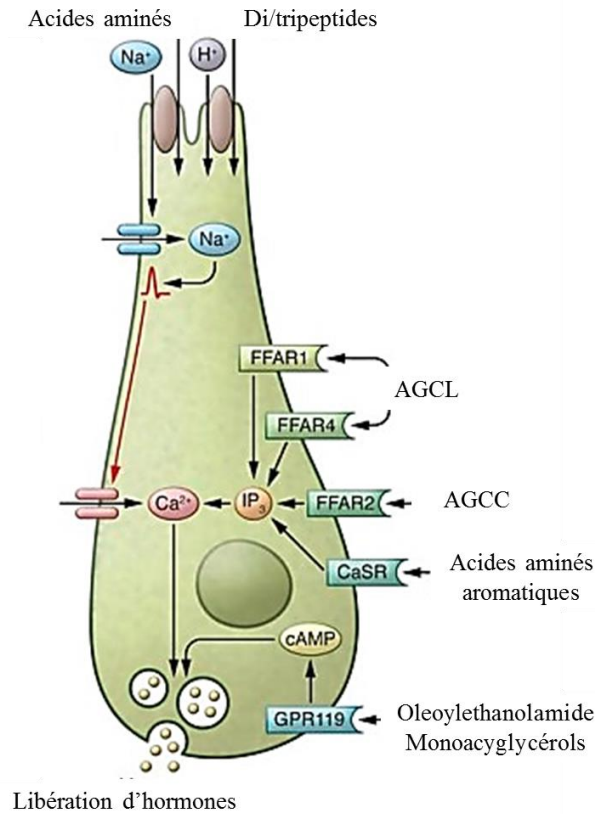


Figure 15 : Différents récepteurs impliqués dans le sensing des acides gras et des acides aminés.

Les acides gras et les acides aminés sont détectés par les CEE par différents récepteurs et transporteurs couplés aux protéines G (GPCRs). Les acides gras à chaînes moyennes et longues activent les récepteurs aux acides gras (FFAR) tels que le FFAR1 (GPR40) et le FFAR4 (GPR120) tandis que ceux à chaînes courtes sont notamment détectés par FFAR2 (GPR43). L'activation des FFAR entraîne une augmentation de calcium intracellulaire. En revanche l'activation de GPR119 par l'oléylethanolamide et les monoacylglycerols stimulent la sécrétion des peptides gastrointestinaux via l'augmentation de l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire. De la même façon les acides aminés et les oligopeptides peuvent également activer les GPCRs tels que le récepteur sensible au calcium (CaSR). De plus la recapture électrogénique de certains acides aminés et di-tripeptides peut également cibler la dépolarisation membranaire et la libération d'hormones. [Adapté de Psichas et al., 2015](#)

d- Fonction de « sensing nutritionnel » des CEE peut-elle être une cible de la programmation métabolique?

Comme décrit en début de chapitre, la détection des nutriments représente la première étape initiatrice de la régulation de la prise alimentaire. Des altérations de cette fonction des CEE pourraient donc contribuer à la dérégulation de la prise alimentaire observée dans les modèles expérimentaux de programmation métabolique (Orozco-Solis et al., 2009). Notre étude est consacrée à la question de la programmation du « sensing nutritionnel » intestinal mais tous les organes assurent cette fonction de détecter l'arrivée de nutriments, cette fois circulants. Quelques données de la littérature ont rapporté des effets de la dénutrition périnatale sur certains d'entre eux. Ainsi, au niveau placentaire, une restriction protéique fœtale réduit l'activité des transporteurs aux acides aminés et au glucose conduisant ainsi à une altération de la genèse des signaux qui font suite à la détection des nutriments et à une réduction de leur transport de la mère vers le fœtus (Jansson et al., 2006; Jansson and Powell, 2013). En conséquence, ces modifications observées au niveau placentaire conduisent à une altération de la sécrétion d'hormones telles que la leptine et l'IGF-1 dans la circulation intra-utérine (Jansson and Powell, 2013).

Par ailleurs, Orozco Solis et al., 2010 ont montré par analyse transcriptomique qu'une dénutrition périnatale altère à l'âge adulte l'expression de nombreux gènes de l'hypothalamus impliqués dans la régulation de la signalisation de l'insuline mais aussi du « sensing » nutritionnel. En effet, ces gènes codent pour des récepteurs nucléaires et des co-régulateurs de transcription impliqués dans la détection et l'utilisation des lipides comme substrat énergétique (Orozco-Solis et al., 2010). Ces données suggèrent qu'une malnutrition périnatale pourrait altérer le « sensing » nutritionnel au niveau hypothalamique et par conséquent la sécrétion d'hormones et de neuropeptides.

Bien que peu nombreuses, ces données suggèrent que la perception des nutriments pourrait être soumise aux effets d'une malnutrition périnatale et donc programmable. A notre connaissance, aucune étude sur cette programmation dans l'intestin n'a été menée. Comme évoqué précédemment, l'intestin endocrine adulte semble être sensible à l'environnement périnatal. Il est donc envisageable que le « sensing » nutritionnel par les CEE soit fonctionnellement atteint. Ainsi, une malnutrition périnatale pourrait être à l'origine d'une altération soit de la sécrétion des peptides gastro-intestinaux soit de l'intégration de ces signaux par voie paracrine ou par voie nerveuse.

5- Système nerveux entérique : relais de l'intestin endocrine dans la fonction de « sensing » nutritionnel ?

Le système nerveux entérique (SNE), situé tout le long du tractus digestif est composé de deux types cellulaires, les neurones et les cellules gliales. Le SNE représente un acteur majeur dans la régulation des fonctions digestives qui sont également en lien avec la régulation de la prise alimentaire. Il régule la motricité digestive favorisant ainsi le transport des aliments le long du tractus digestif et contrôle le fonction de barrière épithéliale intestinale telle que la perméabilité.

a- Composition et fonction du système nerveux entérique

Le SNE est organisé sous forme de deux principaux plexi. Le plexus myentérique, autrement appelé plexus d'Auerbach, est situé entre les couches musculaires longitudinale et circulaire interne (Schemann and Neunlist, 2004). Le plexus sous muqueux ou plexus de Meissner (Costa et al., 2000; Heanue and Pachnis, 2007; Sasselli et al., 2012; Wedel et al., 1999) est localisé entre la couche musculaire circulaire et la muqueuse et est impliqué dans le contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale (Grundy et al., 2006). Les neurones contenus dans ces plexi projettent leurs axones vers l'ensemble des constituants cellulaires de l'intestin et vers d'autres organes tels que le pancréas et la vésicule biliaire (Anglade et al., 1987; Furness et al., 2014; Mawe and Gershon, 1989).

Le SNE est composé de neurones intrinsèques et extrinsèques (Furness et al., 2014; Furness and Costa, 1980). La voie intrinsèque constituée de neurones afférents, efférents et d'interneurones permet au tractus digestif de maintenir partiellement sa fonction en l'absence du SNC. En revanche, la voie extrinsèque inclue les neurones afférents et efférents splanchniques et du nerf vague dont les corps cellulaires sont en dehors du tractus digestif et qui permet au SNC de réguler l'activité des neurones intrinsèques (Furness et al., 2014; Ye and Liddle, 2017).

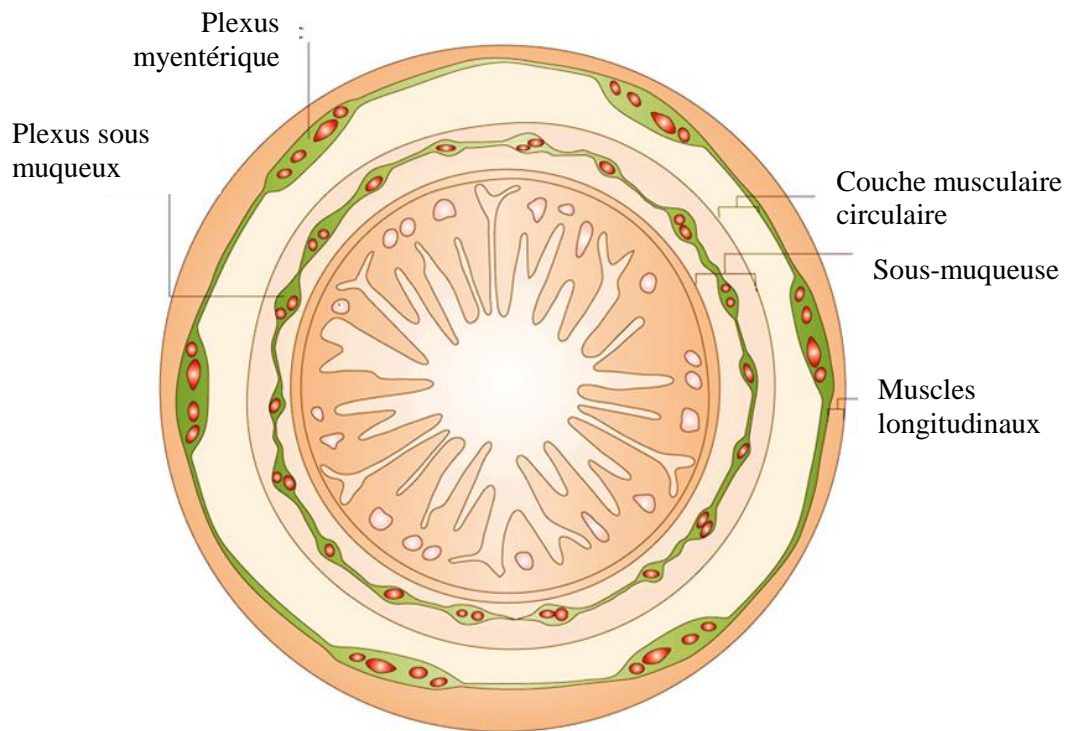


Figure 16 : Représentation schématique des deux plexi ganglionnaires principaux du SNE.

Le système nerveux entérique est composé du plexus myentérique situé entre les couches musculaires longitudinale et circulaire interne et du plexus sous muqueux localisé entre la couche musculaire circulaire et la muqueuse. [Adapté de Heanue et Pachnis 2007](#)

La régulation des fonctions digestives par le SNE est régie par un ensemble de neuromédiateurs sécrétés par les neurones entériques. Parmi ces neuromédiateurs on peut citer l'oxyde nitrite (NO) et le peptide vasoactif intestinal (VIP) impliqués dans la relaxation des muscles, tandis que l'acétylcholine (ACh) favorise une contraction des muscles. Les neurones entériques situés dans le plexus myentérique contrôlent principalement les fonctions motrices du SNE tandis que ceux qui régulent les fonctions de la barrière épithéliale intestinale sont situés dans le sous-muqueux ([Grundy et al., 2006](#); [Neunlist et al., 2013](#)).

Codage neurochimique	Fonction
Plexus myentérique	
HO/ NOS/ ATP/ VIP/ NPY	Neurones moteurs inhibiteurs
ChAT/ SP/ ENK; Galanin	Neurones moteurs excitateurs
SOM/ SP	Projections dans la muqueuse
ChAT/NOS ; NOS ; Calretinin	Interneurones descendants
ChAT	Interneurones ascendants
5-HT ; GABA/ NOS/ SOM	Interneurones
CGRP	Neurones multipolaires (Fonction afférente)

Plexus sous muqueux	
HO/ NOS	Projections dans la muqueuse
VIP/ ChAT	Neurones sécrétomoteurs
CGRP	Neurones multipolaires (Fonction afférente)
ChAT/SP ; VIP ; ChAT	?

Tableau 8 : Les différents neurones du système nerveux entérique de l'homme et leurs fonctions.

HO = haem oxygenase; NOS = oxide nitrique synthase; ChAT = acétylcholine transferase; ATP = adenosine triphosphate; VIP = peptide vasoactif intestinal; NPY = neuropeptide Y; SP = substance P ; ENK = enkephaline ; SOM = somatostatine ; GABA = acide gamma aminobutyrique ; CGRP = calcitonin gene related peptide. [Adapté de Schemann et Neunlist 2014.](#)

Quelques études chez le porc ont montré que l'activation des neurones entériques est à l'origine d'un renforcement de la barrière épithéliale intestinale reflété par une diminution de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire ([Bregeon et al., 2016](#); [Meurette et al., 2012](#)). Plus spécifiquement, les neurones entériques cholinergiques sont principalement impliqués dans le contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale ([Cameron and Perdue, 2007](#); [Saunders et al., 1997](#)). En effet, l'activation du récepteur muscarinique de l'acétylcholine augmente la perméabilité transcellulaire ([McConalogue and Furness, 1994](#)). De plus, un stress de séparation maternelle durant la période postnatale est associé à une augmentation de la perméabilité en lien avec une augmentation de l'expression de l'acétylcholine ([Gareau et al., 2007](#)).

b- Sensibilité du SNE aux métabolites bactériens

Le SNE possède des récepteurs aux nutriments absorbés tels que le SGLT-1, le mono-carboxylate transporteur 2 (MCT-2) et aux produits issus du métabolisme bactérien. Le SNE peut donc être stimulé de façon directe par ces nutriments (**Figure 12**). C'est le cas notamment du butyrate qui régule ainsi la motricité colique et le phénotype des neurones entériques ([Bertrand et al., 1997](#); [Neunlist and Schemann, 2014](#); [Nohr et al., 2013](#); [Soret et al., 2010](#)([Balen et al., 2008](#))). Les principaux nutriments tels que le glucose, les acides aminés et les acides gras sont connus pour activer le SNE ([Galligan, 2002](#); [Liu et al., 1999](#); [Neunlist et al., 2001](#); [Ruhl et al., 2005](#)). Néanmoins, les terminaisons nerveuses du SNE (et du nerf vague) n'atteignant pas la lumière intestinale, l'activation par les nutriments ou les AGCC passe par une voie indirecte.

c- Interaction entre CEE et SNE : Les CEE interagissent-elles avec le SNE pour transmettre le signal nutritionnel/peptidergique vers le vague?

SNE et signal peptidergique

Les neurones sensitifs qui composent le SNE sont en effet isolés des nutriments de la lumière par les cellules de l'épithélium intestinal qui sont capables de détecter les nutriments comme décrit précédemment. Ces neurones pourraient ainsi recevoir indirectement des informations entériques à travers la libération d'hormones par les CEE (Dockray, 2013). En effet, les effets physiologiques des peptides gastro-intestinaux libérés au niveau basolatéral de l'épithélium sont médiés grâce à leurs récepteurs situés sur différents systèmes impliqués dans cette voie de signalisation (Dockray, 2013, 2014; Furness, 2016; Richards et al., 2014). Plus spécifiquement, la CCK possède des récepteurs sur les afférences du nerf vague (Dockray, 2009a; Patterson et al., 2002) et du SNE (Sternini et al., 2008). De façon intéressante, la communication entre les CEE et le SNE est bidirectionnelle puisque l'activité des CEE peut être modulée par le SNE. Il semblerait ainsi que la libération des peptides gastro-intestinaux par les CEE puisse être modulée par une interaction cellule à cellule à travers des signaux nerveux provenant du SNE efférent (Psichas et al., 2015a). Par exemple, la stimulation des neurones cholinergiques conduit à la libération de GLP-1 par les CEE (Hansen et al., 2004). De plus, le GLP-2 qui possède également des récepteurs au niveau du SNE active les neurones entériques conduisant à une libération de VIP (de Heuvel et al., 2012; Sigalet et al., 2010). Ces données suggèrent que le GLP-2 pourrait jouer un rôle dans la régulation des fonctions modulées par le SNE. Ces données, bien que parcellaires supportent l'hypothèse d'une interaction entre les CEE et le SNE.

SNE et signal nutritionnel

Des données obtenues par Sayegh et al., indiquent que les AGLC pourraient agir sur le SNE et que cet effet nécessiterait la libération de CCK (Sayegh et al., 2004). Dans cette étude, il a été démontré qu'une infusion intestinale d'oléate entraîne une augmentation de l'expression de c-fos, un marqueur d'activation neuronale, dans les neurones myentériques et sous-muqueux du SNE à la fois dans le duodénum et le jéjunum chez le rat. De plus, une injection intrapéritonéale d'un antagoniste des récepteurs à la CCK supprime cet effet de l'oléate, suggérant ainsi un rôle de la CCK. Dans le plexus myentérique, l'oléate active les neurones NOS conduisant ainsi à une inhibition de la motricité, tandis que dans le plexus sous-muqueux, ils activent les neurones à calrétinine qui fonctionneraient plutôt comme des neurones sensitifs (Sayegh et al., 2004). Du fait que les nutriments activent des neurones

sensitifs dans le plexus sous muqueux, la signalisation induite par les nutriments aurait lieu dans les neurones sous muqueux plutôt que myentériques (Neunlist and Schemann, 2014). Enfin, chez le cobaye, l'incubation de la muqueuse intestinale avec des AGCC conduit à la genèse de potentiels d'action au niveau du SNE qui résulte en une libération d'hormones (Bertrand et al., 1997; Kunze et al., 1995).

Interactions entre CEE et SNE

Dans un modèle de souris CCK-eGFP, Chandra et al., ont montré que les CEE sécrétrices de CCK émettent des processus cellulaires appelés « pseudopodes » leur permettant d'être en contact avec plusieurs autres cellules de l'épithélium intestinal (**Tableau 6**). Ces prolongements de moins de 15µm pourraient être impliqués dans la sécrétion d'hormone par voie paracrine (Chandra et al., 2010). Ces interactions physiques entre le SNE et les CEE ont été confirmées par microscopie 3D dans le modèle de souris PYY-eGFP (**Tableau 6**). Ces interactions se traduisent bien par l'existence d'un processus cytoplasmique appelé « neuropode » qui se prolonge au niveau basal des CEE de l'intestin et du côlon (Bohorquez et al., 2011). Ces travaux rapportent que les vésicules de sécrétion sont à 70% contenues dans les neuropodes qui s'étendent des CEE à l'interface entre la muqueuse intestinale et la lamina propria atteignant presque 70µm (Bohorquez et al., 2014). De plus, les interactions entre le SNE et les CEE ont été mises en évidence grâce à un modèle de co-culture composée de CEE isolées et de neurones sensitifs (Bohorquez et al., 2015). La présence de vésicules pré et postsynaptiques au niveau des CEE met en évidence la capacité des CEE à s'engager dans une transmission synaptique efférente et afférente. En effet, dans le côlon 70% des CEE qui sécrètent le PYY sont connectés avec des fibres nerveuses qui innervent la muqueuse (Bohorquez et al., 2015). De plus une étude très récente démontre que les cellules entérochromaffines sécrétrices de sérotonine (5-HT) sont en contact synaptique avec les fibres nerveuses afférentes qui expriment des récepteurs au 5-HT (Bellono et al., 2017). Ces connections synaptiques permettent ainsi à ces fibres de détecter les signaux environnementaux tels que les peptides gastrointestinaux et ainsi d'intégrer leurs effets physiologiques au niveau du système nerveux central (Bellono et al., 2017).

Cet ensemble formé par les CEE et le SNE porte le nom de « gut connectome » et pourrait moduler la détection des nutriments, la motricité digestive et le comportement alimentaire (Ye and Liddle, 2017) (**Figure 17**).

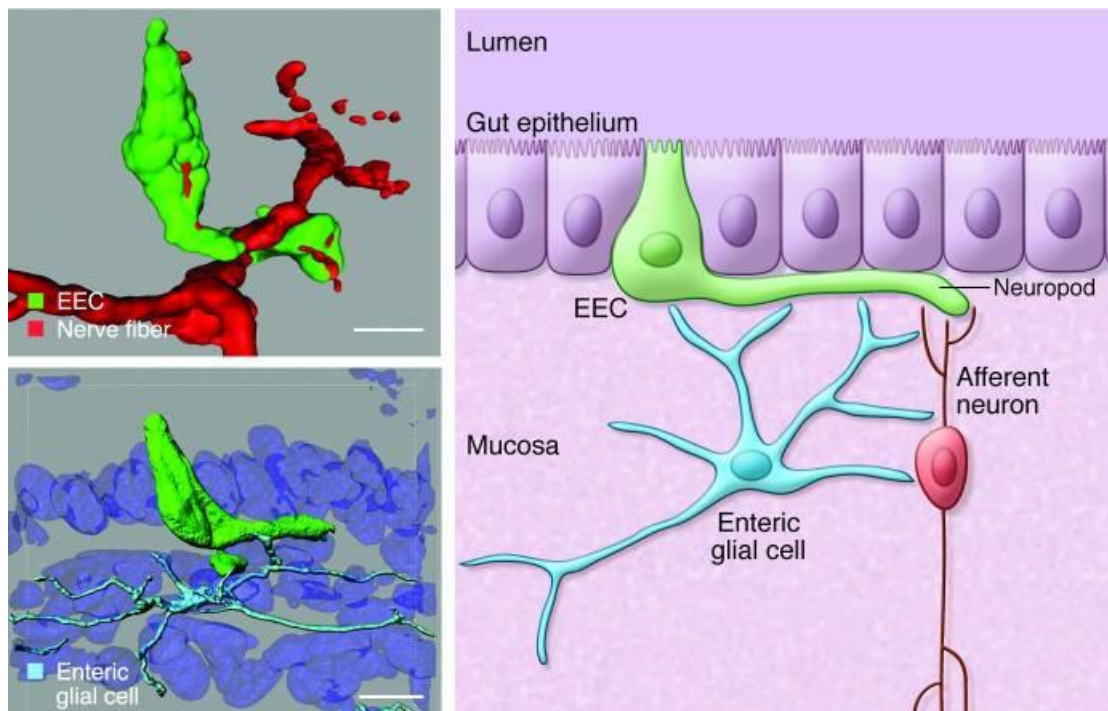


Figure 17 : Gut connectome. Les CEE sont en contact direct avec le SNE grâce à leur prolongement appelé « neuropode ».

L'innervation des CEE facilite une signalisation bidirectionnelle afférente (intestin vers le cerveau) et efférente (cerveau vers intestin) qui permettrait à l'intestin de déterminer l'information sensorielle provenant de la stimulation. Cette communication pourrait être à l'origine de la régulation du comportement alimentaire. [Adapté de Bohorquez et al., 2014](#)

Les travaux de Bohorquez ont également montré que les neuropodes des CEE sont escortés par des cellules gliales. Ces dernières modulent le phénotype des neurones entériques, assurent leur protection ([Abdo et al., 2010](#); [De Giorgio et al., 2012](#)) mais sont également impliquées dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales intestinales, et donc probablement des CEE de la même façon ([Aube et al., 2006](#); [Bach-Ngohou et al., 2010](#); [Bohorquez et al., 2014](#); [Laranjeira et al., 2011](#)).

L'innervation des CEE pourrait représenter un mécanisme physiologique pouvant conduire au rétrocontrôle de la fonction des CEE. Ensemble, le SNE et les CEE joueraient ainsi un rôle clef dans la régulation de nombreuses fonctions digestives.

6- Les circuits et le codage chimique des neurones du SNE sont-ils programmables ?

Le phénotype des neurones entériques et les fonctions régulées par le SNE peuvent être modifiés par un ensemble de facteurs environnementaux.

Stress nutritionnel périnatal et morphologie du SNE

Des études indiquent que les effets d'une restriction nutritionnelle sur la structure du SNE diffèrent au cours du développement (Natali and Miranda-Neto, 1996; Santer and Conboy, 1990; Schoffen et al., 2014). Quelques données démontrent l'impact d'une restriction nutritionnelle périnatale sur la proportion et la morphologie des neurones du SNE à l'âge adulte. En 1990, Santer et Conboy avait montré qu'une restriction calorique au cours de la gestation (du 7^{ème} jour à la mise bas) est associée à une diminution de 27% du nombre de neurones myentériques du jéjunum chez le rat à l'âge adulte (140 jours) (Santer and Conboy, 1990). Toutefois, à un plus jeune âge, il semblerait qu'un stress nutritionnel ne modifie pas la densité neuronale du SNE. En effet, chez le rat âgé de 60 jours, une restriction protéique périnatale altère uniquement la morphologie des neurones myentériques en augmentant la taille du corps cellulaire du duodénum (Natali and Miranda-Neto, 1996). Par ailleurs, une restriction calorique du sevrage jusqu'à l'âge adulte (90 jours) interfère morphologiquement et quantitativement sur la population des neurones myentériques dans le côlon. Chez le rat, le nombre de neurones myentériques coliques est augmenté suite à une restriction calorique au cours du développement postnatal, tandis que les corps cellulaires ont un profil réduit (Schoffen et al., 2014).

Stress nutritionnel périnatal et maturation du SNE

Le RCIU affecte également la maturation du SNE chez le porc dès les premiers jours de vie. Il a été décrit chez des porcelets qu'un petit poids à la naissance serait associé à un défaut de maturation du SNE caractérisé par un retard dans le développement des terminaisons nerveuses (Radlowski et al., 2014). Dans le colon et le rectum, ce retard au développement s'explique par un système synaptique moins développé dans les ganglions du SNE qui persiste jusqu'à 14 jours après la naissance (Radlowski et al., 2014). Par ailleurs, Castelucci, et al., ont montré qu'une restriction protéique maternelle chez le rat réduit la taille des neurones au sevrage (Castelucci et al., 2002). Cependant après le sevrage, une réalimentation des rats avec un régime standard pendant 21 jours restaure la morphologie des neurones (Castelucci et al., 2002) démontrant ainsi une plasticité du SNE.

Stress nutritionnel périnatal et perméabilité, une fonction régulée par le SNE

En plus des modifications phénotypiques des neurones du SNE, des altérations de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale sont décrites chez les porcelets nés avec un RCIU (Wang et al., 2016; Zhu et al., 2017). Chez ces derniers, les perméabilités paracellulaire et transcellulaire intestinales sont augmentées à la naissance. A cette altération s'ajoute une diminution du niveau d'expression de l'occludine, une protéine de jonctions serrées à la

naissance et au sevrage (Wang et al., 2016). Toutefois, il n'existe que peu voire pas de données concernant le type cellulaire spécifiquement affecté dans le cadre de ces dérégulations. Cependant comme décrit dans le paragraphe précédent, quelques études démontrent qu'une altération de la perméabilité intestinale impliquerait les neurones cholinergiques (Cameron and Perdue, 2007; Gareau et al., 2007; Saunders et al., 1997).

Modulation nutritionnelle du SNE

Outre la modulation du SNE par un stress nutritionnel au cours de la période fœtale ou néonatale, il a été mis en évidence un effet des nutriments sur le phénotype du SNE. Chez le porcelet un régime maternel périnatal enrichi en acides gras polyinsaturés de la famille des $\omega 3$ résulte en une augmentation de la perméabilité paracellulaire du jéjunum à 28 jours associée à une augmentation du nombre de neurones sous muqueux cholinergiques et à une diminution de neurones VIPergiques (De Quelen et al., 2011). De plus, in vitro, les AG polyinsaturés de la famille des $\omega 3$ augmentent la proportion des neurones cholinergiques (De Quelen et al., 2011). Ces données sont en accord avec celles obtenues lors d'une autre étude chez le rat qui démontre que le même type de supplémentation augmente la perméabilité paracellulaire colique à 15 jours (Innis et al., 2010). Ces études suggèrent que les AGCL polyinsaturés auraient un effet délétère sur la barrière intestinale et cet effet serait médié par les neurones cholinergiques.

De plus, les AGCC modulent également le phénotype des neurones du SNE. Le butyrate, contrairement au propionate et à l'acétate, favorise un phénotype cholinergique au niveau du plexus myentérique dans le côlon à l'âge adulte (Soret et al., 2010). En revanche chez le rat nouveau-né, l'administration de butyrate au cours du développement postnatal entre le 7^{ème} et le 17^{ème} jour, induit au sevrage une augmentation du nombre de neurones cholinergique et nitreurgique dans le plexus myentérique et uniquement cholinergique dans le sous muqueux (Suply et al., 2012). De plus, cette modulation du SNE par le butyrate est concomitante avec une augmentation de la motricité colique (Soret et al., 2010; Suply et al., 2012).

Dans l'ensemble ces données expérimentales suggèrent que le SNE fait l'objet d'une programmation qui se traduit par une modulation du phénotype des neurones du SNE ainsi que de ses fonctions.

HYPOTHESES

Les hypothèses qui ont mené à cette thèse sont articulées autour de trois acteurs de la régulation de la prise alimentaire : les CEE, le SNE et le nerf vague. Ainsi les hypothèses de cette étude étaient qu'une malnutrition périnatale pourrait :

- Altérer la prolifération et/ou la différenciation des CEE,
- Affecter la sensibilité de l'intestin aux nutriments à travers des mécanismes qui impliqueraient les CEE sécrétrices de CCK et les neurones du SNE,
- Etre à l'origine d'une perte de sensibilité vagale à la CCK.

La programmation de ces différents acteurs de l'axe intestin cerveau, pourrait ainsi contribuer aux défauts de régulation de la prise alimentaire observés chez le rat adulte ayant subi une dénutrition maternelle périnatale.

STRATEGIES

Pour répondre à notre premier objectif qui consistait à analyser la prolifération/différenciation des CEE et plus particulièrement celles sécrétrices de CCK, chez le rat ayant subi une dénutrition maternelle périnatale, nous avons développé un modèle de rat transgénique qui exprime la GFP sous le contrôle du promoteur du gène qui code pour la CCK. En effet, les CEE sont très peu représentées au sein de l'épithélium intestinal (1% de la population cellulaire), et celles sécrétant la CCK constituent entre 0,3 et 0,5% de la population totale (van der Flier and Clevers, 2009). Cette faible représentativité des CEE fait de l'intestin endocrine un organe diffus et par conséquent difficile à étudier. Au moyen de ce modèle, nous avons évalué l'impact de la dénutrition périnatale sur les CEE productrices de CCK dans l'intestin proximal (duodénum et jéjunum) où elles sont majoritairement localisées en mesurant (**Article 1**):

- La densité des CEE totales en marquant la chromogranine A (marqueur des CEE matures),
- La densité des CEE sécrétrices de CCK qui fluorescent en vert,
- Le niveau d'expression des gènes impliqués dans la différenciation des progéniteurs endocrines en CEE matures,
- Les activités de prolifération dans les cryptes et d'apoptose au sommet des villosités.

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet d'une restriction protéique maternelle sur la fonction de « sensing » nutritionnel des cellules produisant la CCK, et les interactions CEE-SNE dans la régulation de cette fonction (**Article 2**). Pour répondre à cet objectif, nous avons mesuré chez des rats contrôles et dénutris:

- La sécrétion de CCK suite à une administration orale de 2 AGCL (palmitate et palmitoléate),
- Les niveaux d'expression des récepteurs aux AGCL dans le duodénum.
- L'effet de ces nutriments sur la perméabilité paracellulaire in vivo et ex vivo dans le duodénum

Une approche pharmacologique a été menée ex vivo (chambre d'Ussing) sur des duodénums de rats standard afin d'identifier les interactions CCK-SNE.

Enfin le troisième et dernier objectif était d'étudier l'effet d'une restriction protéique périnatale (pendant la gestation et la lactation) sur la régulation de la prise alimentaire à court

terme par la CCK chez le rat adulte âgé de 160 jours (**Article 3**). Pour ce faire, nous avons étudié cet effet sur :

- Le comportement alimentaire en cages physiologiques, permettant de mesurer de façon précise et continue la consommation des animaux sur 24h, mais également de décrire la séquence du premier repas après un jeûne pour étudier le rassasiement et la satiété (temps de latence avant un repas, taille et la durée du repas, intervalle entre les repas, ratio de satiété, etc.),
- La cinétique de sécrétion plasmatique de CCK (ELISA) en réponse à un repas,
- La sensibilité aux effets satiétogènes de la CCK évaluée en mesurant la prise alimentaire en réponse à des doses croissantes de CCK (i.p.),
- Le phénotype vagal en mesurant l'expression de récepteurs et neuropeptides impliqués dans la réponse vagale à la CCK, sur la base des travaux de l'équipe de Dockray ([Dockray and Burdyga, 2011](#)),
- Les voies de signalisation de la CCK dans le nerf vague.

En marge de la thèse, nous avons collaboré à l'étude des effets de la programmation nutritionnelle sur le phénotype des neurones entériques dans le côlon et les conséquences fonctionnelles gastro-intestinales (**Article 4 en annexe**).

MODELE EXPERIMENTAL

Dans le cadre de nos études, nous avons utilisé un modèle de rat né avec un retard de croissance intra-utérin couramment utilisé pour des études de programmation métabolique. Ce modèle de rat dénutri est obtenu en soumettant la mère dès le premier jour de gestation et durant toute la durée de la gestation et la lactation à un **régime alimentaire dont le taux de protéines est égal à 8 g pour 100 g d'aliment (Low protein 8%)** (vs 20 g pour 100g d'aliment pour un régime contrôle (Normo proteic 20%)) (Langley and Jackson, 1994; Snoeck et al., 1990) (Tableau 9). Les ratons naissent avec un RCIU et ne subissent pas de rattrapage de croissance pendant la lactation. Au sevrage, les animaux reçoivent un régime standard mais restent de poids inférieur pendant leur croissance et à l'âge adulte, par rapport aux rats nés et allaités par des mères contrôles.

Macronutriments	NP (20 % protéines)	LP (8 % protéines)	Régime standard (16 % protéines)
<u>Protéines</u>			
Caséines	220	90	180
<u>Glucides</u>			
Amidon de maïs	80	80	630
Maltodextrine 10	552	682	
Saccharose			
<u>Lipides</u>			
Huiles végétales			
Matières grasses laitières	43	43	37
Cellulose			
Vitamines (Mélange)	50	50	53
Minéraux (Mélange)	10	10	10
Densité énergétique (kcal/g)	47	48	40
	3.7	3.7	3.6
<u>% macronutriments kcal/g</u>			
Protéines	20	8.0	16
Glucides	63	76	64
Gras	4.3	4.3	3

Tableau 9 : Composition des régimes expérimentaux

Afin de s'affranchir d'un éventuel biais lié à la fluctuation d'hormones chez les femelles les études ont été menées **uniquement chez le mâle**. A la naissance, les ratons mâles sont adoptés de façon aléatoire et chaque portée est équilibrée à 8 ratons. Chaque rate allaite ainsi une portée constituée de 8 ratons mâles jusqu'au sevrage qui a lieu à 21 jours de vie postnatale. Du sevrage jusqu'à la maturité sexuelle (6 semaines) les ratons reçoivent un régime de croissance contenant 20% de protéines. Il est à noter que ce régime contenant 20%

de protéines est différent du régime contrôle donné aux mères pendant la gestation et la lactation et dont les petits constituent notre groupe contrôle. Au-delà de 6 semaines, les rats sont soumis à un régime standard dit d'entretien contenant 16% de protéines jusqu'à la mise à mort (**Figure 18**).

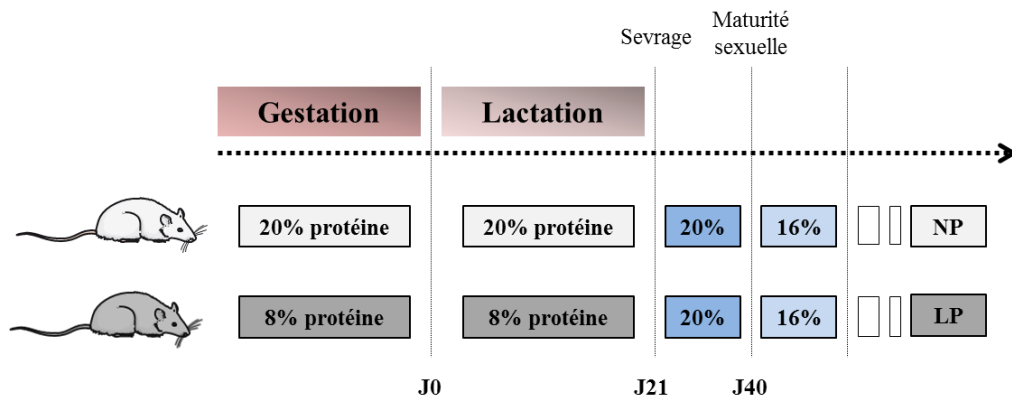


Figure 18 : Protocole expérimental du modèle de rats dénutris en période pré et postnatale.

NP (normo proteic) correspond au groupe contrôle et LP (low protein) correspond au groupe de rats dénutris. J0 = naissance, J21 = âge au sevrage et J40= âge à la maturité sexuelle

Le modèle de rat transgénique CCK-GFP a été développé en collaboration avec la Plateforme de transgénèse TRIP (Transgenese Rat and ImmunoPhenomique, Biogenouest, Nantes) grâce à la méthodologie TALEN (transcription activator-like effector nuclease). La séquence codant pour la protéine fluorescente verte (eGFP) est placée sous le contrôle du promoteur du gène de la CCK et cette cassette est insérée au niveau du locus ROSA26, une zone du génome à forte activité transcriptionnelle. Pour cette étude, ces rats transgéniques CCK-eGFP ont été soumis à une restriction protéique maternelle comme décrit précédemment et seuls les rats mâles **homozygotes** ont été choisis.

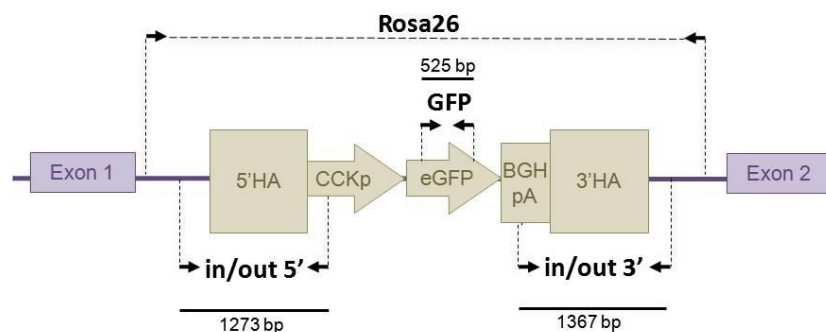


Figure 19 : Schéma de la construction CCK-eGFP (transgène en brun), au sein du locus Rosa26 (en violet).

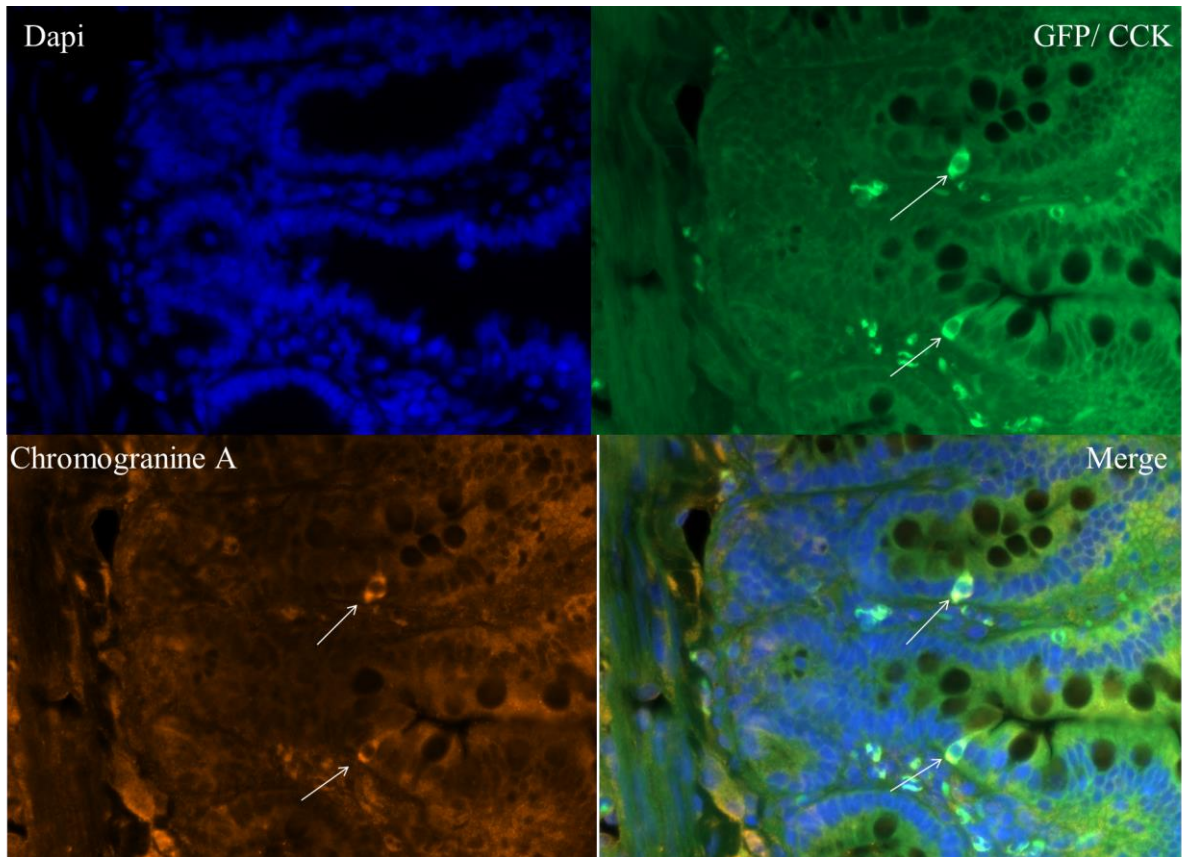


Figure 20 : Photos de cellules entéro-endocrines issues de notre modèle de rat transgénique qui expriment la GFP sous le contrôle du promoteur du gène qui code pour la CCK (CEE-CCK). CCK (GFP) en vert et chromogranine A en rouge marquée par immunohistochimie

RESULTATS EXPERIMENTAUX

RESULTATS 1^{ère} PARTIE : PROGRAMMATION NUTRITIONNELLE DES CELLULES ENTEROENDOCRINES

ARTICLE 1:

Maternal protein restriction increases duodenal density of cholecystokinin-producing enteroendocrine cells in young rats (*En cours de préparation*)

Maternal protein restriction increases duodenal density of cholecystokinin-producing enteroendocrine cells in young rats.

Short title: Nutritional programming of duodenal enteroendocrine cells

M.NDJIM¹, I.GRIT¹, J. P. SEGAIN¹, I. ANEGON², L. TESSON², G. LE DREAN¹

¹*UMR INRA 1280, IMAD, CRNH Ouest, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Nantes, France.*

²*UMR 1064, INSERM - ITUN, Transgènèse Rat et ImmunoPhénomique, IBiSA / Biogenouest, Nantes, France*

Correspondence to:

Gwenola Le Dréan, PhD

UMR 1280 PHAN, CHU Hôtel Dieu, Place Alexis Ricordeau 44093 Nantes, France.

Tel :+ 33 2 44 76 80 76

Fax :+33 2 53 48 20 03

gwenola.ledrean@univ-nantes.fr

Abstract:

Background: Maternal protein restriction (MPR) predisposes to metabolic syndrome in adulthood. Studies have shown that MPR decreases intestinal secreting cells notably goblet and Paneth cells in the ileum. Enteroendocrine cells (EEC) occur from the same secretory progenitor as these cells and secrete gastrointestinal peptides which play a major role in homeostatic regulation. Since satiety dysregulation has been demonstrated in perinatally malnourished adult rats, we hypothesized that MPR could alter the proliferation and/or differentiation of the EEC that produces cholecystokinin (CCK), a key satiety peptide.

Methods: Due to the very low proportion of CCK-producing EEC in the gut (0.3-0.5% of total epithelial cells) we developed a ROSA26-eGFP transgenic rat model expressing GFP under the control of the *CCK* gene promotor. Low protein transgenic rats were obtained by protein restriction of their dams during gestation and lactation [8% (restricted, LP) vs 20% (NP)]. At 6 weeks old, duodenum and jejunum were collected and villi height was measured. The density of total EEC was determined by immunohistochemistry of chromogranin A, a marker of mature EECs and CCK-producing EEC stained in green were directly counted. We also evaluated the percentage of proliferative cells and the number of apoptotic cells by immunohistochemistry of PCNA and caspase 3 respectively. Expression of genes involved in intestinal stem cells fate specification and EEC maturation was measured by qRT-PCR.

Key results: MPR increased villi height in the proximal intestine without increasing the number of proliferating cells in the crypts. Interestingly, the density of CgA-EEC and CCK-producing EEC in the duodenum was 2-fold increased suggesting that MPR may directly impact the development of maturing CCK-producing EEC in the villi. However, there was no effect of MPR on EEC in the jejunum. In contrast, MPR increased the number of goblet cells in the jejunum but not in the duodenum. Unexpectedly, the mRNA expression of genes

involved in early epithelial cells fate specification (Lgr5, Ath1) or endocrine lineage (Ngn3, Pdx1, Pax6, and FoxA1), CCK-producing cells (NeuroD1 and CCK) or goblet cells (KLF4) were not affected by MPR in the duodenum. However, the mRNA expression of mature EEC gene (Chgr A) was significantly reduced in LP rats as compared to control. More interestingly, in the jejunum change in goblets cells density was accompanied by an increased mRNA expression of ATH1 and KLF4 while the expression of other genes was unchanged. These results suggest that MPR may differentially affect cell lineages in the duodenum and the jejunum.

Conclusion: Maternal protein restriction seems to increase specifically the number of EEC in the duodenum but reduces EEC maturation. This increased density of CCK-EEC in young LP rats would favor satietogenic signaling.

Keywords:

Maternal protein restriction, proximal intestine, CCK-eGFP rat, secretory lineage, entero-endocrine cells.

Introduction

Nutritional alterations during fetal and early growth periods might be deleterious later in life [1, 2]. Indeed, the developmental origin of health and disease (DOHaD) theory brings to light that environmental factor notably nutritional alterations during critical developmental stages lead to the appearance of chronic disease later in life [3-7]. This was demonstrated thanks to epidemiological studies that put forward that fetal but also early life malnutrition are related to the appearance of gastrointestinal disorders, type 2 diabetes and obesity at adulthood [2, 8, 9].

Disturbance in neural hypothalamic system, hyperphagia and dysregulation of food intake are all factors that could contribute to the increased risk of obesity observed in perinatally malnourished rats at adulthood [10-14]. As shown by Nagata and al., offspring whose mothers were fed with a restricted caloric diet were hyperphagic from weaning to seven month-old in relation with a decrease in genes expression and plasma concentration of the anorectic peptides cholecystokinin (CCK) and peptide YY (PYY) [15]. Moreover, we have recently shown that at adulthood, maternal protein restricted rats displayed an impaired satiety establishment that was reflected by an increased postprandial CCK plasma concentration but a loss of vagal sensitivity to this peptide thus leading to a dysregulation of short term food intake [16]. Taken together, these dysregulations may be assumed as potential contributing mechanism for the appearance of metabolic syndrome at adulthood in these models.

The regulation of short-term food intake is initiated by gastric distension followed by sensing of nutrients by enteroendocrine cells (EEC) that secrete gastrointestinal peptides [17-19]. EECs are scattered as individual cells throughout the mucosa and weakly represented (1% of cells that lined the intestinal epithelium). EECs arise from the same stem cell as the other intestinal epithelial cells and their differentiation from the endocrine progenitor is ensured by a cascade of transcriptional factors [20, 21]. Early cell fate decision is regulated by Notch and

Wnt signaling pathways. Indeed, in the endocrine precursor, Notch is inactive while Wnt activation allows expression of proendocrine basic helix-loop helix transcription factors namely *Math1* and Neurogenin 3 (*Ngn3*) [22, 23]. *Math1* is the first factor implied in the specification of the three secretory lineages composed of goblet cells, Paneth cells and EEC while *Ngn3* which plays a key role in the differentiation of endocrine lineage from progenitor cells is a downstream target of *Math1* [24]. Despite the low representation of EECs, there are at least 15 different types of EECs [21]. Among the gastrointestinal peptide secreted by these EECs, CCK is a major satiety peptide that is produced by EEC mostly located in the proximal intestine and its physiological actions are integrated through the vagus nerve to the nucleus of the solitary tract, which initiates satiety and relayed anorexigenic signal to the hypothalamus [25, 26].

To date, there is little study that links a potent nutritional programming of food intake regulation in relation with an altered enteroendocrine capability to produce GI peptide [15]. Moreover, there is no study that specifically links this altered endocrine capacity to a maternal nutritional programming of EEC differentiation, notably CCK-producing EEC (CCK-EEC). Experimental studies in rats and piglets have shown that nutritional alterations during fetal and/or postnatal lives alter the architecture of the small intestine and this is reflected by a decrease in the density of secretory cells notably Paneth cells, goblet cells [27, 28] and proliferating cells [28]. In the colon of rats that were caloric-restricted from weaning to postnatal day 90, the number of serotonergic EEC significantly increased while the number of goblet cells decreased [29]. These data suggest that differentiation of the EEC lineage could be affected by a postnatal nutritional stress. However, in rats born with intra-uterine growth retardation due to protein restriction of their dams during gestation, the number of goblet cells during the postnatal development from day 12 to day 40 in the colon was unchanged [30]. Altogether, these studies pointed out that window of nutritional stress at early

life and the age of animals are critical for measuring programming effect on intestinal development.

Since, EECs arise from the same stem cells as these other secretory cells, it is conceivable that EECs might also been subjected to perinatal programming. In view of this, we hypothesized that maternal protein restriction (MPR) may alter the proliferation and/or differentiation of the CCK-EEC lineage, which could contribute to the programming of a deregulated food intake in rats born from and suckled by low protein fed dams. We therefore investigated in offspring of CCK-eGFP dams fed a normo or a low proteic diet during gestation and lactation, the effect of MPR on (i) the density of total EECs and CCK-EECs, (ii) intestinal morphology and (iii) the expression of genes involved in cell fate specification.

Material and methods

Ethics statement

All experiments were conducted in accordance with the European Union regulations for the care and use of animals for experimental procedures (2010/63/EU). Protocols were approved by the local Committee on the Ethics in Animal Experiments of Pays de la Loire (France) and the French Ministry of Research (Project 7953). Animal facility is registered by the French Veterinary Department as A44276.

Animals

A ROSA26-CCK-eGFP transgenic Sprague Dawley rat, which expresses green fluorescent protein (eGFP) under the control of the *CCK* promoter, was developed by the platform TRIP (Transgenese Rat and ImmunoPhenomique, Biogenouest, Nantes) thanks to the transcription activator-like effector nuclease (TALEN) methodology. The coding sequence of *eGFP* was inserted with the intended use as a reporter for CCK expression. Knock-in rats were fertile and had body weights and body compositions similar to their wild-type littermates. At 8 weeks-old, eGFP females were bred with eGFP males to produce homozygous pups expressing CCK-eGFP cells. At gestational day 1 pregnant eGFP females were housed individually under standard laboratory conditions with free access to either a normo proteic diet (NP; 20% w/w protein, n=5) or an isocaloric low-protein (LP) diet (8% protein, n=5) through gestation and lactation. Both diets were purchased from AB diets (Woerden, The Netherlands). At delivery, litter size was adjusted to eight male pups per dam. Offsprings (NP and LP) were weaned at 21 days of age and received a standard chow (A04, Safe, Augy, France) until the end of the experiment at 6 to 8 weeks. Rats were given free access to water and laboratory chow (A04, Safe, Augy, France) for 1 week before the beginning of the experiment. Animals were exposed to a 12-h reversed light/dark cycle (lights off at 08:00

am), and a constant temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Homozygosity of *GFP* was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) of genomic tail DNA at weaning.

Immunohistochemistry

ROSA26-CCK-eGFP transgenic rats were deprived of food for 24h but had free access to water. The day of the experiment they were anesthetized by isoflurane (4%) and sacrificed by pentobarbital injection. Duodenum and jejunum were collected, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), immediately fixed in 0.1 M PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) for 24h then embedded in paraffin and 4 μm thick sections were fixed to super frost slides. Slides were deparaffinized in Histolemon (Carlo Erba) then rehydrated with descending gradient of ethanol (100%, 80%, 70%, 50%) and finally in distilled water. Afterward, sections were stained with rabbit polyclonal antibodies raised against chromogranin A a specific marker of EEC (Immunostar) or caspase 3 a marker of apoptosis (Cell signaling) or a mouse monoclonal antibody raised against PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) a marker of proliferation (SC-56 Santa Cruz) diluted at 1/1000, 1/50 and 1/100 respectively. This was followed by an incubation with a secondary biotinylated goat anti-rabbit (A24541, Life Technologies) or rabbit-anti mouse (A24522, Life technologies). Chromogranin A was revealed with Alexa Fluor® 568-conjugated streptavidin (S11226, Invitrogen) and slides were incubated with Hoechst (D3571, Molecular Probes) to counterstain cellular nuclei. Whereas caspase 3 and PCNA were revealed with ABC kit (PK-7100 Eurobio Vector) followed by DAB (SK-4100 Vector) and slides were deshydrated. Finally were mounted with ProLong Gold Antifade Reagents (P36930 ThermoFischer Scientific).

Density of CCK-EEC and height of villi

The numbers of total EEC immunoreactive for chromogranine A and CCK-secreting EEC that stained in green thanks to the endogenous fluorescence were counted by fluorescence

microscopy (Zeiss, Axio Imager M2m) in the villi and the crypt of 3 sections of duodenum or jejunum per animal using a 40X objective. Thereafter, the slides were scanned with a NanoZoomer (NanoZoomer Digital slide scanner, Hamamatsu) and the height of villi, the percentage of proliferating cells in the crypts and apoptotic cells in the villi were counted on 3 sections of duodenum or jejunum per animal using the NDP.view2 (Hamamatsu) software.

RNA isolation, cDNA synthesis and Real Time-quantitative Polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA from duodenal and jejunal segments was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies) and treated for 45 min at 37 °C with RQ1 DNase (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France). One microgram RNA was reverse-transcribed using Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Five microliter of a 1/40 dilution of cDNA solution was subjected to real-time quantitative PCR in a BioRad iCycler iQ system using the qPCR SYBR Green MasterMix (Fermentas, Courtaboeuf, France). Quantitative PCR consisted of 45 cycles, 30 s at 95°C and 30 s at 60°C each. Expression levels ($2^{-\Delta Ct}$) were normalized to β -actin.

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) software. Comparisons between groups NP and LP rats were performed with an unpaired, two-tailed, Mann-Whitney test. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

MPR increased the density of total EEC and CCK-EEC in the duodenum

Due to the very low proportion of total EEC and *a fortiori* CCK-EEC in the gut (1% and 0.3-0.5% of total epithelial cells, respectively), we developed a ROSA26-eGFP transgenic rat model expressing *GFP* under the control of the *CCK* gene promoter. This transgenic rat model was then submitted to MPR and we examined whether EEC differentiation is subjected to perinatal programming. Since CCK is secreted by EEC mostly found in the proximal intestine (duodenum and jejunum), we determined the number of total EEC and CCK-EEC in this area (Figure 1). In the duodenum of LP rats, the number of total CgA-EEC and the number of CCK-EEC were 2-fold higher as compared to NP rats (Figure 2A and 2B). In contrast, in the jejunum, there was no significant difference in the number of CCK-EEC (Figure 3A and 3B). In the crypt, we measured no effect of MPR on the number of EEC both in the duodenum and the jejunum (data not shown). Nutritional programming of CCK-EEC seemed to occur specifically in the villi of the duodenum.

MPR increased villi height in the proximal intestine

Maternal protein restriction is known to induce alterations in gut architecture [30]. Since MPR increases the number of EEC, we sought to determine whether the difference in MPR-increased number of EEC might be reflected by a modification of the intestinal morphology. We found that MPR significantly increased villi height both in the duodenum and the jejunum (Figure 2C and 3C). Interestingly, despite this increase, densities of CgA-EEC and CCK-EEC expressed as a ratio of cell number to height of villi were still higher in LP rats (Figure 2D and 2E). However in the jejunum, there was no effect of MPR on EEC density suggesting that MPR did not affect EEC differentiation in this part of the gut (Figure 3D and 3E). These results led us to the hypothesis that MPR might affect intestinal epithelium homeostasis

regulated by the balance between proliferation/differentiation along the crypt-villus axis and constant loss of differentiated cells at the villus tip.

MPR did not affect neither the percentage of proliferating cells nor apoptotic cells

To test this hypothesis, further study of proliferative and apoptotic process in intestinal epithelium cells lineage of NP and LP rats were performed on duodenal and jejunal sections immunostained with PCNA and caspase 3, respectively. Unexpectedly, the MPR-increased height of villi did not seem to be related to modifications in intestinal epithelium homeostasis since the percentage of proliferating cells in the crypt (Figure 2F and 3F) and apoptotic cell in the villi (Figure 2G and 3G) were similar between NP and LP rats, both in duodenum and jejunum

MPR did not affect the expression of genes involved in enteroendocrine lineage

As EECs differentiation is ensured by a cascade of genes in secretory and endocrine progenitors, we investigated a potent effect of MPR on these genes involved in cell fate specification. To do so, we analyzed by qRT-PCR the mRNA expression of specific markers of stem cells (*Lgr5*), secretory lineage composed by goblet cells, Paneth cells and EECs (*Ath1*), goblet cells (*KLF4*), endocrine lineage (*NGN3*, *PDX1*, *FOXA1* and *CHGA*), and CCK-EEC (*NeuroD* and *CCK*). Unexpectedly, despite an increase number of CgA-EEC and CCK-EEC in the duodenum, the mRNA expression of *Lgr5*, *Ath1*, *NGN3*, *PDX1*, *NeuroD*, *FOXA1* and *CCK* was unaffected by MPR (Table 1). However, the mRNA expression of *CHGA* was decreased in LP rats suggesting that MPR might reduce the maturation of EEC (Table 1). In the jejunum, the mRNA expression of *Lgr5*, *NGN3*, *PDX1*, *NeuroD*, *FOXA1*, *CHGA* and *CCK* was similar between NP and LP rats (Table 2) and this was consistent with an absence of MPR effect on EEC density. Nonetheless, mRNA expression of *Ath1* as well as that of *KLF4*, a marker of goblet cells were increased in jejunum but not in duodenum of LP rats

(Tables 1 and 2). These results support the hypothesis that MPR could differentially affect markers of cells differentiation in these 2 segments of the proximal intestine.

MPR increased the number of goblet cells in the jejunum.

Since MPR increased the mRNA expression of secretory lineage (*Ath1*) and goblet cells (*KLF4*) markers in the jejunum, we aimed to determine whether this effect could be related to a nutritional programming effect on goblet cells. The number of goblet cells in the jejunum was significantly higher in LP rats as compared to NP, while there was no effect in the duodenum (Figure 2H and 3H). This result is consistent with the increased mRNA expression of both *Ath1* and *KLF4*, suggesting that MPR differentially affect epithelial secretory cell fate in the duodenum and the jejunum.

Discussion

We have shown in this study that MPR increases both the number of EEC and CCK-EEC in duodenum but not the jejunum. Despite MPR increased height of villi, the density of EEC and CCK-EEC expressed as a ratio of cell number to height of villi, was still higher in LP rats as compared to NP rats. Unexpectedly, this modification in intestinal architecture was not associated with changes in intestinal epithelium homeostasis since MPR affected neither the percentage of proliferative cells in crypts nor the number of apoptotic cells in villi. Moreover, in the duodenum, MPR did not affect the mRNA expression of genes involved in EEC differentiation, except for *CHGA* that was decreased. These results suggest that MPR may directly impact the development of maturing CCK-EEC in the villi. In the jejunum, the increased number of goblet cells could contribute to the higher height of villi observed in LP rats. This was sustained by an increased mRNA expression of *Ath1* and *KLF4*, both markers of secretory lineage and goblet cells differentiation, respectively. Altogether these results suggest that MPR differently impact the duodenum and the jejunum and its effect on CCK-EEC differentiation seems restricted to the duodenum.

Due to their low proportion in intestinal epithelium, EECs are difficult to study. However, powerful genetic approaches based on transgenic reporter using transcriptional regulatory elements allowed studying EEC thanks to cellular and molecular basic techniques [31-36]. Therefore, to evaluate the nutritional programming of EEC differentiation, we developed a CCK-eGFP transgenic rat model that we submitted to maternal protein restriction. A first finding in our study is that at young age, MPR increased the density of CgA-EEC in the duodenum. Programming of EEC has been very poorly studied. A nutritional model of post-weaning caloric restriction in rat evidenced that differentiation of serotonin secreting EEC could be altered [29]. In piglets born with intra-uterine growth retardation, the number of serotonin and somatostatin-producing EEC was significantly reduced at birth and milk

formula rather than breastfeeding allowed increase in these EEC at one month of age [37]. These studies comfort the hypothesis that EEC could be subjected to pre and/or postnatal nutritional programming. In a different model of programming using maternal deprivation from post-natal day 5 to weaning, Estienne and al. reported an increased number of CgA-EEC in colon [38]. Our study is the first to demonstrate an effect of perinatal protein restriction on Cg-A EEC and CCK-EEC differentiation. Since this increased number of EEC is restricted to the duodenum, one can speculate that MPR would favor early satietogenic signaling in the proximal intestine. But previous data obtained in our lab showed that at this age (6-8 wk), MPR rats are hyperphagic to catch-up their growth as they were born with low birth weight due to intra-uterine growth retardation and suckled by LP fed dams [11, 39]. It seems then that in LP rats, there is a mismatch between the apparent enhanced-endocrine capacity we observed in the present study and their previously described eating behavior. Moreover, at this young age corresponding to a period of rapid growth, rats are resistant to CCK [40, 41] and we have shown that LP rats are more resistant than NP rats to satietogenic effect of CCK (Journal of DOHaD Poinsignon 2014). This increased CCK-EEC density may also represent a population of less mature cells, as revealed by decreased *CHGA* expression. The restrictive effect of MPR on duodenal EEC lineage highlights a recent emerging concept relative to the localization of EEC among the gastrointestinal tract. Each EEC may produce different types of gastrointestinal peptides but the release of one of these peptides would depend of the localisation of the EEC in the different functional parts of the gut [30, 42, 43]. As an early satiety peptide, CCK is secreted by EECs that are located mainly in duodenum [44, 45]. This may explain, at least in part, why the programming effect of MPR on CCK-EEC was restricted to the duodenum. Anyway, further investigations considering others EEC lineage, as for example GLP-1 and PYY secreting cells that are localized more distally in the gut, are required to stand for this restrictive programming effect on endocrine lineage.

Interestingly, we have shown in this study that MPR modified intestinal morphology by increasing height of villi both in duodenum and jejunum. This MPR impact on the morphology of proximal intestine is in contrast with previous data reporting shorter microvilli and decreased villi surface in neonatal intra-uterine growth retardate piglets [46]. Moreover, Fança and al., demonstrated that maternal protein restriction reduced colonic crypt depth in rat at young age from weaning to postnatal day 40 [30]. Similarly, in low birth weight mouse due to maternal hypertension, an altered intestinal morphology was also described with decreased ileal lengths and proliferating cells at postnatal day 14 [28]. Here, we measured MPR effects post weaning at 6 weeks old. These conflicting results reinforce the importance of age in considering programming of intestine. Moreover, as postnatal maturation of intestine is highly related to species, the impact of fetal or early postnatal nutrition may differentially affect intestine development. In our model, bodyweight of LP rats were still smaller than NP rats at this age, so that the increased villi height observed in LP rats may be assumed as a compensation mechanism to ensure intestinal function. Unexpectedly, this increased villi height in the proximal intestine was not related to changes in cells proliferation or to apoptosis. Indeed, the percentage of proliferating cells in crypts and the number of apoptotic cells in villi were similar between NP and LP rats. These results suggest that MPR could favor a conserved capacity of cells to proliferate in the villi. It will be therefore interested to investigate the percentage of proliferating cells and the number of total cells in the villi.

EECs differentiated from stem cells located in the crypt and this differentiation is ensured by a cascade of genes in secretory and endocrine progenitors [21]. Since we observed an effect of MPR on the density of EECs in the duodenum, we therefore investigated its potent effect on genes involved in cell fate specification. We observed no effect of MPR on genes implied in EEC lineage (*Lgr5*, *Ath1*, *NGN3*, *PDX1*, *FOAX1*) or in CCK-producing EEC (*CCK*, *NEUROD1*) differentiation. These unexpected results are difficult to sustain since we

observed an increased density of EEC. However, the whole duodenum, the transcriptomic signal derived from EEC could be diluted, considering the very low proportion of these cells in the mucosa. A specific transcriptomic analysis on duodenal CCK-eGFP cells sorted by FACS would have certainly brought more accurate data. This approach is still in progress in our rat model. As previously evoked, the mRNA expression of *CHGA*, a marker of mature EEC [47, 48] was lower in LP rats as compared to NP. Chromogranin A has long time been considered as co-located with other gastrointestinal peptide in all EEC due to its role in the cleavage of pro-hormone to functional hormone [48]. One recent study described that GLP-1 secreting EECs do not express chromogranin A, calling into question the use of *CHGA* as a marker for determining all subtypes of EEC [49]. Furthermore, it has been demonstrated that beyond chromogranin A, synaptophysin could be considered as a marker of EEC [50-52]. Indeed, two categories of EEC that present two different regulated pathways of secretion have been described. One of these categories is characterized by large dense core vesicles while the other is characterized by synaptic-like vesicle. Both of them are recognized by chromogranin-A and synaptophysin, respectively [50]. Moreover, EECs share with neural cells a number of antigens and PGP9.5 a neuron-specific enolase has been proposed to be a potent marker of EEC [50, 53]. It is therefore possible that in our study, we missed some EECs by using chromogranin A as a characteristic marker of mature EEC.

In the jejunum, MPR increased the mRNA expression of *Ath1* and *KLF4*, markers of secretory lineage and goblet cells differentiation, respectively. Interestingly, this increased expression was related to an increased number of goblet cells in the jejunum. This result is different from that obtained in the colon of low birth weight rat due to protein restriction during the fetal period. Indeed, it has been showed that prenatal protein restriction did not alter the differentiation of goblet cells in the colon of young rats (40d) [30]. However, later in life, a decreased in the number of goblet cells in the colon was observed in our model of MPR

rats (unpublished data), reinforcing, once again, the importance of time window and age of animals when considering the impact of nutritional programming on intestine development. The increased number in goblet cells measured here in jejunum of young MPR rats could contribute to enhance mucosal protection since mucins secreted by goblet cells are major component for intestinal barrier integrity and defense against noxious substances [54-56]. Altogether, these results suggest that MPR could differentially affect the fate of secretory precursors according to their localization in the gut.

To conclude, MPR increased the height of villi both in the duodenum and the jejunum in 6wk old rats. In duodenum, this increase seems to be associated to an increased density of CgA-EEC and CCK-EEC, while in jejunum it would be related to an increased number of goblet cells. Unexpectedly, this modification in intestinal architecture is not reflected by the percentage of proliferating cells in crypts or apoptotic cells in villi. Moreover, in the duodenum, the increased density of EEC can be not related to modifications in the expression of genes involved in their differentiation. A more accurate transcriptomic approach targeted on CCK-eGFP EEC will help to understand these restrictive effects of MPR in different parts of the gut. Finally, long term effect of MPR on these cell lineages should be considered at adulthood.

Author contributions

GLD designed the study. GLD and MN wrote the protocol. MN performed animal experiments. LT, SR developed the ROSA26-eGFP transgenic rat model. MN managed the literature searches, performed the results and statistical analyses. IG helped at performing the results and statistical analyses. MN wrote the first draft of the manuscript. GLD supervised the study, contributed for interpretation of data and JPS revised the manuscript. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Acknowledgments, funding and disclosure

Guillaume Poupeau, Rose Mériaux and Louise Falcon are greatly acknowledged for their contribution at managing animal experiment and for their technical assistance.

This study was supported by a grant from Région Pays de La Loire (PARIMAD project) and LCL (Le Crédit Lyonnais) contribution to Santedige foundation. MN thesis was co-funded by Région Pays de La Loire and INRA, France

The authors disclose no conflicts.

Abbreviations

NP: normo proteic; LP: low proteic; EEC: enteroendocrine cells; CCK: cholecystokinin; CCK-EEC: CCK secreting EEC; MPR: Maternal protein restriction

References

1. Ravelli, A.C., et al., *Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(5): p. 811-6.
2. Ravelli, G.-P., Z.A. Stein, and M.W. Susser, *Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy*. New England Journal of Medicine, 1976. **295**(7): p. 349-353.
3. Barker, D.J., *The fetal and infant origins of adult disease*. BMJ, 1990. **301**(6761): p. 1111.
4. Barker, D.J., *The origins of the developmental origins theory*. J Intern Med, 2007. **261**(5): p. 412-7.
5. Waterland, R.A. and C. Garza, *Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease*. Am J Clin Nutr, 1999. **69**(2): p. 179-97.
6. Barker, D.J., *The developmental origins of adult disease*. J Am Coll Nutr, 2004. **23**(6 Suppl): p. 588s-595s.
7. Barker, D.J., et al., *Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort*. Ann Hum Biol, 2009. **36**(5): p. 445-58.
8. Barker, D.J., et al., *Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease*. BMJ, 1989. **298**(6673): p. 564-7.
9. Syddall, H.E., et al., *Birth weight, infant weight gain, and cause-specific mortality: the Hertfordshire Cohort Study*. Am J Epidemiol, 2005. **161**(11): p. 1074-80.
10. Coupe, B., et al., *Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin*. Endocrinology, 2010. **151**(2): p. 702-13.
11. Orozco-Solis, R., et al., *Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding*. Physiol Behav, 2009. **96**(3): p. 481-92.
12. Lopes de Souza, S., et al., *Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake*. Eur J Neurosci, 2008. **27**(6): p. 1400-8.
13. Cottrell, E.C. and S.E. Ozanne, *Early life programming of obesity and metabolic disease*. Physiology & Behavior, 2008. **94**(1): p. 17-28.
14. Desai, M., et al., *Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(1): p. R91-6.
15. Nagata, E., et al., *Altered gene expressions of ghrelin, PYY, and CCK in the gastrointestinal tract of the hyperphagic intrauterine growth restriction rat offspring*. Horm Metab Res, 2011. **43**(3): p. 178-82.
16. Ndjim, M., et al., *Loss of Vagal Sensitivity to Cholecystokinin in Rats Born with Intrauterine Growth Retardation and Consequence on Food Intake*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 65.
17. Dockray, G., *Gut endocrine secretions and their relevance to satiety*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(6): p. 557-60.
18. Dockray, G.J., *Luminal sensing in the gut: an overview*. J Physiol Pharmacol, 2003. **54 Suppl 4**: p. 9-17.
19. Cummings, D.E. and J. Overduin, *Gastrointestinal regulation of food intake*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 13-23.
20. van der Flier, L.G. and H. Clevers, *Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium*. Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 241-60.
21. Posovszky, C., *Development and Anatomy of the Enteroendocrine System in Humans*. Endocr Dev, 2017. **32**: p. 20-37.
22. May, C.L. and K.H. Kaestner, *Gut Endocrine Cell Development*. Molecular and cellular endocrinology, 2010. **323**(1): p. 70-75.
23. Jenny, M., et al., *Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium*. Embo j, 2002. **21**(23): p. 6338-47.
24. Schonhoff, S.E., M. Giel-Moloney, and A.B. Leiter, *Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types*. Dev Biol, 2004. **270**(2): p. 443-54.

25. Dockray, G.J., *Cholecystokinin and gut-brain signalling*. Regul Pept, 2009. **155**(1-3): p. 6-10.
26. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 661-71.
27. Dong, L., et al., *Intrauterine Growth Restriction Impairs Small Intestinal Mucosal Immunity in Neonatal Piglets*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2014. **62**(7): p. 510-518.
28. Fung, C.M., et al., *Intrauterine Growth Restriction Alters Mouse Intestinal Architecture during Development*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146542.
29. Schoffen, J.P., et al., *Food restriction beginning at lactation interferes with the cellular dynamics of the mucosa and colonic myenteric innervation in adult rats*. An Acad Bras Cienc, 2014. **86**(4): p. 1833-48.
30. Fanca-Berthon, P., et al., *Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats*. Pediatr Res, 2009. **66**(1): p. 47-52.
31. Bohorquez, D.V., et al., *An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89881.
32. Egerod, K.L., et al., *A major lineage of enteroendocrine cells coexpress CCK, secretin, GIP, GLP-1, PYY, and neurotensin but not somatostatin*. Endocrinology, 2012. **153**(12): p. 5782-95.
33. Habib, A.M., et al., *Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells*. Diabetologia, 2013. **56**(6): p. 1413-6.
34. Liou, A.P., et al., *The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin*. Gastroenterology, 2011. **140**(3): p. 903-12.
35. Sykaras, A.G., et al., *Duodenal enteroendocrine I-cells contain mRNA transcripts encoding key endocannabinoid and fatty acid receptors*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42373.
36. Wang, Y., et al., *Amino acids stimulate cholecystokinin release through the Ca(2+)-sensing receptor*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(4): p. G528-37.
37. Radlowski, E., et al., *Development of the enteric nervous system and intestinal neuroendocrine systems in small for gestational age and average for gestational age piglets during the first month of life (1017.1)*. The FASEB Journal, 2014. **28**(1 Supplement).
38. Estienne, M., et al., *Maternal deprivation alters epithelial secretory cell lineages in rat duodenum: role of CRF-related peptides*. Gut, 2010. **59**(6): p. 744-51.
39. Coupe, B., et al., *The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **297**(3): p. R813-24.
40. Balaskó, M., et al., *Age and nutritional state influence the effects of cholecystokinin on energy balance*. Experimental Gerontology, 2013. **48**(11): p. 1180-1188.
41. Balasko, M., et al., *Anorexic effect of peripheral cholecystokinin (CCK) varies with age and body composition (short communication)*. Acta Physiol Hung, 2012. **99**(2): p. 166-72.
42. Fothergill, L.J., et al., *Costorage of Enteroendocrine Hormones Evaluated at the Cell and Subcellular Levels in Male Mice*. Endocrinology, 2017. **158**(7): p. 2113-2123.
43. Martins, P., et al., *Analysis of enteroendocrine cell populations in the human colon*. Cell Tissue Res, 2017. **367**(2): p. 161-168.
44. Furness, J.B., et al., *The gut as a sensory organ*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(12): p. 729-40.
45. Latorre, R., et al., *Enteroendocrine Cells: A Review of Their Role In Brain-Gut Communication*. Neurogastroenterol Motil, 2016. **28**(5): p. 620-30.
46. Dong, L., et al., *Intrauterine Growth Restriction Impairs Small Intestinal Mucosal Immunity in Neonatal Piglets*. J Histochem Cytochem, 2014. **62**(7): p. 510-8.
47. O'Connor, D.T., D. Burton, and L.J. Deftos, *Chromogranin A: Immunohistology reveals its universal occurrence in normal polypeptide hormone producing endocrine glands*. Life Sciences, 1983. **33**(17): p. 1657-1663.
48. Mahata, S.K., et al., *Neuroendocrine cell type-specific and inducible expression of chromogranin/secretogranin genes: crucial promoter motifs*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **971**: p. 27-38.

49. Kampmann, K., et al., *Abundance and turnover of GLP-1 producing L-cells in ileal mucosa are not different in patients with and without type 2 diabetes*. *Metabolism*, 2016. **65**(3): p. 84-91.
50. Rindi, G., et al., *The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1014**: p. 1-12.
51. Wiedenmann, B., et al., *Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(10): p. 3500-4.
52. Wiedenmann, B., et al., *Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system*. *J Mol Med (Berl)*, 1998. **76**(9): p. 637-47.
53. Bishop, A.E., R.F. Power, and J.M. Polak, *Markers for Neuroendocrine Differentiation*. *Pathology - Research and Practice*, 1988. **183**(2): p. 119-128.
54. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. *Curr Gastroenterol Rep*, 2010. **12**(5): p. 319-30.
55. Van der Sluis, M., et al., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(1): p. 117-29.
56. Pelaseyed, T., et al., *The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system*. *Immunol Rev*, 2014. **260**(1): p. 8-20.

Tables

Table 1: Duodenum mRNA relative expression to actin of genes involved in EEC differentiation measured at 8 old-weeks in normo proteic (NP) and low proteic (LP) rats by RT-qPCR in duodenum of NP and LP rats. N = 10 per group. Data were analyzed using Mann Whitney test with *P <0.05 and **P <0.01 considered as significantly different from NP

Table 2: Jejunum mRNA relative expression to actin of genes involved in EEC differentiation measured at 8 old-weeks in normo proteic (NP) and low proteic (LP) rats by RT-qPCR in jejunum of NP and LP rats. N = 10 per group. Data were analyzed using Mann Whitney test with *P <0.05 and **P <0.01 considered as significantly different from NP

Legend to figures

Figure 1: Immunofluorescence ($\times 40$) of EEC in the proximal intestine. Nuclei are stained in blue with Dapi; CCK-EECs are stained in green and total EECs positive for chromogranin A are stained in red

Figure 2: Duodenum (A); Number of total EEC positive for chromogranine A immunostaining (B) Number of CCK-EEC that stained in green height of villi; (C) Height of villi; (D) Density of total EEC positive for chromogranine A immunostaining per millimeter of villi (E) Density of CCK-EEC that stained in green per millimeter of villi; (F) Percentage of proliferative cells; (G) Number of apoptotic cell and (H) Number of goblet cells evaluated at 6 old-weeks in normo proteic (NP) and low proteic (LP) rats. N = 4-5 per group.

Figure 3: Jejunum (A); Number of total EEC positive for chromogranine A immunostaining (B) Number of CCK-EEC that stained in green height of villi; (C) Height of villi; (D) Density of total EEC positive for chromogranine A immunostaining per millimeter of villi (E) Density of CCK-EEC that stained in green per millimeter of villi; (F) Percentage of proliferative cells; (G) Number of apoptotic cell and (H) Number of goblet cells evaluated at 6 old-weeks in normo proteic (NP) and low proteic (LP) rats. N = 4-5 per group

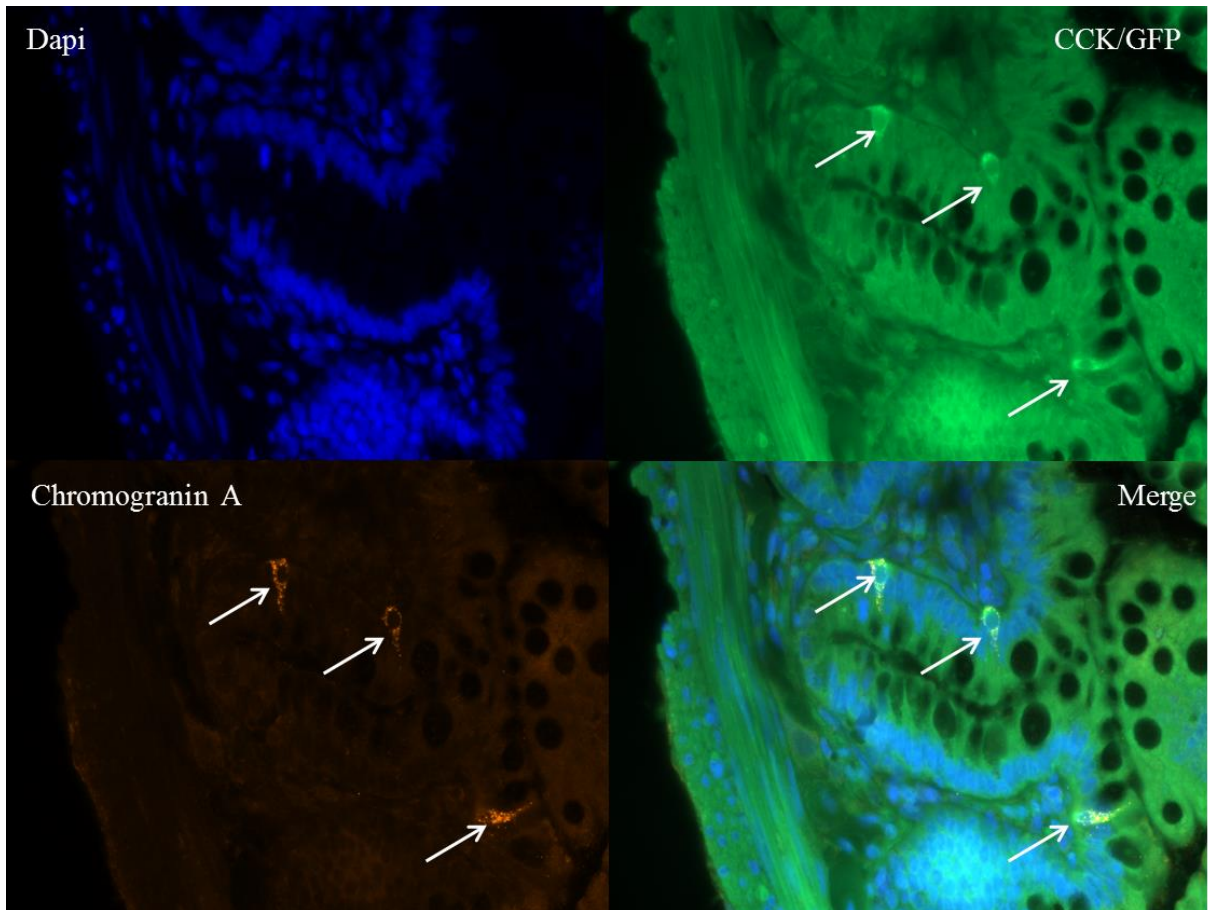


Figure 1: Immunofluorescence ($\times 40$) of EEC in the proximal intestine. Nuclei are stained in blue with Dapi; CCK-EECs are stained in green and total EECs positive for chromogranin A are stained in red.

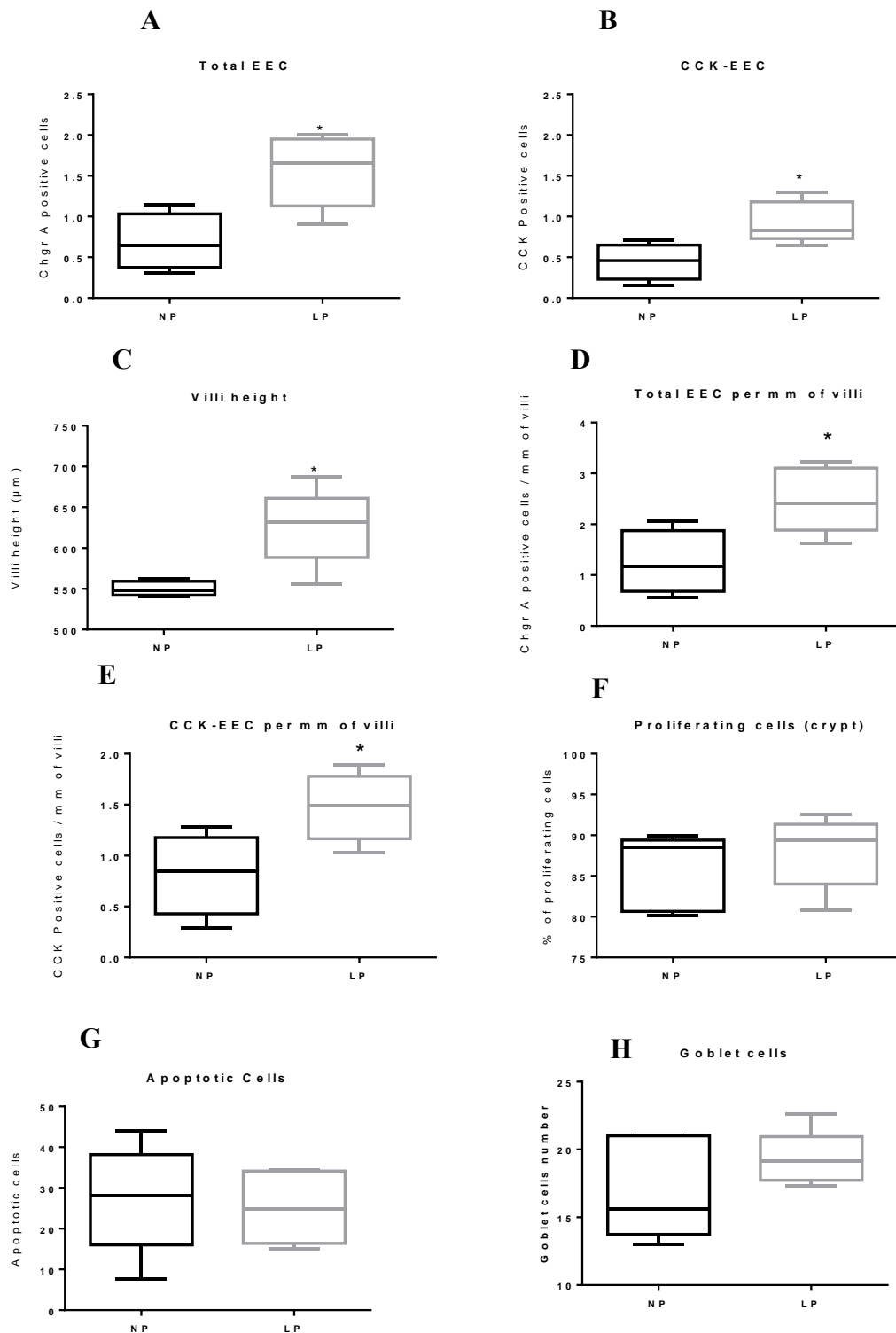


Figure 2: Duodenum (A); Number of total EEC positive for chromogranine A immunostaining (B) Number of CCK-EEC that stained in green height of villi; (C) Height of villi; (D) Density of total EEC positive for chromogranine A immunostaining per millimeter of villi (E) Density of CCK-EEC that stained in green per millimeter of villi; (F) Percentage of proliferative cells (G) Number of apoptotic cell and (H) Number of goblet cells evaluated at 6 old-weeks in normo proteic (NP) and low proteic (LP) rats. N = 4-5 per group. Data were

analyzed using Mann Whitney test with *P <0.05 and **P <0.01 considered as significantly different from NP

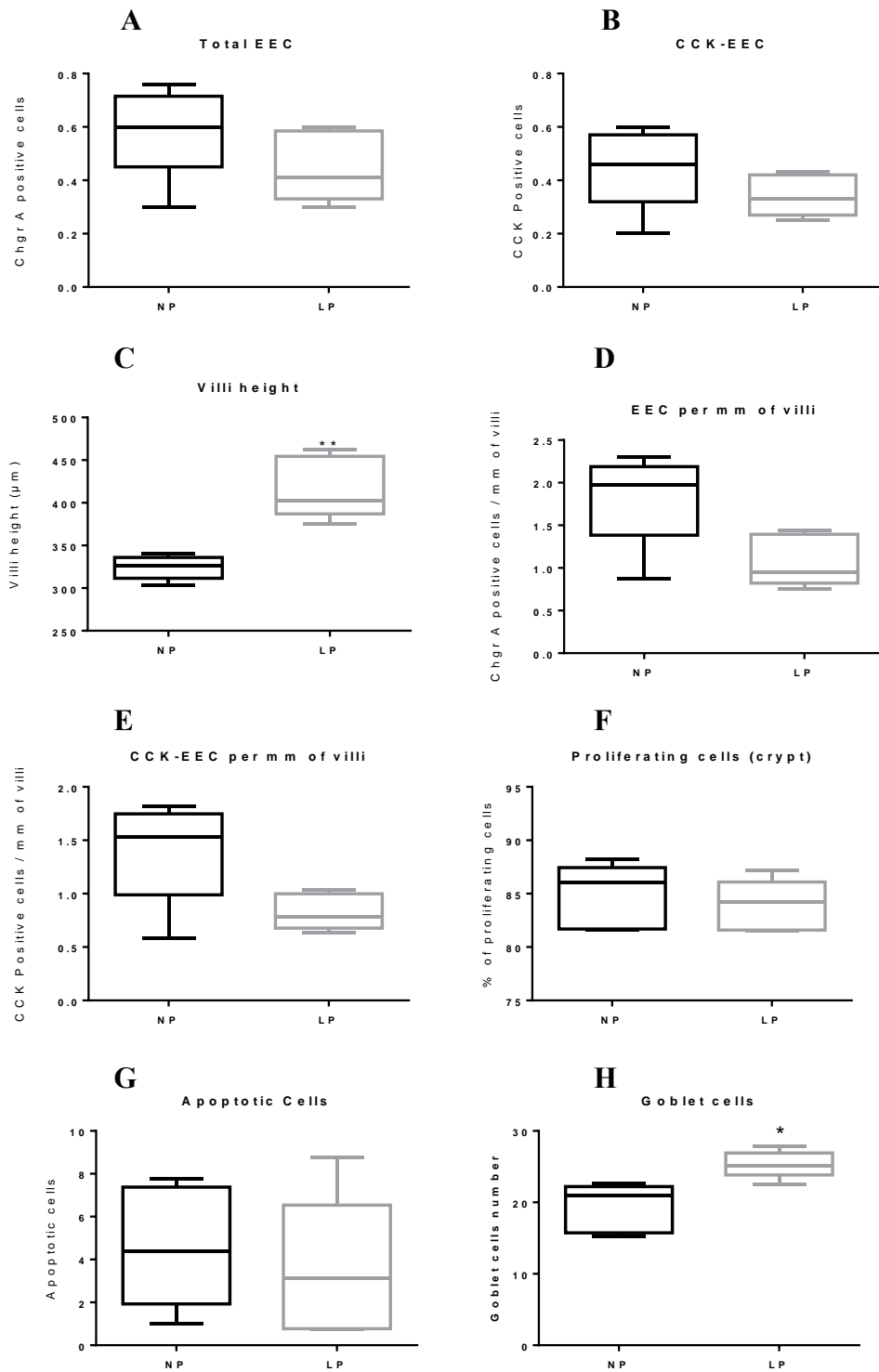


Figure 3 : Jejunum (A); Number of total EEC positive for chromogranine A immunostaining **(B)** Number of CCK-EEC that stained in green height of villi; **(C)** Height of villi; **(D)** Density of total EEC positive for chromogranine A immunostaining per millimeter of villi **(E)** Density of CCK-EEC that stained in green per millimeter of villi; **(F)** Percentage of proliferating; **(G)** Number of apoptotic cell and **(H)** Number of goblet cells evaluated at 6 old-weeks in normo

proteic (NP) and low proteic (LP) rats. N = 4-5 per group. Data were analyzed using Mann Whitney test with *P <0.05 and **P <0.01 considered as significantly different from NP.

RT qPCR analysis of endocrine lineage gene		NP	LP
Function	Gene	Mean ± SEM	Mean ± SEM
Stem cells marker	<i>LGR5</i>	0.57 ± 0.28	0.63 ± 0.34
Cell fate specification	<i>ATH1</i>	0.56 ± 0.11	0.51 ± 0.10
	<i>NGN3</i>	17.2 ± 0.81	17.1 ± 2.55
Endocrine lineage differentiation	<i>PDX1</i>	1.75 ± 0.75	0.58 ± 0.14
	<i>FOXA1</i>	0.53 ± 0.19	0.32 ± 0.12
CCK secreting cells differentiation	<i>NEUROD1</i>	0.56 ± 0.26	0.27 ± 0.05
Goblet cells differentiation	<i>KLF4</i>	6.80 ± 1.21	9.98 ± 2.28
	<i>CHGA</i>	2.56 ± 0.72	0.83 ± 0.14*
EEC maturation	<i>CCK</i>	2.15 ± 0.41	1.79 ± 0.44

Table 1: Duodenum mRNA relative expression to actin of genes involved in EEC differentiation measured at 8 old-weeks in normo proteic (NP) and low proteic (LP) rats by RT-qPCR in duodenum of NP and LP rats. N = 10 per group. Data were analyzed using Mann Whitney test with *P <0.05 and **P <0.01 considered as significantly different from NP

RT qPCR analysis of endocrine lineage gene		NP	LP
Function	Gene	Mean ± SEM	Mean ± SEM
Stem cells marker	<i>LGR5</i>	0.06 ± 0.03	0.18 ± 0.06
Cell fate specification	<i>ATH1</i>	0.32 ± 0.07	2.37 ± 0.55**
	<i>NGN3</i>	3.33 ± 0.34	4.68 ± 0.5
Endocrine lineage differentiation	<i>PDX1</i>	0.21 ± 0.06	0.19 ± 0.08
	<i>FOXA1</i>	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.04
CCK secreting cells differentiation	<i>NEUROD1</i>	0.08 ± 0.01	0.15 ± 0.07
Goblet cells differentiation	<i>KLF4</i>	2.12 ± 0.64	3.53 ± 0.53*
	<i>CGHA</i>	0.21 ± 0.04	0.34 ± 0.11
EEC maturation	<i>CCK</i>	0.26 ± 0.06	0.23 ± 0.05

Table 2: Jejunum mRNA relative expression to actin of genes involved in EEC differentiation measured at 8 old-weeks in normo proteic (NP) and low proteic (LP) rats by RT-qPCR in jejunum of NP and LP rats. N = 10 per group. Data were analyzed using Mann Whitney test with *P <0.05 and **P <0.01 considered as significantly different from NP.

RESULTATS 2^{ème} PARTIE : PROGRAMMATION DE LA FONCTION DE « SENSING » NUTRITIONNEL INTESTINAL

ARTICLE 2:

Perinatal protein restriction in rats promotes cholecystinin-mediated fatty acid sensing, but leads to increased-intestinal permeability (*En cours de préparation pour soumission dans Neurogastroenterology and motility*).

Perinatal protein restriction in rats promotes cholecystinin-mediated fatty acid sensing and leads to increased-intestinal permeability.

Short title: Nutritional programming of gut sensing

**M.NDJIM¹, P.AUBERT², P. de COPPET¹, L. TESSON³, I. ANEGON³, C. BONNET¹,
M. NEUNLIST², G. LE DREAN¹**

¹*UMR INRA 1280, IMAD, CRNH Ouest, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Nantes, France.*

²*UMR INSERM 1235, IMAD, CRNH Ouest The enteric nervous system in gut and brain disorders, Nantes, France*

³*UMR 1064, INSERM - ITUN, Transgène Rat et ImmunoPhénomique, IBiSA / Biogenouest, Nantes, France*

Correspondence to:

Gwenola Le Dréan, PhD

UMR 1280 PHAN, CHU Hôtel Dieu, Place Alexis Ricordeau 44093 Nantes, France.

Tel: + 33 2 44 76 80 76

Fax: +33 2 53 48 20 03

gwenola.ledrean@univ-nantes.fr

Abstract:

Background: Maternal protein restriction (MPR) predisposes to metabolic diseases later in life. Entero-endocrine cells (EEC) sense luminal nutrients to secrete regulatory peptides, which relay nutrients actions upon gut and brain functions. In particular, cholecystokinin (CCK) producing-EEC in duodenum sense long chain fatty acids (LCFA) to initiate vagally-induced satiety. In addition, LCFA induced-CCK secretion has been shown to activate sensory neurons of the enteric nervous system (ENS). We hypothesized that nutrient sensing of CCK producing-EEC and ENS could be altered by perinatal malnutrition, leading to impaired sensory signaling from gut to brain and further metabolic dysfunctions.

Methods: Two months-old malnourished rats (LP; obtained by low protein fed dams during gestation and lactation) and controls rats (NP; normo proteic fed dams) received an oral administration of palmitoleate (PAL, 210mg.kg⁻¹) to indirectly measure EEC (postprandial CCK) and ENS activation (duodenal paracellular permeability *in vivo* and *ex vivo*). We also characterized *ex vivo* the direct impact of CCK upon duodenal paracellular permeability.

Key results: In LP rats, oral PAL increased postprandial plasma concentration of CCK and duodenal FFAR4 mRNA expression. This PAL sensing was accompanied by altered intestinal barrier integrity as reflected by an increased paracellular permeability and mucosal mRNA expression of pro-inflammatory cytokines. Moreover CCK increased *ex vivo* duodenal paracellular permeability was blunted in presence of atropine a cholinergic pathway blocker.

Conclusion and inferences: MPR promotes CCK gut chemosensing leading to the alteration of intestinal permeability and CCK could mediate this effect via a cholinergic pathway in the ENS.

Keywords: 6/6 alphabetical orders

Developmental Origin of Health and disease (DOHaD), duodenum, entero-endocrine cells, enteric nervous system, nutrient sensing, permeability

Key points

- Maternal protein restriction (MPR) alters satiety establishment. Long chain fatty acid (LCFA) sensing by cholecystinin (CCK) secreting entero-endocrine cells (EEC) has been shown to involve enteric sensory neurons. We hypothesized that MPR could alter EEC and ENS function in gut chemosensing.
- MPR enhances LCFA sensing and increases duodenal paracellular permeability and cytokines expression. This increased paracellular permeability could be mediated by CCK action upon ENS cholinergic neurons.
- This improved nutrient sensing may lead to impaired sensory signaling from the brain that could contribute to the appearance of metabolic disorders later in life.

Introduction

The theory of developmental origin of adult diseases brings to light that environmental factor such as nutrition during critical stages of development can contribute to chronic diseases later in life [1-6] including metabolic syndrome [4, 7-9] and gastrointestinal (GI) disorders [10]. Adverse neurodevelopmental consequences of restricted growth are associated with reduced brain structure and function [11]. The appetite regulating neural network has also been extensively demonstrated to be a target for developmental programming [12]. Indeed, experimental studies in rats showed that maternal protein restriction (MPR) altered neural organization of hypothalamic circuits, leading to lasting change in nutrient sensing [13, 14]. These central alterations are related to compensatory overeating, altered satiety and food preferences [15-20] and could contribute to the appearance of obesity at adulthood [16-18, 21, 22]. The role of the GI tract in the increased risk of developing obesity and the long-term effect of developmental programming on gastrointestinal digestive function are less studied [23]. Studies in animal models have shown that early life nutrition impacts the development of the GI tract as reflected by decreased small intestine length and shorter microvilli [24, 25]. Interestingly, MPR during fetal and/or postnatal periods reduced the maturation of the colonic barrier in young rats [26] and increased permeability at adulthood [27].

Detection of luminal nutrients is a major function of the gastrointestinal (GI) tract, involving epithelial cells of the mucosa. In particular, enteroendocrine cells (EEC) possess nutrient chemosensors at their apical surface [28]. Nutrient sensing by EEC led to the production of GI hormones known to regulate food intake, energy balance and digestive functions by signaling to the brain [29]. Among the gastrointestinal peptide, cholecystokinin (CCK) plays a pivotal role in the foregut to initiate satiety by a vago-vagal reflex in response to luminal nutrients, especially long chain fatty acids (LCFA) [30]. CCK-producing EEC expresses receptors such as FFAR1 and FFAR4, as well as the FA translocase CD36, three sensors that have been

demonstrated to mediate LCFA induced-CCK release in vitro and in vivo [31-33]. Besides signaling to the brain [34], EEC have also been purposed as potent modulator of the activity of the enteric nervous system (ENS) which is a key regulator of GI functions such as barrier integrity [35]. 3D electron microscopy observations showing that EEC can develop cellular appendages at their basolateral surface enabling direct connections to the ENS [36] brought the anatomical basis of this EEC-ENS communication. This so-called “gut connectome” facilitates gut hormone action onto enteric neuro-glia circuits and could play a major role in intestinal nutrient sensing [37-39]. Far before the gut connectome was identified, the activation of ENS by physiologically-stimulated EEC was already described [40]. Moreover, Sayegh and al. demonstrated the impact of a LCFA upon ENS under physiological conditions. Indeed infusion of oleate increased c-Fos expression in myenteric and submucosal neurons in the rat proximal intestine [41]. Interestingly, CCK has been suggested to mediate this ENS nutrient sensing since the oleate induced-activation of ENS was mediated through CCK-1 receptor, supporting an indirect nutrient signaling in the ENS. Then, as for brain signaling, the detection of nutrients by ENS is thought to be mediated through release of gastrointestinal peptide by EEC [42].

The impact of luminal sensing upon ENS functions has been mainly investigated under physiological conditions, however the impact of MPR upon this sensing remains largely unknown. It is nevertheless conceivable that impairment of lipid duodenal sensing mechanisms in perinatally malnourished rats may contribute to metabolic and GI disorders later in life, as previously suggest in obesity [43] and functional dyspepsia [43-45].

We hypothesized that MPR may program EEC, which could lead to an altered gut chemosensing and digestive function. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of MPR on the gut chemosensing to an oral challenge of palmitoleate (PAL) and focusing in particular to the role of CCK in these effects. We evaluated the impact

of the oral administration of this monounsaturated LCFA on CCK-secretion and intestinal permeability to fluorescein sulfonic acid (FSA). We also characterized *ex vivo* the direct impact of CCK upon paracellular permeability.

Material and methods

Ethics statement

All experiments were conducted in accordance with the European Union regulations for the care and use of animals for experimental procedures (2010/63/EU). Protocols were approved by the local Committee on the Ethics in Animal Experiments of Pays de la Loire (France) and the French Ministry of Research (Project 7953). Animal facility is registered by the French Veterinary Department as A44276.

Animals

Pregnant Sprague Dawley females (gestation day 1) were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France), housed individually under standard laboratory conditions with free access to either a normo proteic diet (NP; 20% w/w protein, n=10) or an isocaloric low-protein (LP) diet (8% protein, n=10) through gestation and lactation. Both diets were purchased from AB diets (Woerden, The Netherlands) and composition is provided in Table 1. At delivery, litter size was adjusted to eight male pups per dam. Pups were pooled and randomly attributed to foster mothers. Pups born from NP dams were adopted by foster NP ones (NP, n=20) and pups born from LP dams were attributed to foster LP dams (LP, n=20). Offsprings (NP and LP) were weaned at 21 days of age and received a standard chow (A04, Safe, Augy, France) until the end of the experiment (60 days).

A ROSA26-CCK-eGFP transgenic Sprague Dawley rat, which expresses green fluorescent protein (eGFP) under the control of the *CCK* promotor, was developed by the platform TRIP (Transgenèse Rat and ImmunoPhénomique, Biogenouest, Nantes) using the transcription activator-like effector nuclease (TALEN) methodology. Homozygosity of GFP was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) of genomic tail DNA. NP and LP CCK-GFP rats were obtained by submitting homozygous transgenic rats to either a NP or an isocaloric LP diet (n=5 per group), respectively, as described above.

Eight-weeks old male Sprague Dawley rats were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France) (n = 16). Rats were given free access to water and laboratory chow (A04, Safe, Augy, France) for 1 week before the beginning of the experiment.

All animals were exposed to a 12-h reversed light/dark cycle (lights off at 08:00 am), and a constant temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Oral challenge with palmitoleic acid

Rats were deprived of food at the beginning of the dark phase (08:00 am) for 24h with free access to water. On the experimental day, rats were gavaged either with vehicle made of an aqueous solution of polysorbate 80 (1.5% w/w) (Glycosperse O-20 KFG, Lonza, USA) or a long chain fatty acid form of palmitoleic acid (PAL, P9417 Sigma, France) at a dose of $210 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Final concentration was obtained by dispersing the oil in 1.5% w/w of vehicle solution. The choice of the dose for PAL and polysorbate solution was based on previous published data [46] showing that PAL at the doses of 150 and $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ increases plasma level of CCK and reduces food intake in rats. Here we used a lower dose ($210 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) dose to induce CCK release.

After oral administration of PAL or vehicle solution, rats were refed (standard chow, A04 Safe Diet) for 90min after which they were anesthetized under isoflurane 4% and sacrificed. The duodenum was collected, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), and dissected into 2 segments. One segment was immediately used for Ussing chambers and the other segment was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. Blood sample was collected from intracardiac trunk in EDTA containing tubes (Coveto, Montaigu, France) and plasma was stored at -20°C .

In vivo measurement of paracellular permeability

Concomitantly with PAL or vehicle administration, rats were gavaged with a solution of fluorescein-5.6 sulfonic acid (F1130, FSA; 1 mg/ml ; Life Technologies) and plasma

fluorescence intensity was measured 90 min later using a plate reader (Varioskan, ThermoFisher Scientific).

Ex vivo measurement of intestinal paracellular permeability

Ex vivo paracellular permeability was assessed on duodenal samples. Duodenum was removed, washed with Kreb's solution (K3753, Sigma, France) containing 0.1M calcium chloride and 0.5M sodium bicarbonate and mounted in appropriate Ussing chambers exposing a mean surface of 0.0314 cm² (Physiological instruments, San Diego, CA, USA). Each chamber was filled with 2mL of Kreb's solution and the media was maintained at 37°C and continuously oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂. After 30 min of equilibrium, 200 µl of apical medium was withdrawn and replaced by 200 µl of FSA (1mg/ml). The fluorescence level was measured using a plate reader (Varioskan, ThermoFisher Scientific) every 30 min during 180 min by removing 150µl of solution to the basolateral side. After each measurement the 150µl are returned to the basolateral side. Ex vivo paracellular permeability was determined by average of the slope in fluorescence intensity over time.

To assess the direct effect of CCK on paracellular permeability, rats were fasted for 24h at the beginning of the light phase with free access to water. The day of the experiment, rats were anesthetized by isoflurane 4% and sacrificed. The duodenum was collected, rinsed with Kreb's solution and dissected into 8 segments mounted in Ussing chambers in order to assess ex vivo paracellular permeability. Four conditions were tested in duplicate: control (without CCK, TTX or atropine); CCK alone (without TTX or atropine); CCK with TTX and CCK with atropine. Each condition was run on duplicate. CCK octapeptide, sulfated (CCK-8S), tetrodotoxin (TTX, 598217) and atropine (A-0257) were purchased from Bachem (Germany), Biotechnie (United Kingdom) and Sigma, respectively. Each chamber was filled with 2mL of Kreb's solution and the media was maintained at 37°C and continuously oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂. We added TTX (1µM) or atropine (1µM) to the basolateral medium

after 30 min of equilibrium and 10 min before adding CCK-8S (200ng/mL). A volume corresponding to the sum of the volume for these three compounds was first removed before their addition. After 30 min, 200 µl of apical medium was withdrawn and replaced by 200 µl of FSA. The fluorescence level was then measured as described above.

CCK plasma concentration

Plasma concentration of rat CCK8- non-sulfated (NS) was analyzed by ELISA (EIA kit, Phoenix Pharmaceuticals, Strasbourg, France).

RNA isolation, cDNA synthesis and Real Time-quantitative Polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA from duodenal samples was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies) and treated for 45 min at 37 °C with RQ1 DNase (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France). One microgram RNA was reverse-transcribed using Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Five microliter of a 1/40 dilution of cDNA solution was subjected to real-time quantitative PCR in a BioRad iCycler iQ system using the qPCR SYBR Green MasterMix (Fermentas, Courtaboeuf, France). Quantitative PCR consisted of 45 cycles, 30 s at 95°C and 30 s at 60°C each. Expression levels ($2^{-\Delta C_t}$) were normalized to β -actin. Primers sequences are figured in Table 2.

Western blot analysis

Total protein was isolated by protein precipitation from the phenol-ethanol supernatant layer after total RNA has been extracted from duodenal samples with TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies). Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Ten µg of protein was solubilized in electrophoresis sample buffer, loaded in ready-to-use (4-15%) polyacrylamide gels (Mini-protean TGX, Bio-Rad) and transferred onto Trans-Blot Turbo membrane (Bio-Rad). Protein was probed with

the following antibody anti-claudin 2 mouse polyclonal antibody (diluted 1/200, Abcam, France), anti-occludin rabbit monoclonal antibody (ab167161 diluted 1/200, Abcam), and anti- β actin mouse monoclonal antibody (A5441 diluted 1/2000, Sigma). Immunoreactive bands were visualized with DyLight™680 and 800-conjugated antibodies (diluted 1/7500 KPL, Eurobio, France). Band intensities were quantified by infrared scanning densitometry (Odyssey Imaging Systems, LI-COR, Germany). Data are expressed as the ratio of total protein relative to actin

Density of CCK-producing EEC

ROSA26-CCK-eGFP transgenic rats (45d) were deprived of food for 24h but had free access to water. The day of the experiment they were anesthetized by isoflurane (4%) and sacrificed by pentobarbital injection. The duodenum was collected, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and immediately fixed in 0.1 M PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) for 24h. Duodenum was then embedded in paraffin and 4 μ m thick sections were fixed to super frost slides. Slides were deparaffinized in Histolemon (45912 Carlo Erba 3 x 5 min) then rehydrated with descending gradient of ethanol (100%, 80%, 70%, 50% for 5 min each) and finally in distilled water for 5 min. Afterward, the slides were incubated with Hoechst (1/10 000) to counterstain cellular nuclei and tissues were mounted with ProLong Gold Antifade Reagents (ThermoFischer Scientific). Sections were then stained with rabbit polyclonal antibodies raised against chromogranin A a specific marker of EEC (20085 Immunostar). This was followed by an incubation with a secondary biotinylated goat anti-rabbit (A24541, Life Technologies). Chromogranin A was revealed with Alexa Fluor® 568-conjugated streptavidin (S11226, Invitrogen) and slides were incubated with Hoechst (D3571, Molecular Probes) to counterstain cellular nuclei. The density of CCK-producing EEC that stained in green thanks to the endogenous fluorescence and positive for chromogranin A was counted by fluorescence microscopy (Zeiss, Axio Imager M2m) in the villi of 3 sections of duodenum per

animal using a 40X objective. Thereafter the slides were scanned with a NanoZoomer (NanoZoomer Digital slide scanner, Hamamatsu) and the height of villi was measured in 3 sections of duodenum using the NDP.view2 (Hamamatsu) software. The data were then expressed as the percentage of CCK-secreting EEC per mm of villi.

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) software. Comparisons between groups receiving vehicle and PAL both in control and LP rats were performed with an unpaired, two-tailed, Mann-Whitney test. When measures were repeated (drug-response) a Wilcoxon test was applied to compare groups. A P value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Palmitoleic acid increased plasma concentration of CCK in LP rats but not in NP rats

To examine whether nutritional stimulation of CCK release is subjected to perinatal programming, we evaluated PAL induced-CCK secretion in NP and LP rats as compared to vehicle administration. In NP rats, PAL-induced plasma concentration of CCK was decreased ($P < 0.05$, Figure 1A) whereas in LP rats PAL-induced plasma concentration of CCK was significantly increased as compared to vehicle ($P < 0.05$, Figure 1B). This result, though unexpected in NP rats, suggests that MPR could enhance PAL induced-CCK secretion by duodenal EEC.

More duodenal EEC in LP rats than in NP rats

We then sought to determine whether PAL induced changes in CCK secretion could reflect altered density of EEC by MPR. Due to the very low proportion of CCK-secreting EEC in the gut (0.3-0.5% of total epithelial cells [47]), change in their number is difficult to evaluate. We therefore developed a ROSA26-eGFP transgenic rat model, which expresses GFP under the promoter of the *CCK* gene. Using this transgenic model, we determined the impact of MPR on the density of CCK-eGFP -producing cells. We found that LP rats displayed 2 fold more CCK-producing cells than NP rats ($P < 0.05$, Figure 1C and 1D).

Palmitoleic acid increased FFAR4 expression in LP rats

As MPR modulates the number of EEC, we next aimed at determining whether MPR also modulated molecular actors involved in LCFA-induced CCK release such as FFAR4, FFAR1 and CD36. We evaluated by RT-qPCR their mRNA expression [31-33]. First, MPR did not alter the mRNA basal expression of both FFAR1 and FFAR4 while CD36 mRNA expression was lower in LP rats as compared to NP rats (Table 3). In NP rats, there was no effect of PAL neither on FFAR4 nor on FFAR1 mRNA expression (Table 3) while CD36 mRNA expression decreased in response to PAL as compared to vehicle ($P < 0.05$, table 1). In LP rats, the

mRNA expression of FFAR4 was 2 fold-increased in response to PAL as compared to vehicle ($P < 0.01$) whereas FFAR1 and CD36 mRNA expression were unchanged (Table 3). Altogether these results showed a differential regulation in FFAR4 and CD36 in LP rats that could promote PAL sensing by duodenal cells.

Palmitoleic acid increased duodenal paracellular permeability in LP rats

Since MPR enhanced PAL sensing, we aimed at determining this effect upon digestive function ensured by ENS such as permeability. To do so, we assessed both *in vivo* and *ex vivo* paracellular permeability to small molecule using FSA in duodenum samples of NP and LP rats in response to an oral gavage of PAL. In NP rats, there was no statistical difference between groups that received vehicle or PAL on paracellular permeability (Figure 2A and 2B). In contrast, in LP rats, PAL significantly increased the permeability to FSA *in vivo* and *ex vivo* as compared to vehicle ($P < 0.05$, Figure 2C and 2D). This result suggests that an acute oral administration of PAL could alter intestinal barrier integrity in LP rats.

Palmitoleic acid did not alter tight junction expression

As tight junctions are implied in the homeostatic regulation of the intestinal epithelial barrier, we investigated whether changes in the expression of tight junctions (TJs) were associated with the increased paracellular permeability found in LP rats. To do so, we evaluated by qRT-PCR and Western Blot the mRNA and protein expression of claudin 2 and occludin in duodenal samples, respectively. In NP rats, there was no effect of PAL neither in mRNA expression (Figure 2E and 2F) nor in protein expression (Figure 2I and 2J) of TJs as compared to vehicle. In LP rats, PAL only increased claudin-2 mRNA expression ($P < 0.05$, Figure 2G) but there was no change in protein expression as compared to vehicle (Figure 2K). There was also no effect of PAL on occludin expression in LP rats (Figures 2H and 2L). These results suggest that in LP rats, PAL exerts its effect on intestinal barrier integrity through a mechanism that might do not alter tight junction protein expression

Palmitoleic acid increased the expression of markers of inflammation in LP rats

As alteration of the intestinal barrier integrity can lead to inflammation, we determined the mRNA expression in the duodenum of two key cytokines, TNF α and Il-1 β . In NP rats there was no effect of PAL on TNF α and Il-1 β mRNA expression (Figure 2M and 2N). However, in LP rats, mRNA expression of TNF α and Il1 β were significantly increased in response to PAL, as compared to vehicle (Figure 2O and 2P). This result supports the hypothesis that PAL-induced intestinal barrier dysfunction in LP rats is associated to increased mucosal inflammation.

CCK increased paracellular permeability in the duodenum in part via cholinergic pathways

As MPR has been shown to be associated with altered PAL induced CCK release and also increased PAL induced paracellular permeability, we aimed to determine whether CCK could directly regulate paracellular permeability. Basolateral addition of CCK (200ng/mL) increased paracellular permeability in the duodenum as compared to control ($P < 0.01$, Figure 3A). Next, as previous studies have shown that cholinergic pathways can increase paracellular permeability we tested whether CCK-increased paracellular permeability *via* neural cholinergic pathways. In presence of atropine, CCK-induced increase in paracellular permeability was significantly decreased ($P < 0.05$, Figure 3B). In contrast, in the presence of TTX, CCK-induced paracellular permeability tended to be reduced ($P = 0.07$, Figure 3C) as compared to the condition with CCK alone.

Discussion 1456 / 1500

The present study shows that in young rat, maternal protein restriction improves LCFA sensing by CCK-producing EEC but leads to an altered paracellular permeability of the duodenum. In LP rats, duodenal sensing of PAL was enhanced and this result was sustained by the increased postprandial plasma concentration of CCK and mRNA expression of FFAR4 in response to oral PAL administration. Furthermore, the higher density of CCK-producing EEC in the duodenum of LP rats as compared to NP rats possibly may contribute to this enhanced response to PAL. We observed that the PAL induced-increase in plasma concentration of CCK in LP rats was accompanied by altered integrity of intestinal barrier. Indeed, in LP rats PAL increased paracellular permeability *in vivo* and *ex vivo* in the duodenum and these effects were concomitant with an increased mRNA expression of proinflammatory cytokines. Since CCK increased *ex vivo* paracellular permeability via cholinergic pathways of the ENS, we proposed that in LP rats, the enhanced nutrient sensing of PAL that led to the alteration of intestinal barrier integrity is mediated by CCK.

First, to evaluate the effect of MPR on EEC function, we measured plasma concentration of CCK in response to PAL, which is known to promote CCK secretion. Indeed, CCK release can be stimulated by lipid infusion or LCFA oral administration such as oleate and PAL through FFAR [31, 46, 48-50]. A first finding in our study is that PAL increased plasma concentration of CCK in LP rats as compared to vehicle while in NP rats it was unexpectedly decreased. It was shown in 2 months-old standard Sprague Dawley rat that PAL at 500 mg.kg⁻¹ increased plasma concentration of CCK [46]. Here we used a lower dose (210 mg.kg⁻¹) to induce CCK release that was measured 90 min following oral administration instead of 60 min in previous study [31, 46]. How such difference in protocols may explain opposite results is however difficult to sustain. It seems like endocrine capacity of CCK-producing EEC was rapidly depleted in NP rats, leading to a decrease of CCK concentration measured at 90 min.

This unexpected effect of PAL, not observed at 60 min in others study, may reflect regulation of CCK release through the inhibition by adjacent cells of GI peptides secretion such as somatostatin, bile salts or paracrine neural loop. Nevertheless, this result suggests that MPR could induce differential response to PAL sensing by CCK-producing EEC. To further characterize these changes we assessed density of CCK cells in NP and LP rats. Using a ROSA26-eGFP transgenic rat model expressing GFP under the promotor of the *CCK* gene, we showed that LP rats displayed more CCK-producing EEC in duodenal villi than NP rats. This result supports the hypothesis of a nutritional programming of the endocrine lineage that would favor intestine ability to produce more CCK in response to nutrients.

Free fatty acid receptor, especially FFAR1, FFAR4 but also CD36 are expressed on CCK cells and have been shown to mediate LCFA sensing [31-33, 51]. We thus investigated the mRNA expression of these receptors in duodenal mucosa of NP and LP rats. At the basal level (vehicle), FFAR4 and FFAR1 mRNA expression is similar between NP and LP rats. However, in response to an oral administration of PAL, FFAR4 mRNA expression increased in LP rats. PAL-increased FFAR4 expression in LP rats may be associated to an enhanced availability of the receptor at the apical surface of cells and could elicit a higher CCK release. In basal condition, CD36 mRNA expression is significantly higher in NP rats than in LP rats. Interestingly, in response to PAL, its expression was downregulated in NP rats but not in LP rats. This downregulation of CD36 in response to LCFA sensing has been intensively described [52-54]. Tran and al., have shown that early during the postprandial period, CD36 disappears from the luminal side of intestinal villi and that this process is lipid-sensitive [53, 54]. These results are sustained by a decrease in CD36 expression in the mouse gustatory papillae secondary to food intake [55]. As CD36 is highly expressed in the small intestine where it plays a crucial role in fat absorption [56, 57], this absence of downregulation in LP rats suggests a default in lipids absorption in this group. However duodenal accumulation of

PAL and the level of triglycerides in the plasma after oral administration of PAL are similar in both groups (Data not shown). Altogether these results suggest that MPR differently affects lipid sensor in duodenum and seems to promote LCFA sensing through up-regulation of FFAR4. Therefore study on isolated CCK-producing EEC should allow consolidating these data. Indeed, since FFAR4 is expressed on duodenal CCK-producing EEC, isolating these cells from our eGFP-CCK rat model should allow studying the impact of MPR on LCFA increased CCK release through FFAR4.

Functional interactions between chemosensory EEC and sensitive neural circuits have been speculated for a long time [37, 38, 58] and a very recent study demonstrated, at least for serotonin EEC, the existence of a synaptic communication with neurons [36]. Activation of the ENS by LCFA and CCK was previously demonstrated by an increased c-fos expression in proximal intestine myenteric and submucosal plexus of rats in response to oleate administration and this effect was abolished by devazepide, a CCK-1 receptor antagonist [41]. Furthermore, other studies have pointed out a CCK effect on the activation of submucosal cholinergic neurons and the relaxation of duodenal muscle [59, 60].

We then wondered if CCK release in response to PAL in LP rats may lead to altered barrier integrity. We found that the increased plasma concentration of CCK was concomitant with the increased paracellular permeability measured both in vivo and ex vivo in response to oral PAL in LP rats. Rare study evaluates the effect of LCFA in vitro on gastrointestinal function and one has demonstrated a positive effect of polyunsaturated fatty acid on paracellular permeability associated to an increased expression of tight junction (occludin) expression [61]. Intercellular TJs positioned at the lateral cell membrane seal the space between intestinal epithelial cells thus forming a barrier against foreign components. In the present study we revealed any effect of PAL that is a monounsaturated fatty acid on TJs mRNA expression except claudin-2 which is increased in LP rats in response to PAL. Claudin-2 is thought to

favor increased paracellular permeability and its increased expression could contribute to the increased paracellular permeability observed in LP rats [62-64]. However we observe any effect on TJs protein expression. Moreover we solely assessed the expression of claudin-2 and occludin however others tight junction such as ZO-1, Cingulin and other claudins are involved in paracellular permeability regulation [62, 65]. Moreover, more than the mRNA and protein expression the localisation of tight junction protein such as ZO-1 is crucial for the regulation of permeability [65-67]. Therefore an analysis of TJs protein localisation needs to be performed in order to better understand the underlying mechanisms. Furthermore TJs protein expression is modulated by several pro-inflammatory cytokines such as TNF α and IL1 β , which increased expression, have been linked to altered barrier integrity [68-72]. These observations are consistent with our study. Indeed, in LP rats, the increased expression of TNF α and IL1 β could suggest that PAL induced an inflammatory process in LP rats, in association with altered paracellular permeability. Taken together, these data suggest that MPR led to PAL-induced alteration in ENS function by disrupting paracellular permeability in LP rats associated to an inflammatory mechanism.

To indirectly study the effect of nutrient sensing on ENS neurons, we used a pharmacological approach to analyze the effect of CCK on paracellular permeability *ex vivo* in the duodenum of standard Sprague-Dawleys rats. This is the first study that demonstrated a CCK effect on paracellular permeability. Interestingly, CCK increased paracellular permeability in the duodenum and this effect was blunted in presence of atropine, an antagonist of muscarinic receptors. These results suggest that CCK-increased paracellular permeability was mediated through the activation of cholinergic neurons. These results are supported by previous observations reporting an altered epithelial function reflected by an increased intestinal permeability in relation with activation of muscarinic receptor [73, 74].

In conclusion, perinatal protein restriction increased the number of CCK producing cells thus leading to an increased CCK secretion in response to PAL. Another original finding in this study is that CCK exerts its effect upon the ENS by increasing paracellular permeability. Moreover PAL increased paracellular permeability in LP rats and this is concomitant with the increased CCK plasma concentration. Altogether these data demonstrated that LP rats display an enhanced LCFA sensing which lead to an alteration of the intestinal barrier integrity associated to a process of inflammation. These modifications could contribute to the appearance of metabolic syndrome and the alterations of the gastrointestinal function observed in adult perinatally malnourished rats.

Author contributions

GLD designed the study. GLD, PA and MN wrote the protocol. MN, PdC, and CB performed animal experiments. LT, SV developed the ROSA26-eGFP transgenic rat model. MN managed the literature searches, performed the results and statistical analyses. MN wrote the first draft of the manuscript. MNe and GLD supervised the study, contributed for interpretation of data and revised the manuscript. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Acknowledgments, funding and disclosure

Guillaume Poupeau is greatly acknowledged for its contribution at managing animal experiment

This study was supported by a grant from Région Pays de La Loire (PARIMAD project) and LCL (Le Crédit Lyonnais) contribution to Santedige foundation. MN thesis was co-funded by Région Pays de La Loire and INRA, France

The authors disclose no conflicts.

Abbreviations

NP: normo proteic; LP: low proteic; EEC: enteroendocrine cells; CCK: cholecystokinin; ENS: enteric nervous system; PAL: palmitoleic acid; FFAR: free fatty acid receptor; TTX: tetrodotoxine; TNF: tumor necrosis factor; IL1: interleukin 1

References

1. Barker, D.J., *The fetal and infant origins of adult disease*. BMJ, 1990. **301**(6761): p. 1111.
2. Barker, D.J., *The origins of the developmental origins theory*. J Intern Med, 2007. **261**(5): p. 412-7.
3. Waterland, R.A. and C. Garza, *Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease*. Am J Clin Nutr, 1999. **69**(2): p. 179-97.
4. Barker, D.J., *The developmental origins of adult disease*. J Am Coll Nutr, 2004. **23**(6 Suppl): p. 588s-595s.
5. Ravelli, G.-P., Z.A. Stein, and M.W. Susser, *Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy*. New England Journal of Medicine, 1976. **295**(7): p. 349-353.
6. Syddall, H.E., et al., *Birth weight, infant weight gain, and cause-specific mortality: the Hertfordshire Cohort Study*. Am J Epidemiol, 2005. **161**(11): p. 1074-80.
7. Barker, D.J., et al., *Weight in infancy and death from ischaemic heart disease*. Lancet, 1989. **2**(8663): p. 577-80.
8. Chatelain, P., *Children born with intra-uterine growth retardation (IUGR) or small for gestational age (SGA): long term growth and metabolic consequences*. Endocr Regul, 2000. **34**(1): p. 33-6.
9. Neitzke, U., T. Harder, and A. Plagemann, *Intrauterine growth restriction and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal*. Microcirculation, 2011. **18**(4): p. 304-11.
10. Ley, D., et al., *Early-life origin of intestinal inflammatory disorders*. Nutr Rev, 2017. **75**(3): p. 175-187.
11. Miller, S.L., P.S. Huppi, and C. Mallard, *The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome*. J Physiol, 2016. **594**(4): p. 807-23.
12. Ross, M.G. and M. Desai, *Developmental programming of appetite/satiety*. Ann Nutr Metab, 2014. **64 Suppl 1**: p. 36-44.
13. Coupe, B., et al., *Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30616.
14. Qasem, R.J., et al., *Maternal protein restriction during pregnancy and lactation alters central leptin signalling, increases food intake, and decreases bone mass in 1 year old rat offspring*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016. **43**(4): p. 494-502.
15. Cottrell, E.C. and S.E. Ozanne, *Early life programming of obesity and metabolic disease*. Physiology & Behavior, 2008. **94**(1): p. 17-28.
16. Coupe, B., et al., *The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **297**(3): p. R813-24.
17. Desai, M., et al., *Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(1): p. R91-6.
18. Orozco-Solis, R., et al., *Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding*. Physiol Behav, 2009. **96**(3): p. 481-92.
19. Lopes de Souza, S., et al., *Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake*. Eur J Neurosci, 2008. **27**(6): p. 1400-8.
20. Paradis, J., et al., *Perinatal Western Diet Consumption Leads to Profound Plasticity and GABAergic Phenotype Changes within Hypothalamus and Reward Pathway from Birth to Sexual Maturity in Rat*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**.
21. Gali Ramamoorthy, T., et al., *Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: impact on energy balance control*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 126.
22. Ross, M.G. and M. Desai, *Developmental Programming of Offspring Obesity, Adipogenesis, and Appetite*. Clin Obstet Gynecol, 2013. **56**(3): p. 529-36.
23. Chatelais, L., et al., *The level of protein in milk formula modifies ileal sensitivity to LPS later in life in a piglet model*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19594.

24. Fung, C.M., et al., *Intrauterine Growth Restriction Alters Mouse Intestinal Architecture during Development*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146542.
25. Dong, L., et al., *Intrauterine Growth Restriction Impairs Small Intestinal Mucosal Immunity in Neonatal Piglets*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2014. **62**(7): p. 510-518.
26. Fanca-Berthon, P., et al., *Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats*. Pediatr Res, 2009. **66**(1): p. 47-52.
27. Le Drean, G., et al., *Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway*. Faseb j, 2014. **28**(3): p. 1059-70.
28. Furness, J.B., et al., *The gut as a sensory organ*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(12): p. 729-40.
29. Moran, G.W., et al., *Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders?* Therap Adv Gastroenterol, 2008. **1**(1): p. 51-60.
30. Schwartz, M.W., *Central nervous system regulation of food intake*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14 Suppl 1**: p. 1s-8s.
31. Liou, A.P., et al., *The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin*. Gastroenterology, 2011. **140**(3): p. 903-12.
32. Sundaresan, S., et al., *CD36-dependent signaling mediates fatty acid-induced gut release of secretin and cholecystokinin*. Faseb j, 2013. **27**(3): p. 1191-202.
33. Tanaka, T., et al., *Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **377**(4-6): p. 523-7.
34. Dockray, G.J., *The Brain-Gut Axis*, in *Textbook of Gastroenterology*. 2009, Blackwell Publishing Ltd. p. 86-102.
35. Ye, L. and R.A. Liddle, *Gastrointestinal hormones and the gut connectome*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2017. **24**(1): p. 9-14.
36. Bellono, N.W., et al., *Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways*. Cell, 2017. **170**(1): p. 185-198.e16.
37. Bohorquez, D.V., et al., *Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells*. J Clin Invest, 2015. **125**(2): p. 782-6.
38. Bohorquez, D.V., et al., *An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89881.
39. Bohorquez, D.V. and R.A. Liddle, *The gut connectome: making sense of what you eat*. J Clin Invest, 2015. **125**(3): p. 888-90.
40. Kunze, W.A., J.C. Bornstein, and J.B. Furness, *Identification of sensory nerve cells in a peripheral organ (the intestine) of a mammal*. Neuroscience, 1995. **66**(1): p. 1-4.
41. Sayegh, A.I., M. Covasa, and R.C. Ritter, *Intestinal infusions of oleate and glucose activate distinct enteric neurons in the rat*. Auton Neurosci, 2004. **115**(1-2): p. 54-63.
42. Neunlist, M. and M. Schemann, *Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system*. J Physiol, 2014. **592**(14): p. 2959-65.
43. Feinle-Bisset, C., *Upper gastrointestinal sensitivity to meal-related signals in adult humans - relevance to appetite regulation and gut symptoms in health, obesity and functional dyspepsia*. Physiol Behav, 2016. **162**: p. 69-82.
44. Akiba, Y., et al., *Short-chain fatty acid sensing in rat duodenum*. J Physiol, 2015. **593**(Pt 3): p. 585-99.
45. Berg, C.J. and J.D. Kaunitz, *Gut chemosensing: implications for disease pathogenesis*. F1000Res, 2016. **5**: p. 2424.
46. Yang, Z.H., J. Takeo, and M. Katayama, *Oral administration of omega-7 palmitoleic acid induces satiety and the release of appetite-related hormones in male rats*. Appetite, 2013. **65**: p. 1-7.
47. van der Flier, L.G. and H. Clevers, *Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium*. Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 241-60.
48. Matzinger, D., et al., *The role of long chain fatty acids in regulating food intake and cholecystokinin release in humans*. Gut, 2000. **46**(5): p. 688-93.

49. McLaughlin, J., et al., *Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility*. *Gastroenterology*, 1999. **116**(1): p. 46-53.
50. French, S.J., et al., *The effects of intestinal infusion of long-chain fatty acids on food intake in humans*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(4): p. 943-8.
51. Sykaras, A.G., et al., *Duodenal enteroendocrine I-cells contain mRNA transcripts encoding key endocannabinoid and fatty acid receptors*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e42373.
52. Kuda, O., et al., *CD36 protein is involved in store-operated calcium flux, phospholipase A2 activation, and production of prostaglandin E2*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(20): p. 17785-95.
53. Buttet, M., et al., *Deregulated Lipid Sensing by Intestinal CD36 in Diet-Induced Hyperinsulinemic Obese Mouse Model*. *PLoS One*, 2016. **11**(1).
54. Tran, T.T.T., et al., *Luminal Lipid Regulates CD36 Levels and Downstream Signaling to Stimulate Chylomicron Synthesis*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(28): p. 25201-10.
55. Martin, C., et al., *The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e24014.
56. Nassir, F., et al., *CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(27): p. 19493-501.
57. Lobo, M.V., et al., *Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids*. *J Histochem Cytochem*, 2001. **49**(10): p. 1253-60.
58. Bohorquez, D.V., et al., *Characterization of basal pseudopod-like processes in ileal and colonic PYY cells*. *J Mol Histol*, 2011. **42**(1): p. 3-13.
59. Li, Y. and C. Owyang, *Peptone stimulates CCK-releasing peptide secretion by activating intestinal submucosal cholinergic neurons*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(6): p. 1463-70.
60. Martins, S.R., R.B. Oliveira, and G. Ballejo, *Activation of neural cholecystokinin-1 receptors induces relaxation of the isolated rat duodenum which is reduced by nitric oxide synthase inhibitors*. *Braz J Med Biol Res*, 2006. **39**(2): p. 271-5.
61. Jiang, W.G., et al., *Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **244**(2): p. 414-20.
62. Lu, Z., et al., *Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases*. *Tissue Barriers*, 2013. **1**(3): p. e24978.
63. Luettig, J., et al., *Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation*. *Tissue Barriers*, 2015. **3**(1-2).
64. Zeissig, S., et al., *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease*. *Gut*, 2007. **56**(1): p. 61-72.
65. Gunzel, D. and A.S. Yu, *Claudins and the modulation of tight junction permeability*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(2): p. 525-69.
66. Lee, S.H., *Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases*. *Intest Res*, 2015. **13**(1): p. 11-8.
67. Suzuki, T., *Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions*. *Cell Mol Life Sci*, 2013. **70**(4): p. 631-59.
68. Watson, A.J. and K.R. Hughes, *TNF-alpha-induced intestinal epithelial cell shedding: implications for intestinal barrier function*. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1258**: p. 1-8.
69. Coskun, M., *Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease*. *Front Med (Lausanne)*, 2014. **1**: p. 24.
70. Suenart, P., et al., *Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease*. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(8): p. 2000-4.
71. Toedter, G., et al., *Genes associated with intestinal permeability in ulcerative colitis: changes in expression following infliximab therapy*. *Inflamm Bowel Dis*, 2012. **18**(8): p. 1399-410.
72. Nava, P., et al., *Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways*. *Immunity*, 2010. **32**(3): p. 392-402.

73. Cameron, H.L. and M.H. Perdue, *Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro*. *Neurogastroenterol Motil*, 2007. **19**(1): p. 47-56.
74. Saunders, P.R., N.P. Hanssen, and M.H. Perdue, *Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(2 Pt 1): p. G486-90.

Tables

Table 1: Composition of experimental diets (g/kg diet)

Table 2: Primer sequences used for analyses of mRNA expression. Official symbol of corresponding genes are listed. Official full name are developed below with current name used in the present study into brackets. Cartpt: CART prepropeptide; Cckar: cholecystokinin A receptor (= CCK-1R); Ghrl: ghrelin and obestatin prepropeptide; Gip: gastric inhibitory polypeptide (also named glucose-dependent insulinotropic peptide); Npy: neuropeptide Y; Pyy: peptide YY; Npy2r: neuropeptide Y receptor Y2 (= Y2R)

Table 3: mRNA relative expression to actin of LCFA receptor (FFAR4, FFAR1 and CD36) measured by RT-qPCR in duodenum of NP and LP rats 90min after oral administration of vehicle and PAL. (n=10 with * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ considered as significant difference from vehicle in NP and LP groups (Mann Whitney test)).

Table 4: mRNA relative expression to actin of mucosal protection genes (Muc3, Muc4 and TFF3) measured by RT-PCR in duodenum of NP and LP rats 90min after oral administration of vehicle and PAL. (n=10 with * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ considered as significant difference from vehicle in NP and LP groups (Mann Whitney test)).

Legend to figures

Figure 1: Figure 1: A,B Postprandial plasma concentration of CCK measured by ELISA in plasma 90 min after gavage of vehicle or PAL in NP (A) and LP (B) rats (n=10) **(C)** Number of CCK-secreting EEC in the duodenum per mm of villi in NP and LP rats **(D)** Staining (X40) of duodenal CCK secreting cells. Number of rats per group **A, B** n = 10 per group; **(C)** n = 5 per group. Data were analyzed using Mann Whitney test with * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ considered as significantly difference from vehicle in NP and LP groups **(A, B)** or NP **(C, D)**

Figure 2: (A,B,C and D) Paracellular permeability in duodenal segments determined **in vivo** 90 min after oral administration of FSA and vehicle or PA by measurements of plasma fluorescence intensity in NP **(A)** and LP rats **(C)** and **ex vivo** in duodenal segment mounted in Ussing chambers by measurements of mucosal to serosal flux of FSA in NP **(B)** and LP rats **(D)**; **(E. F. G and H)** mRNA relative expression to actin of tight junction claudin-2 **(E. G)** and Occludin **(F. H)** measured by RT-PCR in duodenum segment of NP **(E. F)** and LP **(G. H)** rats 90min after oral administration of vehicle and palmitoleic acid; **(I. J. K and L)** Protein relative expression to actin of tight junction claudin- **(I. K)** and Occludin **(J. L)** measured by Western blot in duodenum of NP **(I. J)** and LP **(K. L)** rats 90min after oral administration of vehicle and palmitoleic acid. **(M, N O and P)** mRNA relative expression to actin of markers of inflammation TNF α **(M. O)** and IL1 β **(N. P)** measured by RT-PCR in duodenum of NP **(M. N)** and LP **(O. P)** rats 90min after oral administration of vehicle and palmitoleic acid. Number

of rats per group $n = 10$. Data were analyzed using Mann Whitney test with $*P < 0.05$ and considered as significantly different from vehicle in NP and LP groups.

Figure 3: A, B and C Paracellular permeability in duodenum segments determined ex vivo in standard male Sprague Dawley rats using Ussing chambers by measurements of mucosal to serosal flux of FSA in presence of CCK (200 ng/ml) (**A**) (CCK was added 30 min before adding sulfonic acid) or CCK + TTX (1 μ M) (**B**) and CCK + atropine (1 μ M) (**C**) (TTX and atropine were added 10 min before adding CCK) ($n=11-16$ Data were analyzed using Wilcoxon test with $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ considered as significantly different from control or CCK.

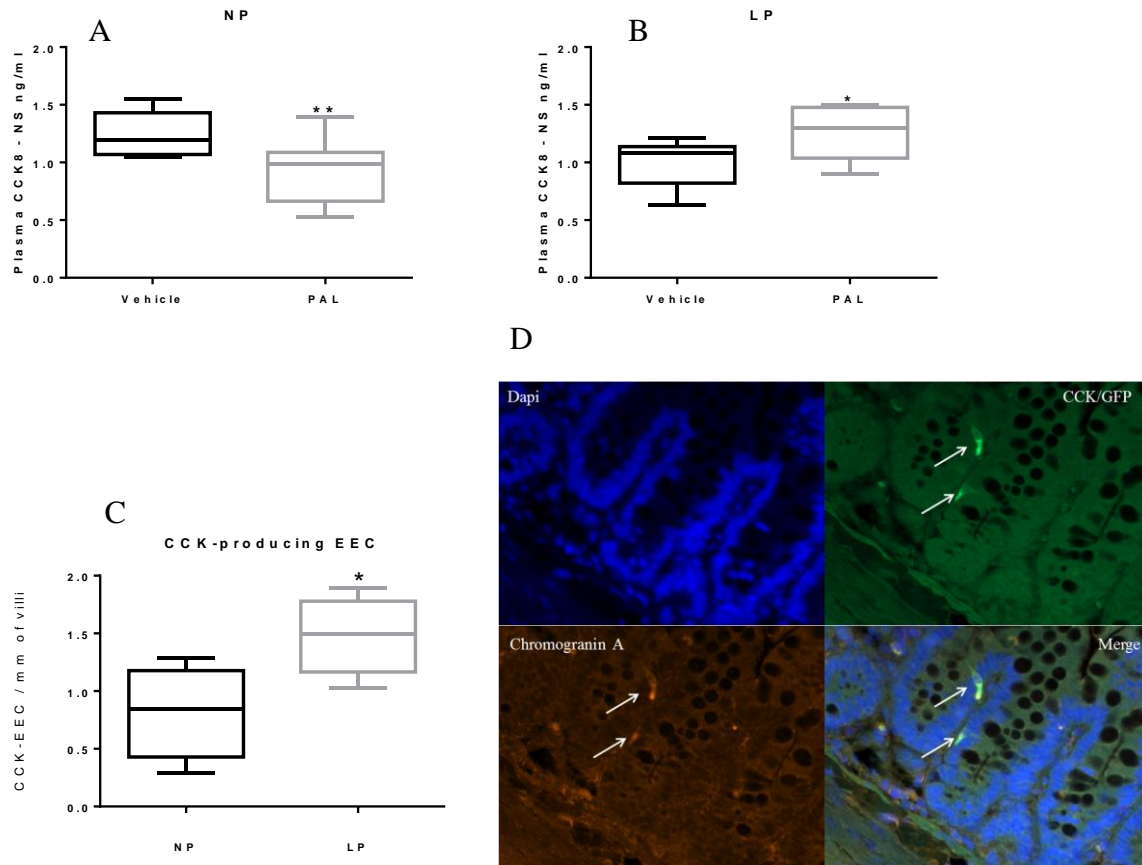


Figure 1: **A,B** Postprandial plasma concentration of CCK measured by ELISA in plasma 90 min after gavage of vehicle or PAL in NP (A) and LP (B) rats (n=10) **(C)** Number of CCK-secreting EEC in the duodenum per mm of villi in NP and LP rats **(D)** Staining (X40) of duodenal CCK secreting cells. Number of rats per group **A, B** n = 10 per group; **(C)** n = 5 per group. Data were analyzed using Mann Whitney test with * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ considered as significantly difference from vehicle in NP and LP groups (**A, B**) or NP (**C, D**)

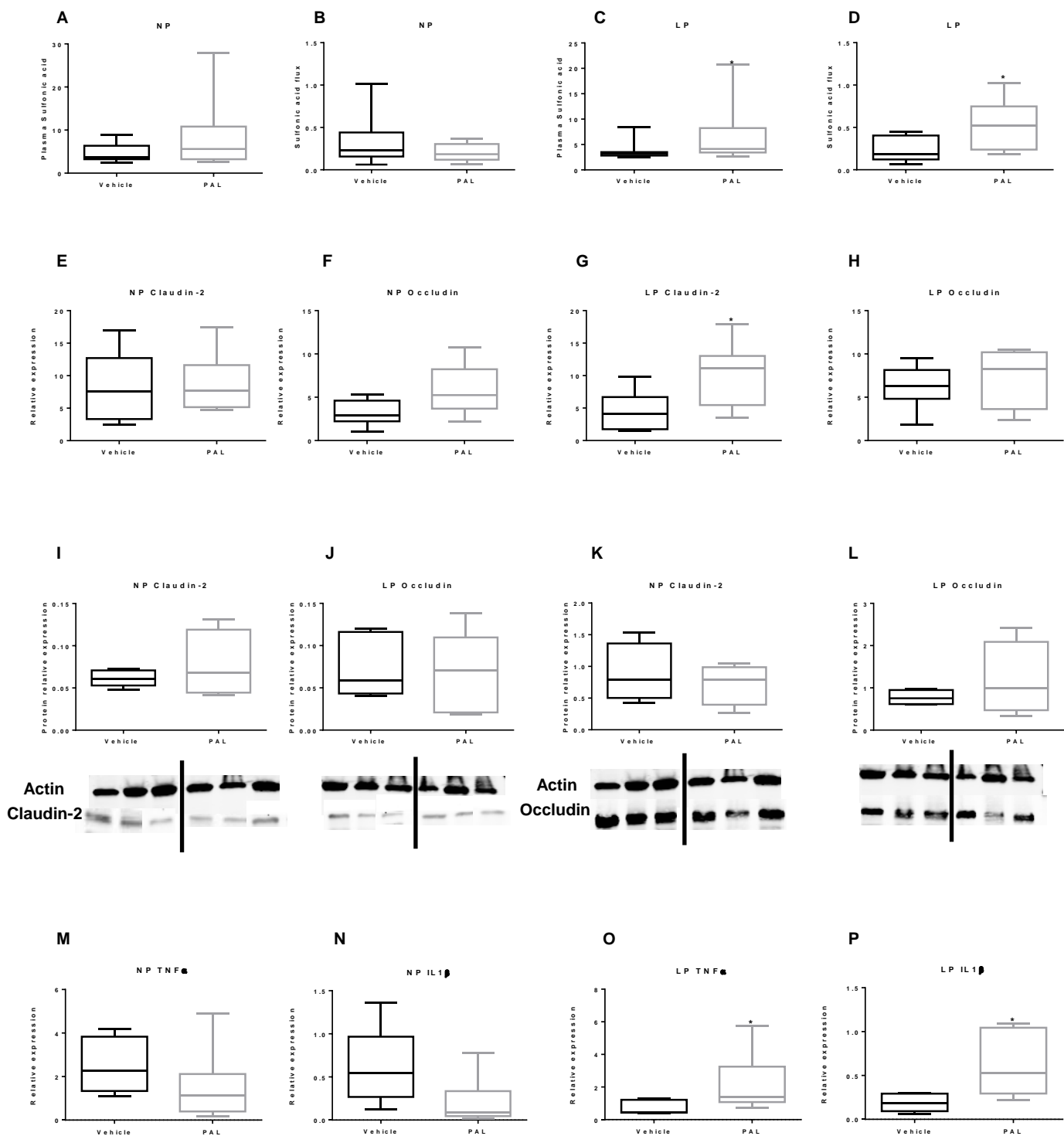


Figure 2 : (A,B,C and D) Paracellular permeability in duodenal segments determined **in vivo** 90 min after oral administration of FSA and vehicle or PA by measurements of plasma fluorescence intensity in NP (A) and LP rats (C) and **ex vivo** in duodenal segment mounted in Ussing chambers by measurements of mucosal to serosal flux of FSA in NP (B) and LP rats (D); (E. F. G and H) mRNA relative expression to actin of tight junction claudin-2 (E. G) and Occludin (F. H) measured by RT-PCR in duodenum segment of NP (E. F) and LP (G. H) rats 90min after oral administration of vehicle and palmitoleic acid; (I. J. K and L) Protein relative expression to actin of tight junction claudin- (I. K) and Occludin (J. L) measured by Western blot in duodenum of NP (I. J) and LP (K. L) rats 90min after oral administration of vehicle and palmitoleic acid. (M, N O and P) mRNA relative expression to actin of markers of inflammation TNF α (M. O) and IL1 β (N. P) measured by RT-PCR in duodenum of NP (M. N) and LP (O. P) rats 90min after oral administration of vehicle and palmitoleic acid. Number of rats per group n = 10. Data were analyzed using Mann Whitney test with * $P < 0.05$ and considered as significantly different from vehicle in NP and LP groups

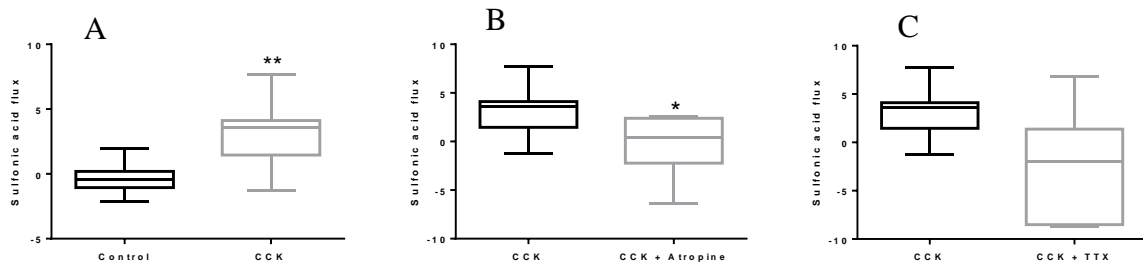


Figure 3: A, B and C Paracellular permeability in duodenum segments determined ex vivo in standard male Sprague Dawley rats using Ussing chambers by measurements of mucosal to serosal flux of FSA (1mg/ml) in presence of CCK (200 ng/ml) (**A**) (CCK was added 30 min before adding sulfonic acid) or CCK + TTX (1 μ M) (**B**) and CCK + atropine (1 μ M) (**C**) (TTX and atropine were added 10 min before adding CCK) (n=11-16). Data were analyzed using Wilcoxon test with * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ considered as significantly different from control or CCK.

Macronutrient	Control (20 % protein)	Low protein (8 % protein)	Standard Chow
<u>Protein</u>			
Casein	220	90	180
<u>Carbohydrate</u>			
Corn starch	80	80	630
Maltodextrin 10	552	682	
Sucrose			
<u>Fat</u>			
Vegetable oil	43	43	37
Milk fat	50		
Cellulose	10	50	53
Vitamin Mix	47	10	10
Mineral Mix	3.7	48	40
Energy density (kcal/g)		3.7	3.6
	20		
<u>% macronutrient kcal/g</u>	63	8.0	16
Protein	4.3	76	64
Carbohydrate		4.3	3
Fat			

Table 1: Composition of experimental diets (g/kg diet).

	GeneBank Accession	Forward primer	Reverse primer
Bactin	NM_031144.3	CTATCGGCAATGAGCGGTTCC	GCACTGTGTTGGCATAGAGGTC
Ffar1	NM_153304.2	GGGACTGGCTCTTGGCTTGG	CCACGCTTCCAGGCAGACC
Ffar4	NM_001047088.1	GACCAGGAAATTCCGATTTG	CTGGTGGCTCTCGGAGTATG
CD36	NM_031561.2	TTGCAGGTCCATCTATGCTGTG	AAGGCGTTGGCTGGAAGAAC

Table 2: Primer sequences used for analyses of mRNA expression. Official symbol of corresponding genes are listed. Official full name are developed below with current name used in the present study into brackets. FFAR1: Free fatty receptor 1 (Also known as GPR40); FFAR4 : Free fatty receptor 4 (Also known as GPR120); CD36 (cluster of differentiation 36).

Gene	NP		LP	
	Vehicle	PAL	Vehicle	PAL
FFAR4	0.36 ± 0.19	0.44 ± 0.15	0.31 ± 0.06	0.89 ± 0.14**
FFAR1	6.58 ± 1.22	4.49 ± 0.82	3.63 ± 0.59	8.26 ± 1.97
CD36	313 ± 31.8	182 ± 35.3*	199 ± 34.9 ^{\$}	198 ± 37.9

Table 3: mRNA relative expression to actin of LCFA receptor (FFAR1, FFAR4 and CD36) measured by RT-qPCR in duodenum of NP and LP rats 90min after oral administration of vehicle and PAL. Number of rats per group n = 10. Data were analyzed using Mann Whitney test with * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ considered as significantly different from vehicle in NP and LP groups and ^{\$} $P < 0.05$ considered as significantly different from vehicle in NP.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET DISCUSSIONS

La restriction protéique maternelle n'affecte pas le « sensing » du palmitate

Seuls les effets du palmitoléate ont été délibérément retenus pour rédiger l'article 2. En effet, la concomitance des observations sur les paramètres du « sensing » nutritionnel (concentration plasmatique de CCK, expression des récepteurs aux AGCL et l'état de la muqueuse duodénale (perméabilité paracellulaire, marqueurs d'inflammation) nous ont amené à approfondir un mécanisme d'action de la CCK sur la perméabilité intestinale impliquant les neurones entériques.

Initialement, le gavage du palmitate devait constituer un contrôle négatif du palmitoléate dans la stimulation de la sécrétion de CCK et de l'inhibition de la prise alimentaire (Yang et al., 2013). Malgré la mise en œuvre d'un protocole extrêmement proche (souche, âge et sexe des rats, dose d'AGCL administrée par gavage, etc.), nous n'avons que très partiellement reproduit les résultats de Yang et al. En effet, nous n'avons pas mesuré d'effet inhibiteur du palmitoléate sur la prise alimentaire chez les rats NP (résultats non montrés) chez qui nous avons même mesuré une diminution de la concentration plasmatique de CCK en réponse au palmitoléate (Figure 1, article 2). La comparaison des 2 AGCL n'apparaissait donc plus aussi pertinente pour l'étude du « sensing » nutritionnel, d'où cette présentation sous forme de résultats complémentaires en marge de l'article 2.

Une administration orale de palmitate (500mg/kg) n'a pas eu d'effet sur la concentration plasmatique de CCK, dans aucun des 2 groupes de rats (Figure 1A et 1B). Cette absence d'effet du palmitate (AGCL saturé) sur la sécrétion de CCK avait été observée par Yang et al. chez des rats standards du même âge (2 mois). Nous confirmons donc ici ce résultat chez les NP et mettons en évidence que les rats LP ne sont pas plus sensibles aux effets du palmitate que les rats NP. Une augmentation significative de la perméabilité intestinale mesurée *in vivo* est observée chez les LP (Figure 2 A et 2B). Néanmoins, cet effet du palmitate ne semble pas affecter le duodénum puisque la perméabilité paracellulaire mesurée *ex vivo* sur ce segment n'est pas modifiée (Figure 2 C et 2D). L'analyse par RT-qPCR de l'expression des récepteurs aux AGCL a montré que FFAR1 et CD36 étaient down-régulés en réponse au palmitate chez les NP mais pas chez les LP (Tableau 1). De plus, l'expression basale de CD36 était significativement plus faible chez les LP que chez les NP. Ces down-régulations de récepteurs couplés aux protéines G suite à la fixation de leur ligand sont classiquement observées dans les mécanismes de régulations physiologiques et cela a été

clairement démontré pour CD36 (Buttet et al., 2016; Martin et al., 2011; Tran et al., 2011). Ces résultats semblent donc indiquer que les récepteurs aux AGCL impliqués dans le « sensing » de ces nutriments ne soient pas régulés de façon optimale dans la muqueuse duodénale des rats LP.

En conclusion : l'ensemble des résultats confirme que la nature des nutriments (AGCL saturé vs monoinsaturé) induit des réponses CCKergiques différentes, comme cela a été démontrée dans la littérature (Liou et al., 2011a; Tanaka et al., 2008; Yang et al., 2013). La dénutrition périnatale ne semble pas modifier de façon notable cette réponse mais serait en revanche à l'origine d'effets délétères de la CCK, quand elle est sécrétée, sur la muqueuse duodénale. Cette sensibilité de la muqueuse duodénale pourrait être due à une dérégulation des récepteurs aux AGCL exprimés dans le duodénum. Un blocage des récepteurs aux AGCL (FFAR4) par un antagoniste spécifique permettrait de vérifier cette hypothèse.

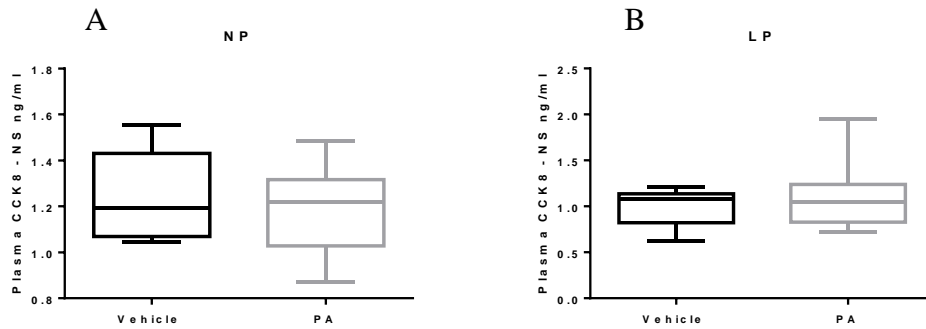


Figure 1: **Concentration plasmatique de CCK** mesuré 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitate (PA) par ELISA chez les rats NP (A) ou LP (B). N = 10. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque $*P < 0.05$ et $**P < 0.01$ alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

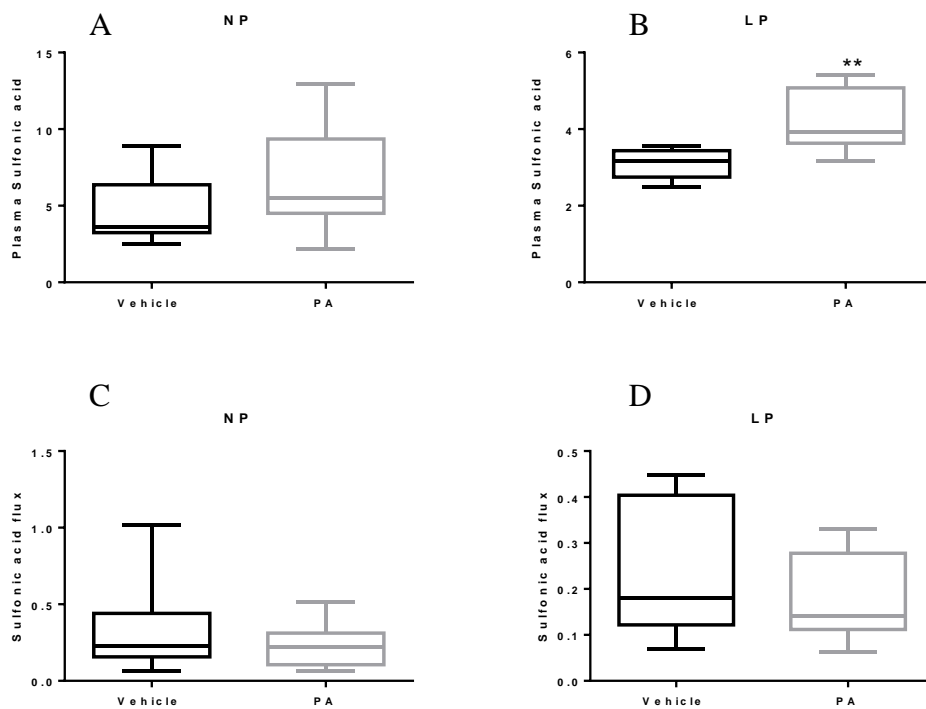


Figure 2: **Perméabilité paracellulaire** déterminée **in vivo** 90 minutes après gavage d'une solution d'acide sulfonique et de vehicle ou palmitate (PA) en mesurant l'intensité plasmatique de la fluorescence chez les rats NP (A) et LP (B) et **ex vivo** sur des segments de duodénum montés en chambre de Ussing en mesurant le flux de l'acide sulfonique du côté apical vers le côté basolatéral chez les rats NP (C) et LP (D). N = 10. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque $*P < 0.05$ et $**P < 0.01$ alors les résultats sont

considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

Gene	NP		LP	
	Vehicle	PAL	Vehicle	PAL
FFAR4	0.36 ± 0.20	0.18 ± 0.04	0.31 ± 0.06	0.30 ± 0.02
FFAR1	6.58 ± 1.22	1.67 ± 0.39 *	3.63 ± 0.59	2.75 ± 0.60
CD36	313 ± 31.8	158 ± 25.7**	199 ± 34.9	189 ± 28.5

Tableau 1 : **Expression des ARNm relative à l'actine des récepteurs aux AGCL (FFAR4, FFAR1 et CD36)** mesurée par RT-qPCR dans le duodénum des rats NP et LP 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitate (PA). N = 10. Les données (Moyenne ± SEM) ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque * $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$ alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

Les effets d'une restriction protéique maternelle sur le « sensing nutritionnel » ne perdurent pas à l'âge adulte

Les dérégulations de prise alimentaire observées préalablement au laboratoire dans notre modèle de restriction protéique maternelle chez le rat se manifestent par des épisodes hyperphagiques en période de croissance jusqu'à l'âge de 2 mois, qui disparaissent avec l'âge pour laisser place à des défauts de satiété à l'âge adulte (Orozco-Solis et al., 2009). Aussi, notre question de la programmation de l'axe intestin-cerveau s'est adressée à ces 2 stades de la vie de l'animal et l'étude de la réponse CCKergique au « sensing » des AGCL a également été réalisée à 130 jours.

Alors que le PAL induit une diminution de la concentration plasmatique de CCK chez les rats NP et une augmentation chez les LP au jeune âge, il n'a pas eu d'effet significatif sur ce paramètre à 130 jours chez les LP. Toutefois, chez les rats NP, la concentration plasmatique de CCK tend à diminuer ($P = 0.07$), (Figure 3A et 3B) ce qui rejoindrait nos observations pour le moins inattendues à J60 dans ce groupe de rats. De même, l'administration orale de palmitate (PA), sans effet à 60 jours, diminue la concentration plasmatique de CCK chez les rats NP mais pas chez les LP (Figure 4A et 4B). Ces résultats suggèrent qu'un bolus d'AGCL pourrait épuiser les capacités de sécrétion de CCK des CEE chez les rats NP, quel que soit l'âge, mais nous manquons de données cinétiques pour soutenir cette hypothèse. Les diminutions de la concentration plasmatique de CCK observées chez les rats NP en réponse aux AGCL supportent l'hypothèse d'une diminution rapide des capacités endocrines des CEE sécrétrices de CCK, qui serait retardée chez les rats LP.

L'expression des récepteurs aux AGCL n'est globalement pas affectée par l'administration orale de PAL ou de PA, à l'exception de CD36 dont l'expression est diminuée en réponse au PA chez les LP (Tableau 2 et tableau 3). De plus, au niveau basal (vehicle), les niveaux d'expression de CD36 et de FFAR1 tendent à être plus élevés chez les rats LP (résultats non montrés).

Concernant les fonctions digestives associées au « nutrient sensing », nous avons, à cet âge-là, mesuré en plus de la perméabilité intestinale, la distension et la vidange gastrique. En effet, n'ayant pas observé l'effet attendu du palmitoléate sur la prise alimentaire à 60 jours, nous avons voulu savoir si ce phénomène digestif initiateur de la satiété était modifié chez les rats LP. Une administration orale de palmitoléate (PAL) entraîne une distension gastrique plus importante comparée à la solution « vehicle » chez les rats NP et LP (Figure 5A et 5B). Cet effet n'a pas été retrouvé après administration orale de PA (Figure 6A et 6B). Cette

distension, reflet d'une vidange gastrique plus lente, pourrait être liée à l'effet satiétogène du palmitoléate mais qui, de façon inexplicite ne s'est pas retrouvé dans les quantités ingérées mesurées 90 minutes après les gavages (Résultats non montrés). Cependant, une mesure de la prise alimentaire sur un temps plus long (3-4h) aurait pu permettre de voir un éventuel effet de PAL sur la quantité de nourriture ingérée.

Enfin, à 130 jours, la perméabilité paracellulaire n'a pas été altérée par PAL (Figure 7A, 7B, 7C et 7D) tandis que la perméabilité paracellulaire *in vivo* augmente dans les deux groupes avec PA (Figure 8A, 8B, 8C et 8D). Ce dernier résultat vient soutenir notre précédente hypothèse émise à partir des résultats obtenues à 60 jours concernant l'effet du PA sur un segment autre que le duodénum puisque la perméabilité paracellulaire mesurée *ex vivo* sur ce segment n'est également pas modifiée à 130 jours. Toutefois ces résultats suggèrent que le palmitate aurait aussi un effet délétère puisqu'il est à l'origine d'une augmentation de la perméabilité.

L'ensemble de ces résultats semble suggérer qu'une restriction protéique maternelle n'affecterait pas la sensibilité duodénale aux AGCL à l'âge adulte.

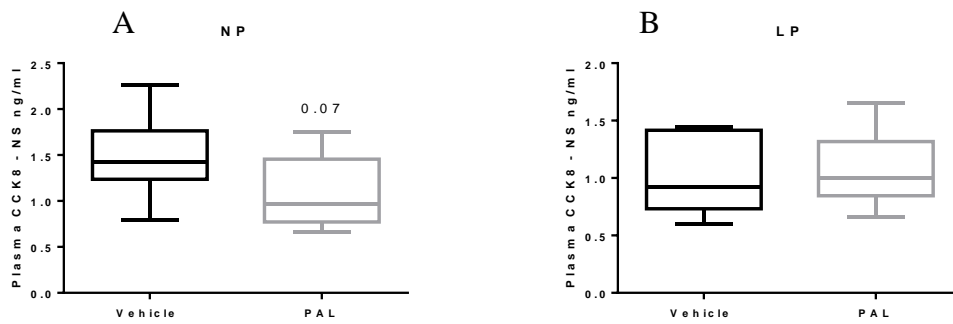


Figure 3: **Concentration plasmatique de CCK** mesuré 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitoléate (**PAL**) par ELISA chez les rats NP (A) ($P=0.07$) ou LP (B). $N = 10$. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque $*P < 0.05$ et $**P < 0.01$ alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

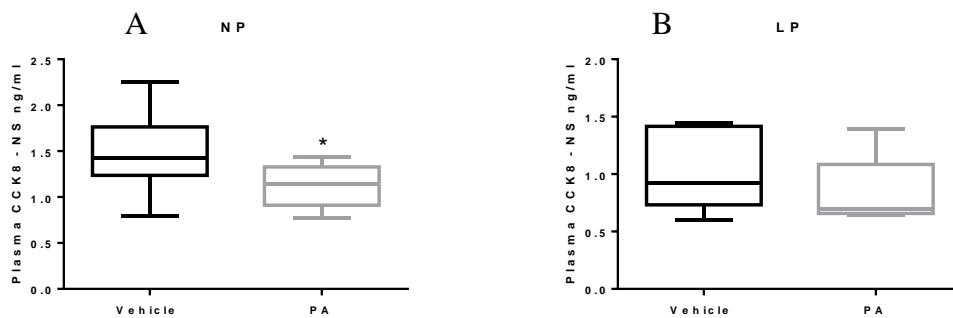


Figure 4: **Concentration plasmatique de CCK** mesuré 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitate (**PA**) par ELISA chez les rats NP (A) ou LP (B). $N = 10$. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque $*P < 0.05$ et $**P < 0.01$ alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

Gene	NP		LP	
	Vehicle	PAL	Vehicle	PAL
FFAR4	0.31 ± 0.09	0.47 ± 0.11	1.01 ± 0.51	1.49 ± 0.75
FFAR1	2.01 ± 0.61	2.8 ± 0.66	4.66 ± 1.39	3.84 ± 0.85
CD36	319 ± 32.5	461 ± 62.3	503 ± 72.2	407 ± 98.7

Tableau 2: **Expression des ARNm relative à l'actine des récepteurs aux AGCL (FFAR4, FFAR1 et CD36)** mesurée par RT-qPCR dans le duodénum des rats NP et LP 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitoléate (**PAL**). N = 10. Les données (Moyenne ± SEM) ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque *P <0.05 et **P <0.01 alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

Gene	NP		LP	
	Vehicle	PA	Vehicle	PA
FFAR4	0.31 ± 0.09	0.57 ± 0.39	1.01 ± 0.51	1.18 ± 0.884
FFAR1	2.01 ± 0.61	12.9 ± 5.28	4.66 ± 1.39	5.64 ± 2.21
CD36	319 ± 32.5	446 ± 80.4	503 ± 72.2	326 ± 20.8*

Tableau 3: **Expression des ARNm relative à l'actine des récepteurs aux AGCL (FFAR4, FFAR1 et CD36)** mesurée par RT-qPCR dans le duodénum des rats NP et LP 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitate (**PA**). N = 10. Les données (Moyenne ± SEM) ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque *P <0.05 et **P <0.01 alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

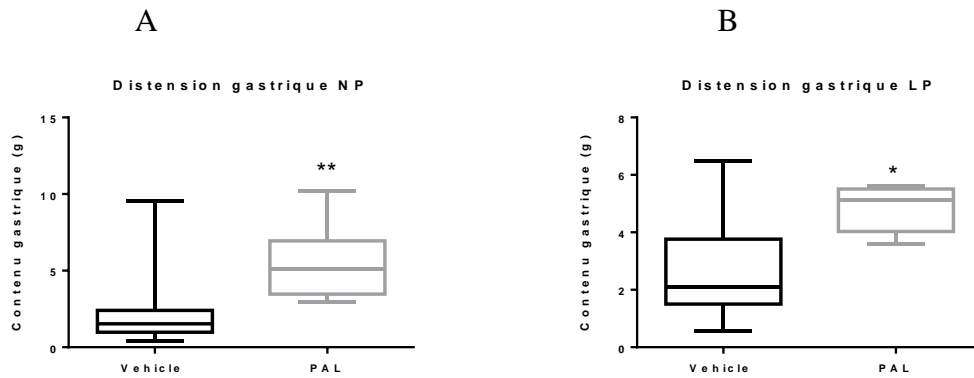


Figure 5: **Distension gastrique** mesurée en pesant le contenu gastrique séché à l'étuve, 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitoléate (**PAL**) chez les rats NP (A) ou LP (B). N = 10. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque *P <0.05 et **P <0.01 alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

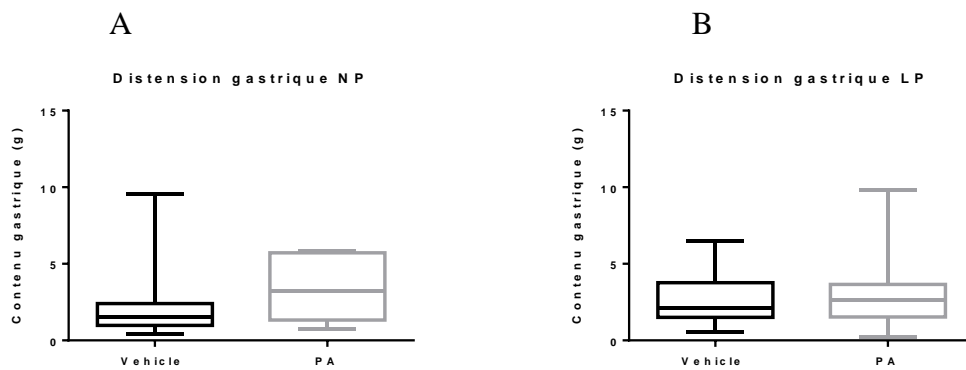


Figure 6: **Distension gastrique** mesurée en pesant le contenu gastrique séché à l'étuve, 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitate (**PA**) chez les rats NP (A) ou LP (B). N = 10. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque *P <0.05 et **P <0.01 alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

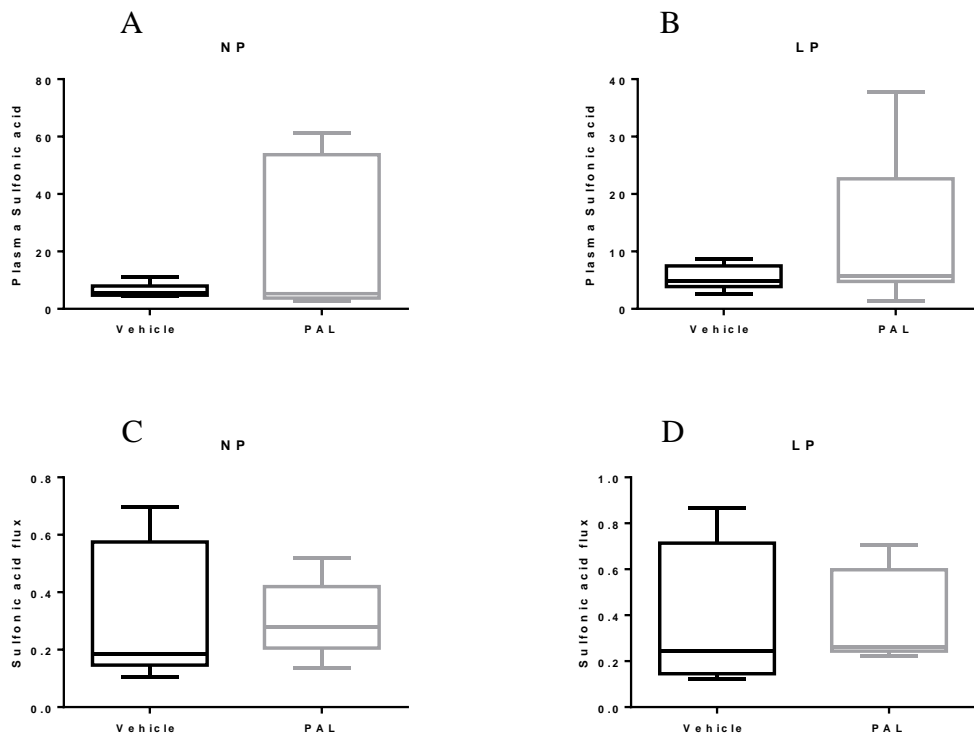


Figure 7: **Perméabilité paracellulaire** déterminée **in vivo** 90 minutes après gavage d'une solution d'acide sulfonique et de vehicle ou palmitoléate (**PAL**) en mesurant l'intensité de la fluorescence plasmatique de l'acide sulfonique chez les rats NP (A) et LP (B) et **ex vivo** sur des segments de duodénum montés en chambre de Ussing en mesurant le flux de l'acide sulfonique du côté apical vers le côté basolatéral chez les rats NP (C) et LP (D). N = 10. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque *P < 0.05 et **P < 0.01 alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

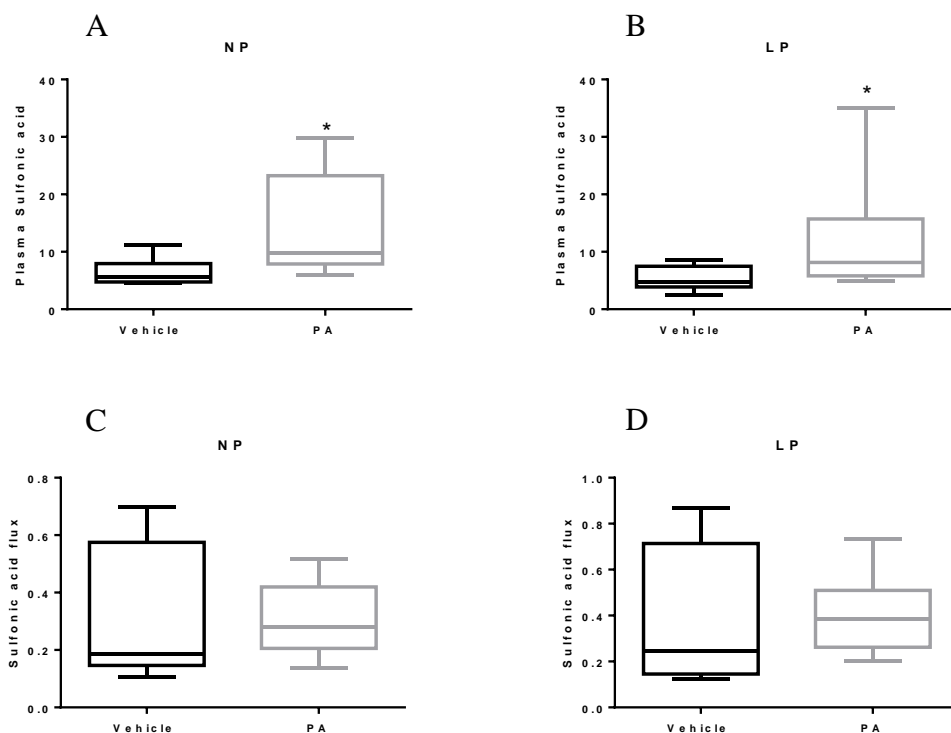


Figure 8: **Perméabilité paracellulaire** déterminée **in vivo** 90 minutes après gavage d'une solution d'acide sulfonique et de vehicle ou palmitate (**PA**) en mesurant l'intensité de la fluorescence plasmatique de l'acide sulfonique chez les rats NP (A) et LP (B) et **ex vivo** sur des segments de duodénum montés en chambre de Ussing en mesurant le flux de l'acide sulfonique du côté apical vers le côté basolatéral chez les rats NP (C) et LP (D). N = 10. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque *P < 0.05 et **P < 0.01 alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

La restriction protéique maternelle serait à l'origine d'un défaut d'absorption et/ou de métabolisme de ces AGCL

Face à ce constat, nous avons voulu savoir si l'absorption et le métabolisme de ces AGCL pouvaient être différents entre les 2 groupes de rats. Nous avons mesuré l'accumulation des acides gras dans le duodénum. Le pourcentage de PAL par rapport aux lipides totaux était augmenté après un gavage de PAL aussi bien chez les rats NP que LP, suggérant ainsi que PAL est bien absorbé par la muqueuse duodénale (Résultats non montrés). En revanche le contenu en PA ne varie pas chez les rats NP après une administration orale de PA tandis qu'il augmente significativement chez les rats LP (Résultats non montrés).

Nous avons également mesuré le taux plasmatique de triglycérides, reflet au moins partiel de l'absorption et de la ré-estérification des AG d'origine alimentaire. De façon intéressante, chez les rats NP, le taux de triglycéride plasmatique est significativement augmenté en réponse au PAL et tend à augmenter en réponse au PA (Figure 9A et 10A) alors qu'ils ne varient pas significativement chez les LP (Figure 9B et 10B). Ce résultat suggère que l'absorption et/ou le métabolisme des AGCL pourrait être altéré chez les rats LP. Dans l'intestin, le transport des triglycérides vers les autres tissus périphériques est assuré par les chylomicrons dont la formation est dépendante de l'apolipoprotéine A4 (Apoa4) qui elle-même stimule la libération de CCK lors de cette formation (Kohan et al., 2015; Wang et al., 2015; Weng et al., 2017). Chez les rats NP, l'augmentation du taux plasmatique de triglycérides était concomitante avec l'augmentation significative du niveau d'expression de l'Apoa4 en réponse aux deux AGCL (Figure 11A et 12A). A l'opposé chez les rats LP, aucun effet des AGCL sur l'expression d'Apoa4 n'a été observé, suggérant là encore, un défaut dans l'absorption et/ou le transport des AGCL dans l'intestin chez les rats LP (Figure 11B et 12B).

En conclusion : l'ensemble de ces résultats démontre que les effets de la dénutrition protéique maternelle sur le « sensing » des AGCL observés à l'âge de 60 jours ne paraissent pas perdurer à l'âge adulte. En revanche, des défauts d'absorption/transport/métabolisme de ces AGCL semblent s'être mis en place. Il est envisagé d'étudier de manière plus approfondie l'effet d'une restriction protéique maternelle sur les mécanismes qui régissent le métabolisme des acides gras. Du fait que les analyses précédemment décrites ont été faites à 90 minutes post-gavage, les potentielles altérations de ce métabolisme devraient s'être produites au niveau intestinal. Ainsi, il serait intéressant d'étudier le profil des acides biliaires puisque ces derniers sont impliqués dans l'émulsion des acides gras facilitant ainsi leur absorption (Abumrad and Davidson, 2012). Les AGCL situés dans la lumière intestinale sont

pris en charge par le transporteur *NPC1L1* (*Niemann-Pick C1-like protein 1*), pour pénétrer dans les cellules intestinales (entérocytes) et être transformés en triglycérides. A l'inverse une fois dans la cellule, les AGCL peuvent retourner vers la lumière intestinale et ce passage se fait par l'intermédiaire des transporteurs *ABCG5/G8* (*ATP-binding cassette G5 et G8*) (Abumrad and Davidson, 2012; D'Aquila, 2016; Feingold and Grunfeld, 2000). Ainsi, on peut tout à fait supposer que chez les rats ayant subi une dénutrition périnatale, il y aurait une perturbation au niveau (i) de la synthèse des acides biliaires, (ii) de la fonction d'un de ces transporteurs ou (iii) de la formation des chylomicrons. Ces altérations pourraient être à l'origine d'une accumulation des AGCL au niveau de la lumière intestinale empêchant ainsi la formation des triglycérides chez les rats soumis à une restriction protéique maternelle.

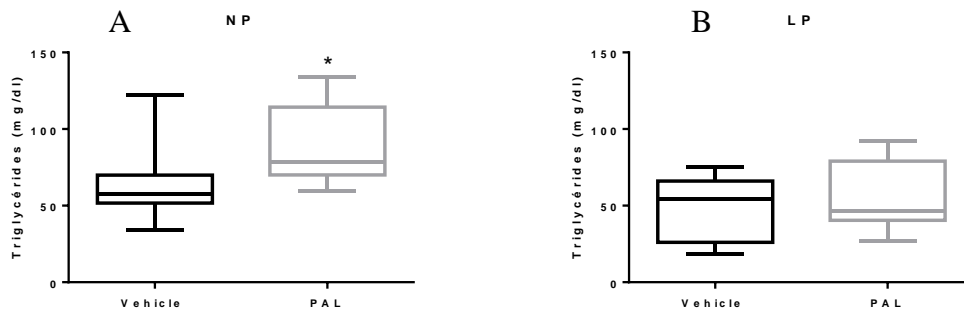


Figure 9: **Taux plasmatique de triglycérides** mesuré 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitoléate (**PAL**) chez les rats NP (A) ou LP (B). N = 10. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque *P <0.05 et **P <0.01 alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

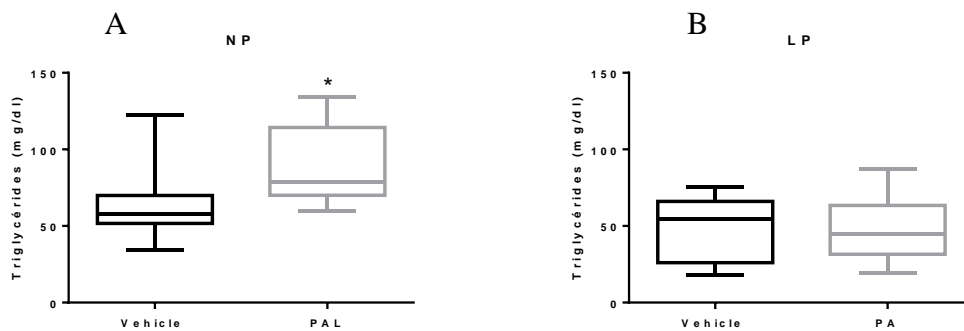


Figure 10: **Taux plasmatique de triglycérides** mesuré 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitate (**PA**) chez les rats NP (A) ou LP (B). N = 10. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque *P <0.05 et **P <0.01 alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

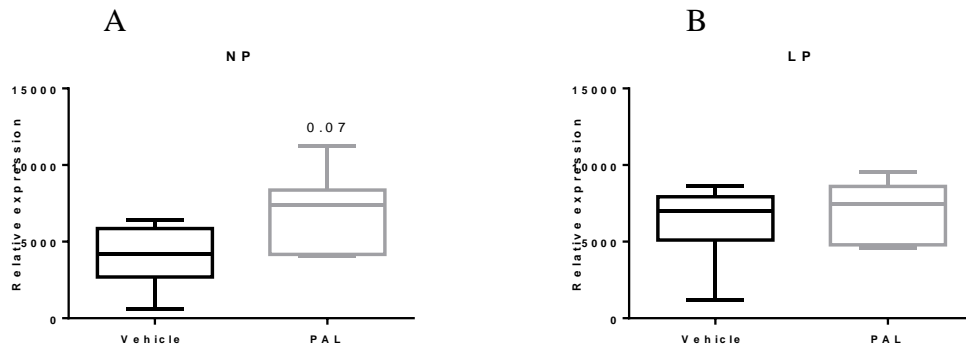


Figure 11: **Expression de l'ARNm relative à l'actine de l'Apoa4 impliquée dans la synthèse des chylomicrons** qui facilitent le transport des lipides de l'intestin mesurée par RT-qPCR dans le duodénum des rats NP et LP 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitoléate (**PAL**). N = 10. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque *P <0.05 et **P <0.01 alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

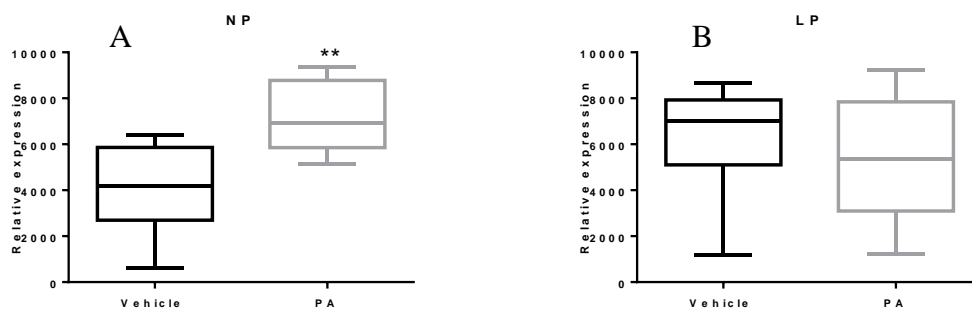


Figure 12: **Expression de l'ARNm relative à l'actine de l'Apoa4 impliquée dans la synthèse des chylomicrons** qui facilitent le transport des lipides de l'intestin mesurée par RT-qPCR dans le duodénum des rats NP et LP 90 minutes après gavage d'une solution vehicle ou palmitoléate (**PA**). N = 10. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. Lorsque *P <0.05 et **P <0.01 alors les résultats sont considérés comme significativement différents de la condition vehicle pour chaque groupe NP et LP.

RESULTATS 3^{ème} PARTIE : PROGRAMMATION DU NERF VAGUE

ARTICLE 3:

Loss of Vagal sensitivity to cholecystokinin in rats born with intrauterine growth retardation and consequence on Food intake (Frontiers in endocrinology 8, 65. doi: 10.3389/fendo.2017.00065.).



Loss of Vagal Sensitivity to Cholecystokinin in Rats Born with Intrauterine Growth Retardation and Consequence on Food Intake

Marième Ndjim, Camille Poinignon, Patricia Parnet and Gwenola Le Dréan*

UMR 1280 PHAN, INRA, Université de Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD), Centre de Recherche en Nutrition Humaine Ouest (CRNH Ouest), Nantes, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Hubert Vaudry,
University of Rouen, France

Reviewed by:

Miriam Goebel-Stengel,
HELIOS Klinikum Zerbst, Germany
Qingchun Tong,
University of Texas Health Science
Center at Houston, USA

*Correspondence:

Gwenola Le Dréan
gwenola.ledrean@univ-nantes.fr

Specialty section:

This article was submitted
to Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 10 January 2017

Accepted: 23 March 2017

Published: 10 April 2017

Citation:

Ndjim M, Poinignon C, Parnet P and
Le Dréan G (2017) Loss of Vagal
Sensitivity to Cholecystokinin in Rats
Born with Intrauterine Growth
Retardation and Consequence
on Food Intake.
Front. Endocrinol. 8:65.
doi: 10.3389/fendo.2017.00065

Perinatal malnutrition is associated with low birth weight and an increased risk of developing metabolic syndrome in adulthood. Modification of food intake (FI) regulation was observed in adult rats born with intrauterine growth retardation induced by maternal dietary protein restriction during gestation and maintained restricted until weaning. Gastrointestinal peptides and particularly cholecystokinin (CCK) play a major role in short-term regulation of FI by relaying digestive signals to the hindbrain *via* the vagal afferent nerve (VAN). We hypothesized that vagal sensitivity to CCK could be affected in rats suffering from undernutrition [low protein (LP)] during fetal and postnatal life, leading to an altered gut–brain communication and impacting satiation. Our aim was to study short-term FI along with signals of appetite and satiation in adult LP rats compared to control rats. The dose–response to CCK injection was investigated on FI as well as the associated signaling pathways activated in nodose ganglia. We showed that LP rats have a reduced first-meal satiety ratio after a fasting period associated to a higher postprandial plasmatic CCK release, a reduced sensitivity to CCK when injected at low concentration and a reduced presence of CCK-1 receptor in nodose ganglia. Accordingly, the lower basal and CCK-induced phosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase in nodose ganglia of LP rats could reflect an under-expressed vanilloid family of transient receptor potential cation channels on VAN. Altogether, the present data demonstrated a reduced vagal sensitivity to CCK in LP rats at adulthood, which could contribute to deregulation of FI reported in this model.

Keywords: perinatal malnutrition, gastrointestinal peptide, nodose ganglia, satiation, CCK signaling

INTRODUCTION

Metabolic pathologies such as obesity and type 2 diabetes are a worldwide public health problem especially in Western countries. Although life style, decreased physical activity and nutritional transition are the main causes of predisposition to obesity, a large body of epidemiological studies linked a low birth weight, consequence of intrauterine growth retardation (IUGR), to a higher

Abbreviations: BW, bodyweight; CART, cocaine amphetamine-regulated peptide; CaMKII, calcium/calmodulin-dependent protein kinase; CCK, cholecystokinin; CCK-1R, CCK-1 receptor; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FI, food intake; GIP, glucose-dependent insulinotropic peptide; I.P., intraperitoneal; IUGR, intrauterine growth retardation; LP, low protein; MCH, melanin-concentrating hormone; NPY, neuropeptide Y; NTS, nucleus of the solitary tract; PYY, peptide YY; TRPV, vanilloid family of transient receptor potential; VAN, vagal afferent nerve; Y2-R, Y2 receptor.

risk of metabolic pathologies at adulthood. It is indeed well documented that low birth-weight babies present a higher susceptibility to develop obesity, insulin resistance, cardiovascular diseases, and type 2 diabetes later in life (1–3). More generally the metabolic programming concept proposes that a deleterious nutritional environment inflicted during fetal and early postnatal life could impact long-term health (4).

Animal studies have demonstrated that perinatal undernutrition may lead to a programmed hyperphagia that in the long term led to adult obesity (5). Previous studies in our laboratory demonstrated that low-protein (LP) rats eat more of a regular chow diet from weaning to 2-month old (6, 7). At adulthood despite a higher speed of ingestion (6, 8), a delay in appearance of satiety (satiation) is still observed with more food consumed during the first meal (7). LP rats have also a greater appetite for high-energy diet at adulthood (8) and a preference for high-fat food in the offspring of undernourished dams has also been reported (9), which could contribute to an increase of the body weight during adulthood and later on to obesity.

Food intake (FI) is a highly integrated behavior that relies on complex interactions between neuronal populations located in hypothalamic nuclei, brainstem, and cerebral nuclei implicated in hedonism, motivation, and activation of the peripheral autonomous system. In the central nervous system, the arcuate nucleus contains two well-characterized neuronal populations that act with opposite effects on feeding. Anorexigenic proopiomelanocortin neurons synthesize α -melanocyte-stimulating hormone and cocaine and amphetamine-regulated peptide (CART) whereas orexigenic neurons express neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (10).

Animal studies have shown that altered maternal nutrition disturbs this hypothalamic system in offspring in favor of orexigenic activity predisposing to hyperphagia (6, 11). Long-term mechanisms of FI regulation by peripheral signaling (leptin, insulin) that monitor energy stores and availability to maintain homeostasis are particularly sensitive to perinatal nutrition. In LP rats, impaired leptin and insulin signaling in arcuate nucleus has been demonstrated to contribute to hyperphagia (12). By contrast, the short-term mechanisms of FI, which regulate on one hand anticipated appetite through ghrelin action and on the other hand meal size and the inter-meal time through peptides from the digestive tract have been poorly studied in maternal food-deprived offspring.

Short-term regulation of FI is controlled by the integration of digestive signals by the vagus nerve into the nucleus of the solitary tract (NTS) in the hindbrain that initiates satiation by a vago-vagal reflex (13). Among these signals, gastrointestinal peptides and mainly cholecystokinin (CCK) are key regulator of short-term FI (14). Vagal afferent nerves (VANs) are primary target of CCK and it is now well demonstrated that they represent a major site for integration of peripheral signals controlling FI (15). Indeed, CCK-1 receptors (CCK-1R) are expressed in nodose ganglia and CCK release after a meal stimulates expression of Y2 receptor (Y2-R), which responds to the anorexigenic gut peptide YY (PYY) and the release of CART in VAN while expression of the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone (MCH) is suppressed. By contrast, during fasting, when plasma CCK concentration is low, MCH receptor expression increases while Y2-R and CART expression is reduced (16). As a gatekeeper, CCK

operates this vagal neurochemical phenotype switch according to the energy state (14). Interestingly, this normal switching between feeding and fasting states is blunted in diet-induced obesity rats as demonstrated by a loss of vagal sensitivity to leptin (17), which is known to act synergistically with CCK on VAN to potentiate the satiety effect of CCK (18).

Cholecystokinin suppression of FI involves numerous signaling pathways. In NTS neurons, CCK activity involves extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling cascade (19–21). In nodose neurons, CCK induces an increase in intracellular calcium mediated by members of the vanilloid family of transient receptor potential (TRPV)2–5 cation channels (22). Transient calcium signal is converted by calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII), which autophosphorylates and functions as an intracellular signaling element. Prolonged phosphorylation of CaMKII reflects cellular activation (23).

We hypothesized that in LP rats, alteration of short-term FI and particularly satiation could be due to a loss of vagal sensitivity to CCK and/or an alteration of the vagal phenotype leading to a compromised integration of short-term satiety signals. Therefore, the aim of the present study was to investigate the reactivity to CCK in the adult offspring of dams fed a control or a LP diet during lactation and gestation. First-meal pattern following fasting was studied in physiological cages and plasma concentrations of various gastrointestinal peptides were measured in pre- and postprandial period. A dose–response to intraperitoneal (i.p.) CCK agonist (CCK-8S) injection was performed to quantify CCK sensitivity by measuring FI. Neurochemical vagal phenotype was determined in fasting/feeding states and vagal activation following CCK injection was analyzed by measuring phosphorylation of CaMKII and ERK in nodose ganglia.

ANIMALS AND METHODS

Animals

Pregnant females (gestation day 1) were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France), housed individually under standard laboratory conditions with free access to either a control (20% w/w protein, $n = 8$) or an isocaloric LP diet (8% protein, $n = 8$) through gestation and lactation. Both diets were purchased from AB diets (Woerden, The Netherlands) and composition is provided in Table S1 in Supplementary Material. At delivery, litter size was adjusted to eight male pups per dam. Pups were pooled and randomly attributed to foster mothers to create two experimental groups. Pups born from control dams were adopted by foster control ones (control, $n = 24$) and pups born from LP dams were attributed to foster LP dams (LP, $n = 24$). Control and LP offspring were weaned at 21 days of age and received a standard laboratory chow (A04, Safe, Augy, France) until adulthood. As previously described in this model (6, 24), birth weight of LP rats was 7–9% lower than control birth weight and this difference persisted until adulthood (130–160 days).

First-Meal Pattern Analysis

At 160 days of age, rats (8–12 animals/group) were individually housed ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12:12-h light/dark cycle, lights on at 7:30)

for 3 days in plexiglas Phecomb cages (Bioseb, Vitrol, France) equipped to monitor meal pattern by continuous and automatic weighing of food. Phecomb system weights the food tray for each second. It allows precisely quantifying the food consumption and identifying feeding events. Artifacts as large vibrations when the rat enters in contact with the tray but without eating are taken into account by filters on the hardware and the software (Phecomb system monitoring software Compulse). A percentage of reliability of the quality signal was calculated by the software and only experiments with a percentage >80% have been used. A meal was defined with a minimal size of 0.5 g and a minimum inter-meal interval of 20 min. A meal is composed of several bouts. Meal parameters extracted from Compulse software included latency to eat, meal size, duration of the meal, inter-meal interval, and satiety ratio. After 48 h of fasting and 24 h of acclimatization to the cage, data were recorded from the beginning of the second day (8:00 a.m.) each 5 s over a 24-h period. This prolonged caloric restriction of 48 h was chosen on the basis of previous reports showing that 24–48 h duration of fasting triggers VAN to switch from anorectic to orexigenic phenotype (16, 25, 26). Other previous studies used this duration of fasting to promote feeding in adult rats weighting more than 500 g (6, 7).

Fasting–Feeding Experiment

Control ($n = 16$) and LP rats ($n = 16$) were fasted for 48 h (water *ad libitum*) and then divided into two subgroups: one group not refed and the second group refed during 2 h. Rats were killed by CO₂ inhalation and cervical dislocation. Stomach, duodenum, ileum, and nodose ganglia were rapidly dissected and collected for further analysis. Portal blood sample was collected in EDTA-containing tubes (Coveto, Montaigu, France). To preserve active form of gastrointestinal peptides, portal blood (200 μ L) was collected in less than 30 s and directly flushed within EDTA tubes containing a mix of protease inhibitors including dipeptidyl peptidase IV inhibitor (diprotin A 100 μ M, Sigma, Saint Louis, MO, USA), serine protease inhibitors (aprotinin, approx. 400 TIU/L, Sigma), and protease cocktail inhibitors (diluted 1/100, Sigma). After centrifugation, plasma (50 μ L) was then aliquoted in microtube containing the same mix of protease inhibitors and immediately frozen at -80°C .

Plasma Gastrointestinal Peptides

Plasma concentration of rat non-sulfated CCK-8 (CCK-8NS) and desacylated ghrelin was analyzed by ELISA (EIA kit, Phoenix France, Strasbourg and SpiBio, Montigny le Bretonneux, France, respectively). Plasma total glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and total PYY were assayed by Milliplex mag (Rat metabolic magnetic bead panel kit, Millipore, MA, USA).

Kinetics of CCK Release

Rats ($n = 9$ –12 animals/group) were fasted for 15 h and refed (chow) at the beginning of the dark phase. This duration of fasting was chosen to induce hunger in adult rats while limiting leptin deficiency that attenuated response to meal-related satiety signals (27). Their FI was measured by food tray weighing at 60, 90, and 150 min post-refeeding. Concomitantly, blood was collected from

the tail vein in EDTA-containing tubes (Microvette CB300 EDTA 3K, Sarstedt, Marnay, France) at 0 (15 min before refeeding), 15, 30, 60, 90, and 150 min after the beginning of the meal.

Sensitivity to CCK

Rats were deprived of food during 15 h and were intraperitoneally injected with either sterile NaCl 0.9% (saline) or CCK octapeptide, sulfated (CCK-8S, Bachem, Germany) just before light off and refeeding. FI and spillage were weighed every 30 min during 90 min. The satiating effect of CCK-8S was tested on distinct animals, for three doses [0.25, 2.5, and 7.5 nmol/kg of bodyweight (BW)] vs vehicle (saline) on consecutive days. It means that each rat received one of the treatment on a given test day followed by a period of 3–5 days of wash out and resting between each injection. Therefore, the whole experiment extended over 3 weeks. Doses of CCK were chosen on the basis of previous published data. The low dose (0.25 nmol/kg BW) reduces 1-h FI by 25% in standard fed rats (28). The 10-fold higher dose (2.5 nmol/kg BW) is necessary to induce FI reduction in diet-induced obesity rats (29) and the higher dose (7.5 nmol/kg BW) is used to induce anorectic effect in MC4R^{-/-} obese rats (30).

CCK-Vagal Activation

Rats were fasted for 15 h and then received an intraperitoneal (i.p.) injection with either CCK-8S (0.25 nmol/kg BW) or saline 5 min before refeeding and light off. Twenty minutes after injections, rats were killed by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation and nodose ganglia were rapidly collected for Western blot analysis.

Western Blot Analysis

Nodose ganglia were homogenized at 4°C in RIPA lysis and extraction buffer as previously described (31). Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Fifteen micrograms of protein was solubilized in electrophoresis sample buffer, loaded in ready-to-use (4–15%) polyacrylamide gels (Mini-protean TGX, Bio-Rad) and transferred onto Trans-Blot Turbo membrane (Bio-Rad). Protein was probed with anti-pCaMKII mouse polyclonal antibody (diluted 1/2,000, pT286, Thermo Scientific) and anti-CaMKII rabbit monoclonal antibody (diluted 1/1,000, Abcam, France). Following de-hybridization, membrane was probed with rabbit polyclonal anti-pERK and total ERK antibodies (diluted 1/1,000, Abcam). Immunoreactive bands were visualized with DyLightTM680- and 800-conjugated antibodies, respectively (KPL, Eurobio, France). Band intensities were quantified by infrared scanning densitometry (Odyssey Imaging Systems, LI-COR, Germany). Data are expressed as the ratio of phosphorylated protein relative to total protein. Protein load was controlled with anti-actin mouse monoclonal antibody (diluted 1/2,000, Sigma).

Immunohistochemistry

Cryostat sections (7 μ m) of fixed nodose ganglia in 4% paraformaldehyde were mounted on SuperFrost Plus Gold slides (Thermo Scientific; Braunschweig, Germany). Sections were stained with a rabbit polyclonal antibody raised against CCK-1R diluted at 1/200 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). The secondary antibody

used at appropriate dilution (1/1,000) was a goat biotinylated anti-rabbit polyclonal antibody (Vector Laboratories, Clinisciences, Nanterre, France) followed by Alexa Fluor® 488-conjugated streptavidin antibody (Molecular Probes, Life Technologies). Nuclei were counterstained with DAPI. Tissues sections were mounted in Prolong Gold antifading medium (Molecular Probes, Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Three to five sections of nodose ganglia per rat were analyzed by fluorescence microscopy (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss, France). Fluorescence was quantified on image mosaic representing the total surface of each longitudinal nodose ganglia section using Volocity software (Volocity 6.2.1, Perkin Elmer, France).

Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies) and treated for 45 min at 37°C with RQ1 DNase (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France). One microgram RNA was reverse-transcribed using Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Five microliters of a 1/20 (nodose ganglia) or 1/40 (intestinal tissue) dilution of cDNA solution were subjected to RT-qPCR in a Bio-Rad iCycler iQ system using the qPCR SYBR Green MasterMix (Fermentas, Courtaboeuf, France). Quantitative PCR consisted of 45 cycles, 30 s at 95°C and 30 s at 60°C each. Primers sequences are figured in Table S2 in Supplementary Material.

Statistical Analysis

All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) software. Comparisons between control and LP groups were performed with an unpaired, two-tailed, Mann-Whitney test. When measures were repeated (dose-response), Friedman test was applied following Wilcoxon signed rank test. A P value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

First-Meal Pattern and Plasma Gastrointestinal Peptides

Following 48-h fasting, first-meal size (grams per kilogram BW) was significantly higher in LP rats and the inter-meal interval

preceding the second meal tended to be reduced, leading to a significant 30%-lower satiety ratio in LP rats as compared to the control group (Figure 1). Since these short-term parameters of FI are primarily regulated by gastrointestinal peptides, gene expression (Figure S1 in Supplementary Material) and plasma concentration of ghrelin (stomach), CCK, GIP (duodenum), and PYY (ileum) were performed in fasted and 2 h-refed control and LP rats (Figure 2). As expected, plasma desacylghrelin was significantly decreased 2 h post-feeding but there were no differences between control and LP rats. Basal plasma concentration of CCK-8NS was similar in the both groups suggesting no IUGR effect on CCK production by I-cells. By contrast, postprandial CCK in LP rats was significantly higher than basal concentration 2 h post-feeding whereas in control rats CCK concentration reached back the initial basal level. This result supports the hypothesis of an alteration in the postprandial feedback regulation of CCK secretion and could be related to failure in short-term mechanisms of FI observed in LP rats (enhanced meal size and reduced satiety ratio). Plasma concentration of GIP and PYY (secreted further distally in the gastrointestinal tract than CCK and GIP) were significantly higher 2 h post-feeding as compared to fasting but with no difference between control and LP groups. Neither basal nor postprandial gene expression of these gastrointestinal peptides was affected by perinatal LP diet (Figure S1 in Supplementary Material).

Since plasma CCK concentration remained higher than basal concentration 2 h post-feeding in LP rats, we sought for an alteration in the kinetic of production of CCK over the feeding period. Plasma concentration of CCK was measured from 15 min before and until 150 min after feeding. As shown in Figure 3A, CCK release in response to feeding was similar in both groups but from 1 h to 2 h 30 min after FI plasma concentration of CCK was significantly higher in LP rats as compared to control rats. While in control group CCK concentration reached basal value as soon as 60 min post-feeding, values in LP rats were still higher than basal concentration at 150 min post-feeding. The total release of plasma CCK evaluated by the area under curve over the completed period (0–150 min) was significantly higher in LP rats as compared to control rats (Figure 3A). These results clearly showed an alteration in the regulation of postprandial CCK release in LP rats.

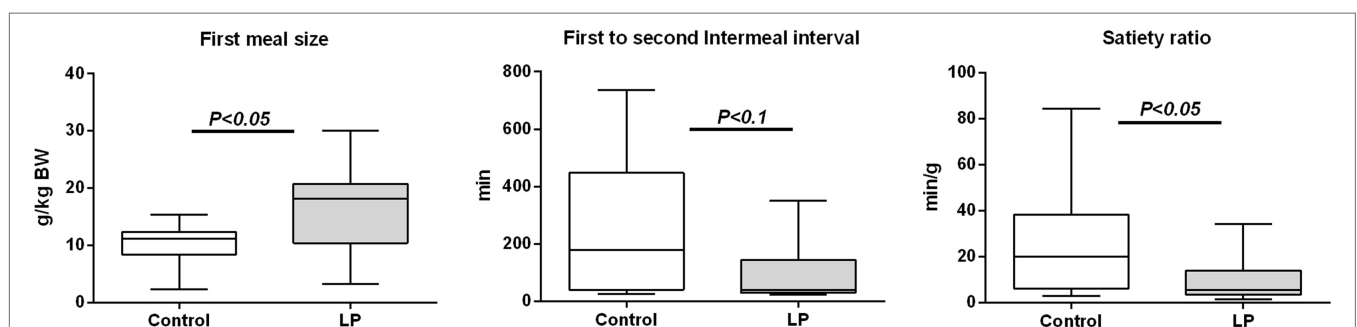
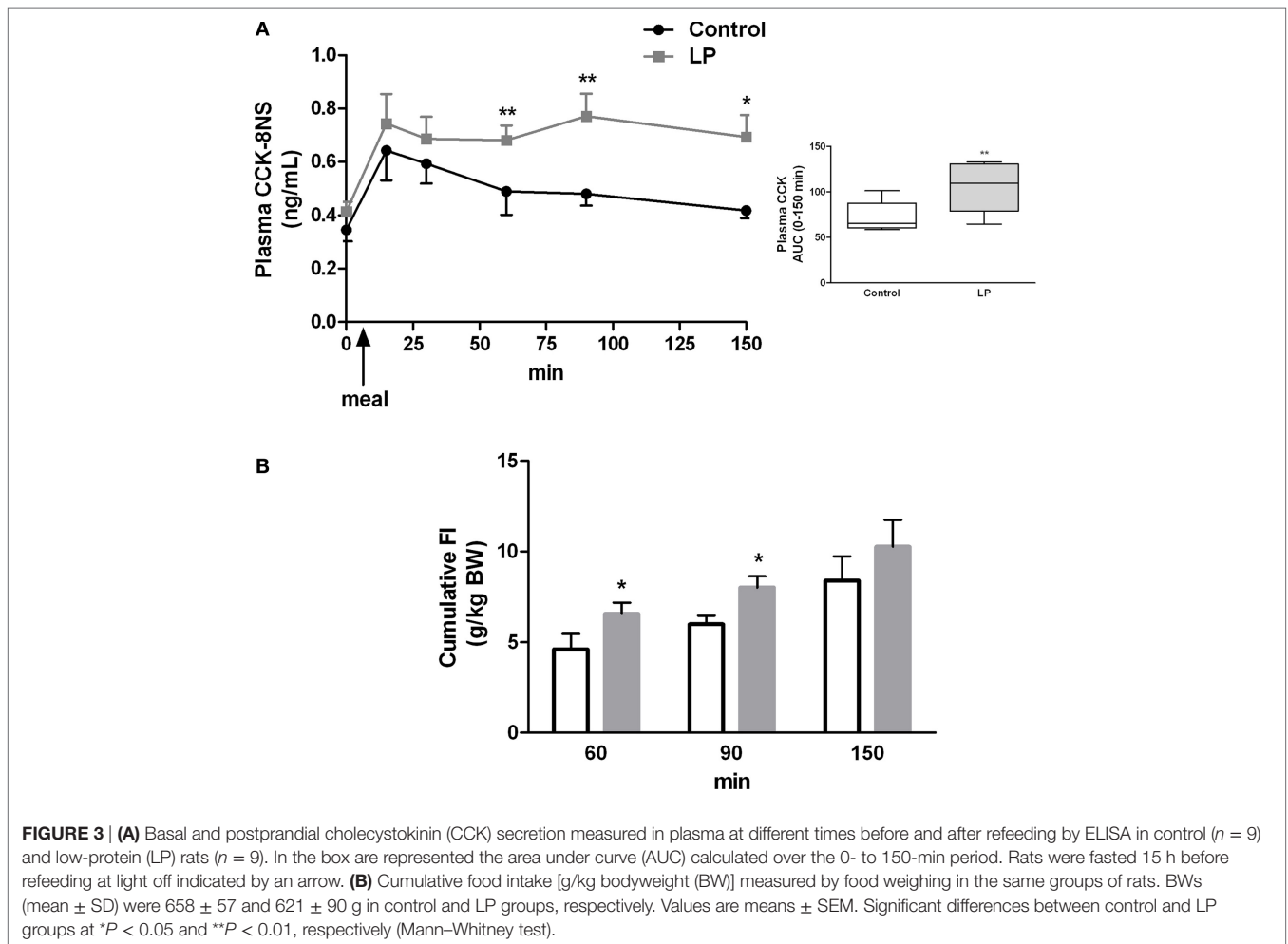
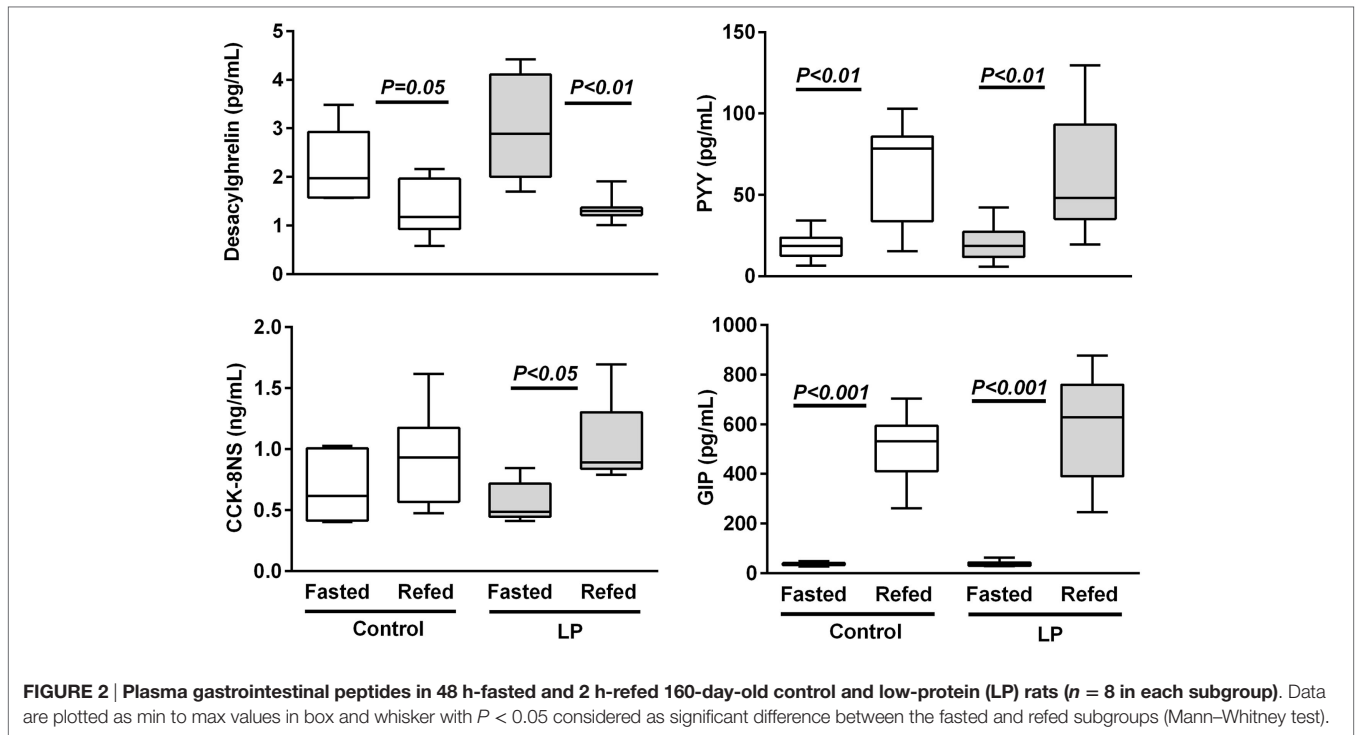


FIGURE 1 | First-meal pattern measured in physiological cages after 48-h fasting in 160-day-old control [$n = 12$; 631 ± 67 g bodyweight (BW), open bars] and low-protein (LP) ($n = 10$; 551 ± 31 g BW, gray bars) rats (BW are means \pm SD). Animals were refed *ad libitum* at 8:00 a.m. and meal pattern was recorded during 24 h. Data are plotted as min to max values in box and whisker with $P < 0.05$ considered as significant difference between the two groups (Mann-Whitney test).



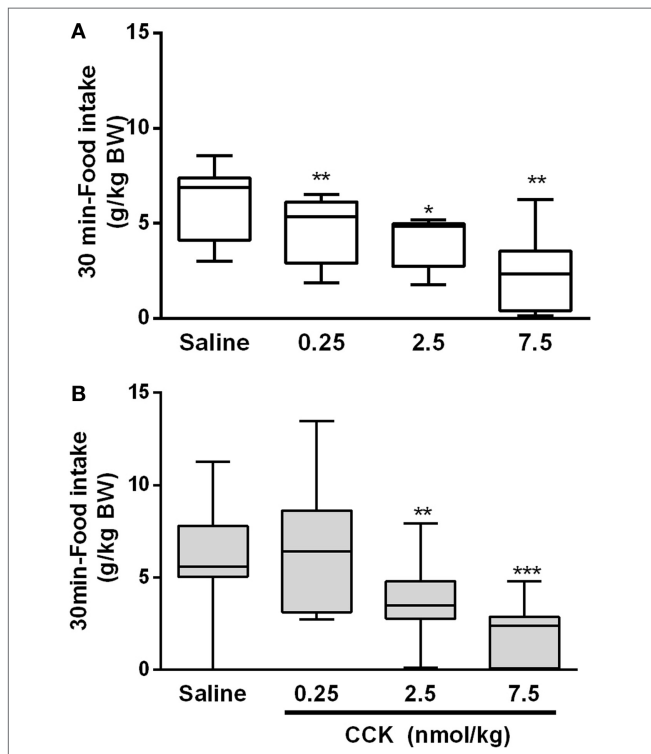


FIGURE 4 | Food intake during the first 30 min following i.p. injection of CCK and refeeding in control (A) and low-protein (LP) (B) groups. Bodyweights (mean ± SD) were 655 ± 58 and 590 ± 81 g in control and LP groups, respectively. Each rat received all treatments at different days (repeated measures) with a minimum of 3-day wash out (recovery) between two treatments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 indicated significant differences vs saline group (Friedman and Wilcoxon signed rank tests).

Concomitant to higher CCK concentration at 60 and 90 min post-feeding in the LP group, cumulative FI measured for the same period was significantly higher in LP rats than control rats (Figure 3B). This result demonstrated that higher amount of plasma CCK was inefficient to reduce FI in LP rats.

Sensitivity to CCK-Induced Satiety

Since CCK is a major intestinal peptide of satiety, we examined its satietogenic effect by measuring FI after an i.p. administration of CCK-8S. As expected, in the control group, CCK induced a dose-dependent decrease of food ingestion in accordance with the normal sensitivity to satietogenic effect of CCK (Figure 4A). The minimal dose of CCK [0.25 nmol/kg; (28)] induced a 25% FI reduction (*P* < 0.01) on the first 30 min as compared to saline in the control group. In LP rats, this minimal dose had no effect on FI. A 10-fold higher dose (2.5 nmol/kg) was necessary to induce a significant reduction of FI in LP rats (*P* < 0.01). This suggested a resistance to the satiety effect of CCK (Figure 4B). At 60 and 90 min post-CCK injection and refeeding, FI was no more significantly different from saline in the both group except for the higher dose of CCK at 60 min (*P* < 0.05) (data not shown).

Vagal Neurochemical Phenotype and CCK-1R Signaling

Since short-term regulation of FI by CCK acts primarily *via* vagal nerve, the expression of CCK-1R was measured in nodose ganglia. The basal expression of vagal CCK-1R measured by immunofluorescence (*P* < 0.01) was lower in LP rats as compared to control rats and could contribute to the loss of sensitivity to CCK-induced satiety in LP rats (Figures 5A,B). No effect of

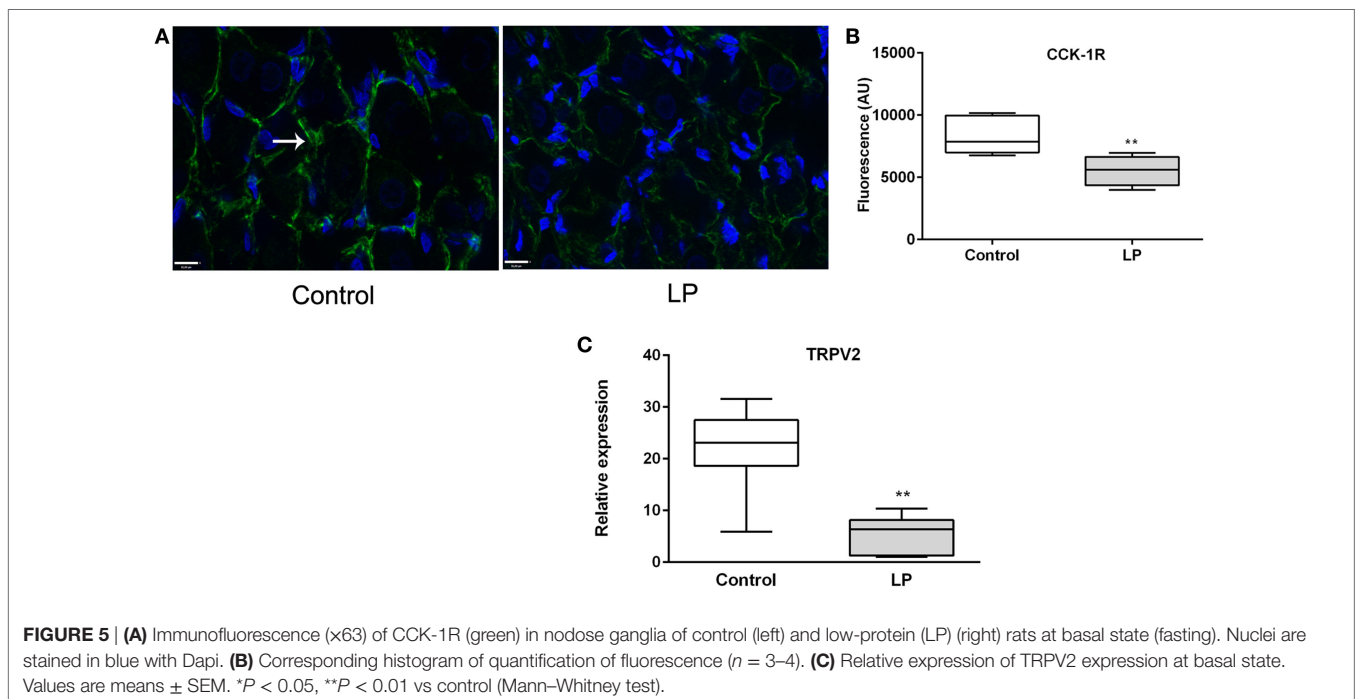


FIGURE 5 | (A) Immunofluorescence (×63) of CCK-1R (green) in nodose ganglia of control (left) and low-protein (LP) (right) rats at basal state (fasting). Nuclei are stained in blue with Dapi. **(B)** Corresponding histogram of quantification of fluorescence (*n* = 3–4). **(C)** Relative expression of TRPV2 expression at basal state. Values are means ± SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs control (Mann-Whitney test).

refeeding on vagal CCK-1R expression was observed (data not shown) in the present experiment as previously reported (32). The neurochemical switch operated by CCK on VAN determines an anorexigenic vs orexigenic phenotype that mediates an appropriate response at the brain stem and hypothalamic levels to regulate FI (14, 15). Anorexigenic peptides (CART) and receptors (Y2-R) as well as orexigenic NPY were analyzed in nodose ganglia in response to refeeding in both groups. Unexpectedly, no significant difference was observed in expression of these genes between fasting and refed states, either in control or LP rats (Figure S2 in Supplementary Material).

Since CCK effects on VAN are mediated by TRPV2–5 cation channels (22), we determined gene expression of TRPV2 and found it significantly under expressed in LP nodose ganglia as compared to control (Figure 5C). Detection of phosphorylated CaMKII has been previously used as a marker of cellular activation in the nodose ganglia (23). Under basal conditions, the ratio pCaMKII/CaMKII was significantly lower in LP nodose ganglia as compared to control (0.4038 ± 0.06 vs 2.888 ± 0.47 , respectively, means \pm SEM, $P < 0.05$, Mann-Whitney test). Unexpectedly CCK-dependent pCaMKII/CaMKII ratio was reduced 20 min after injection in control rats, with no effect in LP rats (Figure 6).

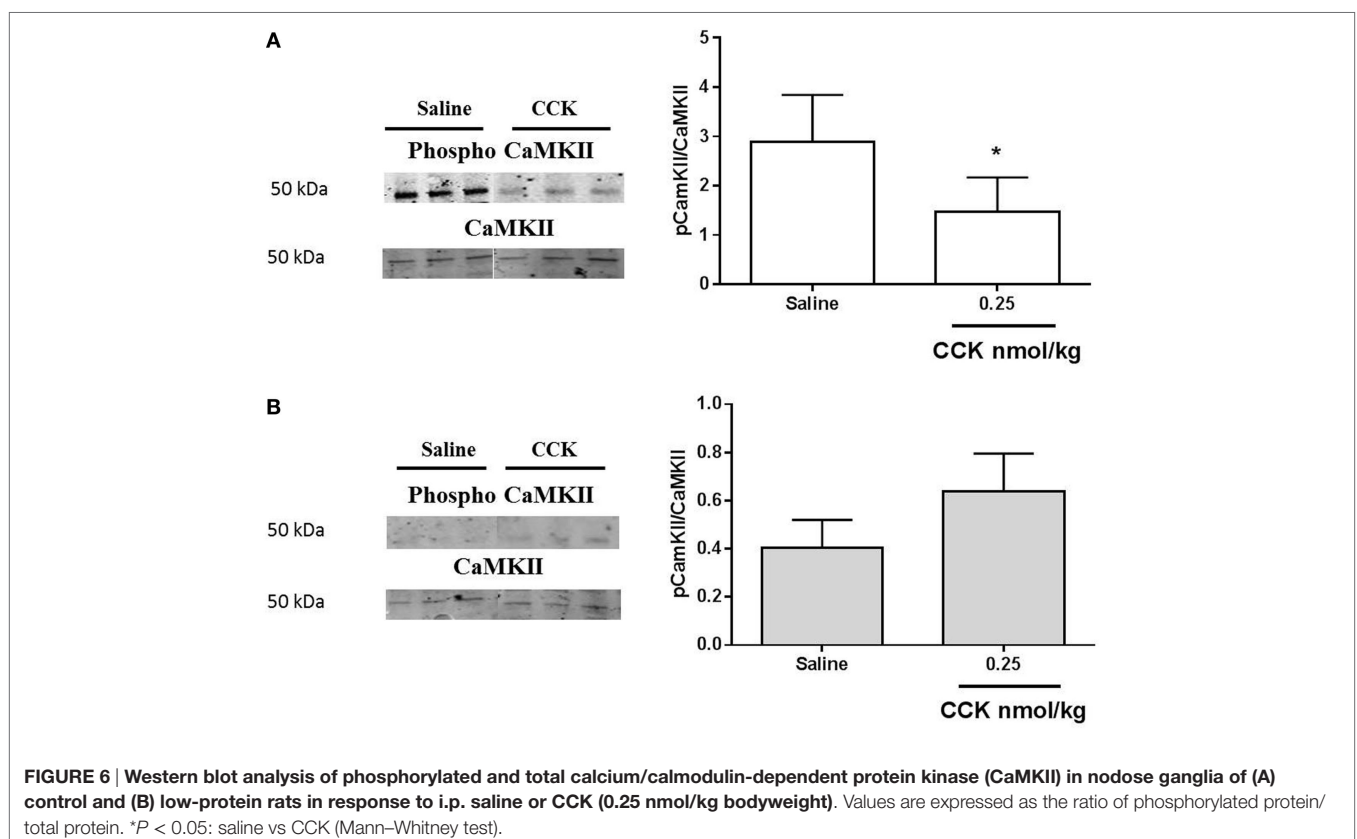
Cholecystokinin activity on CREB phosphorylation in VAN (26) and phosphorylation of ERK in NTS is linked to the satiation effect of the peptide (21, 33). However, 20 min after exogenous administration of CCK, no activation of the ERK pathway was detected in nodose ganglia of control or LP rats (Figure 7).

DISCUSSION

Although some experimental studies testify alteration of FI and meal pattern in LP rats at adulthood, to the best of our knowledge the present data provide the first evidence that the sensitivity to CCK-induced satiation is impaired by perinatal undernutrition. The resistance to the satiation effect of CCK could be related to a lower expression of CCK-1R and TRPV2 in nodose ganglia in LP rats accredited by a lower basal and phosphorylated level of CaMKII as compared to control rats. The higher postprandial CCK release that we observed in LP rats possibly represents an adaptive mechanism that is partially inefficient at reducing the first meal after a fasting period.

Short-term FI and Postprandial CCK Are Altered in LP Rats

Alteration of short-term FI has been previously reported in perinatally malnourished rats. Protein restricted diet provided to dams during gestation and/or lactation modify the early appetite of their pups. They demonstrate a hyperphagic phase especially after weaning (7, 34) and during their catch-up growth (6, 7). At adulthood, FI seems grossly normal but a delay in satiation (7) and an increase of the first-meal size following 48-h fasting are still observed suggesting a persistent alteration of short-term regulation of FI. Such an alteration could predispose to obesity particularly when the animals are challenged with a high-calories diet (8). Interestingly, a very recent study showed that LP rats are hyperphagic at older age



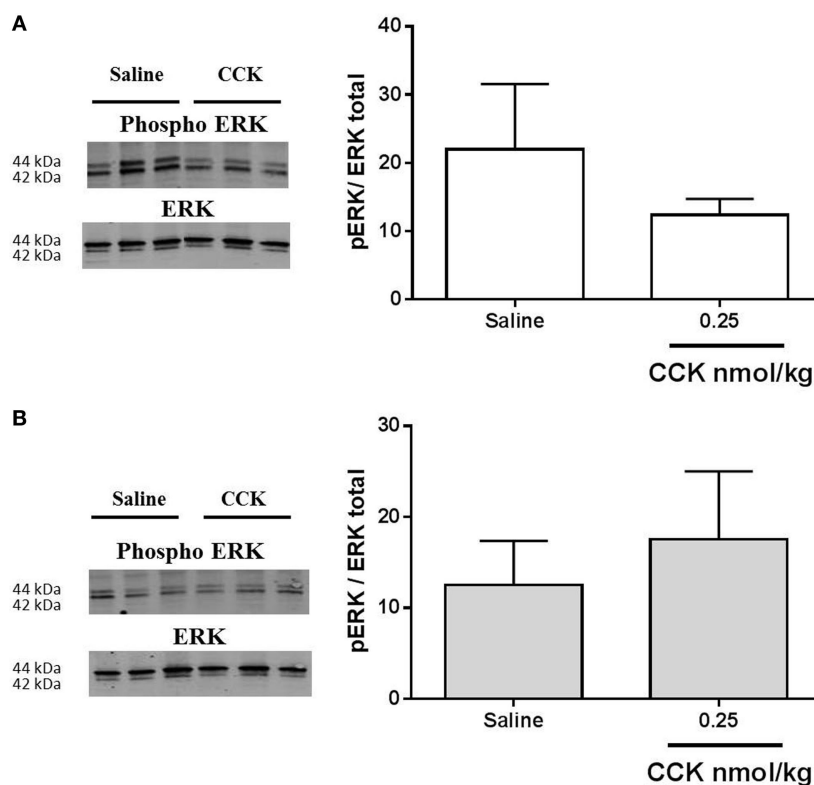


FIGURE 7 | Western blot analysis of phosphorylated and total ERK1/2 in nodose ganglia of (A) control and (B) low-protein rats ($n = 4-5$) in response to i.p. saline or CCK (0.25 nmol/kg bodyweight). Values are expressed as the ratio of phosphorylated protein/total protein. * $P < 0.05$: saline vs CCK (Mann-Whitney test).

(1-year old) than younger adult ages usually studied, reinforcing the importance of long lasting impact of programming hyperphagia by perinatal nutrition (35). In the present study using physiological cages that give precise information of meal pattern, we confirmed that adult (160-day old) LP rats present an altered regulation of the first-meal pattern after a long period of fast.

Short-term FI is regulated by a vago-vagal reflex initiated by arrival of food in the stomach and the upper intestine that are sensitive to both distension and nutrients. It ensues digestive secretion and release of appetite-regulating gut peptides (CCK, serotonin, GIP, PYY, glucagon like peptide-1, etc.), all known, at the exception of ghrelin, to reduce meal and delay the next meal (36). We first hypothesized that gene expression as well as the basal and postprandial release of those peptides may be altered in LP rats. A previous study reported elevated plasma ghrelin and reduced CCK and PYY in adult IUGR rats obtained by a 50%-caloric restriction of their dams diet during gestation and maintained restricted during lactation (37). These changes were paralleled to mRNA levels in gastric and intestinal tissues. In this drastic model, as previously shown by others (38), rats are hyperphagic during the whole period of the experiment (from weaning to 7- to 9-month olds). However, only fasting GI peptides concentrations were reported in that study. Therefore, no conclusions on their

dynamic change in relation to FI can be drawn. In the present work, offspring obtained by protein restriction of their dams during gestation and lactation showed no modification in gene expression of GI peptides, nor at basal or postprandial states. We then measured their plasma concentrations and found that only postprandial CCK was significantly higher than basal in 2-h-refed LP animals. This result seems in contrast with the increased first-meal size and the reduced satiety ratio we measured in LP rats but can be interpreted as if a higher CCK release was inefficient to correctly regulate FI. The kinetic of plasma CCK release post-refeeding was similar in both groups suggesting no delay in CCK secretion by I-cells. By contrast, the feedback regulation seen by the reduced FI 1 h post-refeeding in control rats seemed ineffective in LP rats. As previously mentioned, short-term regulation of FI is initiated by proximal gut mechano- and chemoreceptors, in association with GI peptides release. These initial signals are integrated by VAN to the hindbrain, which triggers a vago-vagal reflex to decrease FI by inhibiting gastric emptying, stimulating digestive secretion, etc. The release of GI peptides is supposed to be regulated by a classic downregulation of their receptors once stimuli (nutrients) have moved to distal parts of gut. Thus, the higher postprandial plasma CCK found in LP rats led us to propose the existence of a state of resistance to the satietogenic effect of CCK in these rats.

LP Rats Are Resistant to CCK-Induced Satiety

Exogenous administration of CCK-8S in LP rats at a dose previously shown to induce satiety in re-fed rats (28) was not efficient to reduce FI in contrast to control group where the consumption of food was 25% reduced. Since the satietogenic effect of CCK is mediated by CCK-1R on VAN, we hypothesized that perinatal malnutrition could affect CCK signaling *via* its receptor on the vagus nerve. We effectively found that CCK-1R immunoreactivity was significantly lower in nodose ganglia of LP rats compared to control rats probably contributing to the resistance to CCK. A reduced sensitivity to a satietogenic dose of CCK, leading to hyperphagia, has already been shown in obesity-prone rats receiving standard chow (39) as well as in high-fat diet fed rats (40). In diet-induced obese rats, neurochemical analysis of VAN supports a vagal resistance to CCK and leptin in this model in which hyperphagia occurred concomitantly with this resistance (29). In DIO mice, spontaneous activity of VAN innervating the jejunum is weaker as compared to control and the number of afferent neurons that respond to CCK is reduced (41). The impact of perinatal malnutrition on the activity/neurochemical phenotype of the vagus nerve is poorly documented. One study reported a reduced vagal firing rate in adult rats reared by mothers fed a LP diet leading to an impaired efferent vagal activity (42). Electrophysiological studies of nodose neurons of LP rats are in progress in our lab to better characterize the effect of perinatal malnutrition on the activity of the vagus nerve.

Dockray and collaborators have considered CCK as a gatekeeper of the vagal phenotype, switching from an orexigenic phenotype during fasting at low CCK concentration to an anorexigenic one when CCK is released at refeeding (16, 25, 43). Here, we did not observe any modifications of the vagal phenotype between fasting and re-fed states neither in control nor in LP rats. This discrepancy could be related to different duration of fasting between experiments, even if our conditions (48-h fasting) were close to that of the earlier studies (24–48 h). A very recent study in mice also failed to reproduce this metabolic switch of VAN from an anorectic to orexigenic phenotype (44). Using confocal microscopy to visualize all afferent visceral C-fibers of the vagus nerve, these authors showed that the neuropeptide CART was not regulated by metabolic challenge (fasting or high-fat diet). They also failed to detect any production of MCH, an orexigenic neuropeptide previously shown to be produced by CART neurons in fed state in response to fasting. In our study, we did not detect MCH (mRNA or protein) in nodose ganglia of control and LP rats, whatever they were in their fed or fasted state (data not shown). Thus, our data could not support the hypothesis of an alteration of the vagal phenotype switch by CCK in LP rats but led us to consider CCK signaling in nodose ganglia.

Following its receptor activation, in synergic interaction with leptin receptors, CCK induces a cascade of signal transduction pathways leading to neuronal firing (45). Among them, p-ERK1/2 in terminal endings of VAN in NTS is central to CCK-induced inhibition of FI (19, 21). In the present study, we did not measure any activation of ERK following CCK injection in nodose ganglia. Previous data showing CCK-induced phosphorylation of ERK in

NTS reported that the effect occurred very quickly, as soon as 6 min following injection (21). Here, we measured CCK signaling 20 min after stimulation, this may have contributed, in combination with the low dose used, to the absence of phosphorylation signal in nodose ganglia. An analysis on a shorter time needs to be further performed and CCK signaling measured at the afferent endings in the NTS may provide a better comprehension of the underlying mechanism. Concerning calcium signaling, we showed that LP lowered TRPV2 expression in nodose ganglia. This observation could be put in relation with the attenuated level of CaMKII and pCaMKII measured in this model as compared to normal birth-weight rats. Such a reduced expression of CaMKII has been previously reported in the frontal cortex in young adult LP rats (46). Similarly, in LP fetal brain, number of CaMKII immunopositive cells was decreased as compared to control (47). The major role of CaMKII in mediating glutamate signaling has been extensively studied in postsynaptic events implied in memorization and cognition, which are altered in IUGR infants and animal models (48). As proposed by Flores et al., underexpression of CaMKII in frontal cortex of LP rats could be related to altered synaptic plasticity and decreased learning performances in this model. In our study, the reduced expression of CaMKII in nodose ganglia may contribute, together with the reduced CCK-1R expression, to the hyposensitivity of afferent neurons to CCK. Actually, factors leading to this decreased basal expression related to perinatal LP environment are unknown. Epigenetic mechanism is now widely accepted as a memory of antenatal undernutrition exposure throughout life. Research of epigenetic marks on the promoter of the CaMKII gene would be of great interest to link early LP environment and CaMKII expression. More unexpectedly, exogenous CCK induced a decrease in phosphorylation of CaMKII in nodose ganglia of the control group of rats. It has been previously demonstrated in cultured nodose neurons that the CCK-induced increase in cytosolic calcium concentrations is dependent on extracellular calcium influx rather than mobilization on intracellular stores (49). In neurons of the dorsal root ganglia, such a decrease in CaMKII autophosphorylation has been reported *in vitro* by depleting extracellular calcium (50). The significance of this observation in the present study needs further investigation.

In conclusion, we showed for the first time in the present study that adult perinatally undernourished rats have a reduced first-meal satiety ratio associated to a higher postprandial plasmatic CCK release, a reduced sensitivity to CCK when injected at low concentration and a reduced presence of CCK-1R and TRPV2 in nodose ganglia. Altogether, the present data demonstrated a reduced vagal sensitivity to CCK in LP rats at adulthood, which could contribute to deregulation of FI reported in this model.

ETHICS STATEMENT

All experiments were conducted in accordance with the European Union regulations for the care and use of animals for experimental procedures (2010/63/EU). Protocols were approved by the local Committee on the Ethics in Animal Experiments of Pays de la Loire (France) and the French Ministry of Research (Projects

2011.4 and 0271.01). Animal facility is registered by the French Veterinary Department as A44276.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GLD designed the study, GLD and CP wrote the protocol, and MN wrote the first draft of the manuscript. MN and CP managed the literature searches and performed animal experiments and analyses. MN performed the statistical analyses. PP contributed for interpretation of data and revised the manuscript. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

Guillaume Poupeau and Blandine Castellano are greatly acknowledged for their contribution at managing animal experiment; Thomas Moyon for help in statistical analyses;

REFERENCES

- Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* (1989) 2:577–80. doi:10.1016/S0140-6736(89)90710-1
- Ravelli G-P, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* (1976) 295:349–53. doi:10.1056/NEJM197608122950701
- Syddall HE, Sayer AA, Simmonds SJ, Osmond C, Cox V, Dennison EM, et al. Birth weight, infant weight gain, and cause-specific mortality: the Hertfordshire Cohort Study. *Am J Epidemiol* (2005) 161:1074–80. doi:10.1093/aje/kwi137
- Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* (1999) 69:179–97.
- Desai M, Li T, Han G, Ross MG. Programmed hyperphagia secondary to increased hypothalamic SIRT1. *Brain Res* (2014) 1589:26–36. doi:10.1016/j.brainres.2014.09.031
- Coupe B, Grit I, Darmaun D, Parnet P. The timing of “catch-up growth” affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2009) 297:R813–24. doi:10.1152/ajpregu.00201.2009
- Orozco-Solis R, de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav* (2009) 96:481–92. doi:10.1016/j.physbeh.2008.11.016
- Martin Agnoux A, Alexandre-Gouabau MC, Le Drean G, Antignac JP, Parnet P. Relative contribution of foetal and post-natal nutritional periods on feeding regulation in adult rats. *Acta Physiol (Oxf)* (2014) 210:188–201. doi:10.1111/apha.12163
- Dalle Molle R, Laureano DP, Alves MB, Reis TM, Desai M, Ross MG, et al. Intrauterine growth restriction increases the preference for palatable foods and affects sensitivity to food rewards in male and female adult rats. *Brain Res* (2015) 1618:41–9. doi:10.1016/j.brainres.2015.05.019
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* (2005) 184:291–318. doi:10.1677/joe.1.05866
- Ross MG, Desai M. Developmental programming of appetite/satiety. *Ann Nutr Metab* (2014) 64(Suppl 1):36–44. doi:10.1159/000360508
- Coupe B, Grit I, Hulin P, Randuineau G, Parnet P. Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis. *PLoS One* (2012) 7:e30616. doi:10.1371/journal.pone.0030616
- Schwartz MW. Central nervous system regulation of food intake. *Obesity (Silver Spring)* (2006) 14(Suppl 1):1s–8s. doi:10.1038/oby.2006.275
- Dockray GJ. Gastrointestinal hormones and the dialogue between gut and brain. *J Physiol* (2014) 592:2927–41. doi:10.1113/jphysiol.2014.270850
- Dockray GJ. The versatility of the vagus. *Physiol Behav* (2009) 97:531–6. doi:10.1016/j.physbeh.2009.01.009

Anthony Pagniez and Isabelle Grit for their assistance to perform biochemical analyses. The authors are very grateful to the MicroPiCell-Biogenouest platform for its assistance in fluorescence microscopy.

FUNDING

This study was supported by a grant from Région Pays de La Loire (PARIMAD project) and LCL (Le Crédit Lyonnais) contribution to Santedige foundation. MN thesis was co-funded by Région Pays de La Loire and INRA, France.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00065/full#supplementary-material>.

- Burdyga G, de Lartigue G, Raybould HE, Morris R, Dimaline R, Varro A, et al. Cholecystokinin regulates expression of Y2 receptors in vagal afferent neurons serving the stomach. *J Neurosci* (2008) 28:11583–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.2493-08.2008
- de Lartigue G, Barbier de la Serre C, Espero E, Lee J, Raybould HE. Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2011) 301:E187–95. doi:10.1152/ajpendo.00056.2011
- Peters JH, Ritter RC, Simasko SM. Leptin and CCK modulate complementary background conductances to depolarize cultured nodose neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* (2006) 290:C427–32. doi:10.1152/ajpcell.00439.2005
- Babic T, Townsend RL, Patterson LM, Sutton GM, Zheng H, Berthoud HR. Phenotype of neurons in the nucleus of the solitary tract that express CCK-induced activation of the ERK signaling pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2009) 296:R845–54. doi:10.1152/ajpregu.90531.2008
- Campos CA, Wright JS, Czaja K, Ritter RC. CCK-induced reduction of food intake and hindbrain MAPK signaling are mediated by NMDA receptor activation. *Endocrinology* (2012) 153:2633–46. doi:10.1210/en.2012-1025
- Sutton GM, Patterson LM, Berthoud HR. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway in solitary nucleus mediates cholecystokinin-induced suppression of food intake in rats. *J Neurosci* (2004) 24:10240–7. doi:10.1523/JNEUROSCI.2764-04.2004
- Zhao H, Simasko SM. Role of transient receptor potential channels in cholecystokinin-induced activation of cultured vagal afferent neurons. *Endocrinology* (2010) 151:5237–46. doi:10.1210/en.2010-0504
- Vincent KM, Sharp JW, Raybould HE. Intestinal glucose-induced calcium-calmodulin kinase signaling in the gut-brain axis in awake rats. *Neurogastroenterol Motil* (2011) 23:e282–93. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01673.x
- Fanca-Berthon P, Michel C, Pagniez A, Rival M, Van Seuningen I, Darmaun D, et al. Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. *Pediatr Res* (2009) 66:47–52. doi:10.1203/PDR.0b013e31818a2047e
- Burdyga G, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. Feeding-dependent depression of melanin-concentrating hormone and melanin-concentrating hormone receptor-1 expression in vagal afferent neurons. *Neuroscience* (2006) 137:1405–15. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.10.057
- de Lartigue G, Dimaline R, Varro A, Dockray GJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin. *J Neurosci* (2007) 27:2876–82. doi:10.1523/JNEUROSCI.5508-06.2007
- McMinn JE, Sindelar DK, Havel PJ, Schwartz MW. Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin. *Endocrinology* (2000) 141:4442–8. doi:10.1210/en.141.12.4442
- Savastano DM, Covasa M. Adaptation to a high-fat diet leads to hyperphagia and diminished sensitivity to cholecystokinin in rats. *J Nutr* (2005) 135:1953–9.
- de Lartigue G, Barbier de la Serre C, Espero E, Lee J, Raybould HE. Leptin resistance in vagal afferent neurons inhibits cholecystokinin signaling and

- satiation in diet induced obese rats. *PLoS One* (2012) 7:e32967. doi:10.1371/journal.pone.0032967
30. Blevins JE, Morton GJ, Williams DL, Caldwell DW, Bastian LS, Wisse BE, et al. Forebrain melanocortin signaling enhances the hindbrain satiety response to CCK-8. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2009) 296:R476–84. doi:10.1152/ajpregu.90544.2008
 31. Buyse M, Ovesjo ML, Goiot H, Guilmeau S, Peranzi G, Moizo L, et al. Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *Eur J Neurosci* (2001) 14:64–72. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01628.x
 32. Broberger C, Holmberg K, Shi T-J, Dockray G, Hökfelt T. Expression and regulation of cholecystokinin and cholecystokinin receptors in rat nodose and dorsal root ganglia. *Brain Res* (2001) 903:128–40. doi:10.1016/S0006-8993(01)02468-4
 33. Berthoud HR, Sutton GM, Townsend RL, Patterson LM, Zheng H. Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol Behav* (2006) 89:517–24. doi:10.1016/j.physbeh.2006.08.018
 34. Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, de Castro R, Bolanos-Jimenez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci* (2008) 27:1400–8. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06105.x
 35. Qasem RJ, Li J, Tang HM, Pontiggia L, D'Mello AP. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation alters central leptin signalling, increases food intake, and decreases bone mass in 1 year old rat offspring. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2016) 43:494–502. doi:10.1111/1440-1681.12545
 36. Camilleri M. Peripheral mechanisms in appetite regulation. *Gastroenterology* (2015) 148:1219–33. doi:10.1053/j.gastro.2014.09.016
 37. Nagata E, Nakagawa Y, Yamaguchi R, Fujisawa Y, Sano S, Satake E, et al. Altered gene expressions of ghrelin, PYY, and CCK in the gastrointestinal tract of the hyperphagic intrauterine growth restriction rat offspring. *Horm Metab Res* (2011) 43(3):178–82. doi:10.1055/s-0030-1270528
 38. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2005) 288:R91–6. doi:10.1152/ajpregu.00340.2004
 39. Swartz TD, Duca FA, Covasa M. Differential feeding behavior and neuronal responses to CCK in obesity-prone and -resistant rats. *Brain Res* (2010) 1308:79–86. doi:10.1016/j.brainres.2009.10.045
 40. Swartz TD, Savastano DM, Covasa M. Reduced sensitivity to cholecystokinin in male rats fed a high-fat diet is reversible. *J Nutr* (2010) 140:1698–703. doi:10.3945/jn.110.124149
 41. Daly DM, Park SJ, Valinsky WC, Beyak MJ. Impaired intestinal afferent nerve satiety signalling and vagal afferent excitability in diet induced obesity in the mouse. *J Physiol* (2011) 589:2857–70. doi:10.1113/jphysiol.2010.204594
 42. de Oliveira JC, Scomparin DX, Andreazzi AE, Branco RC, Martins AG, Gravena C, et al. Metabolic imprinting by maternal protein malnourishment impairs vagal activity in adult rats. *J Neuroendocrinol* (2011) 23:148–57. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.02095.x
 43. Burdyga G, Lal S, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J Neurosci* (2004) 24:2708–15. doi:10.1523/JNEUROSCI.5404-03.2004
 44. Yuan X, Huang Y, Shah S, Wu H, Gautron L. Levels of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in vagal afferents in the mouse are unaltered in response to metabolic challenges. *eNeuro* (2016) 3. doi:10.1523/eneuro.0174-16.2016
 45. Owyang C, Heldsinger A. Vagal control of satiety and hormonal regulation of appetite. *J Neurogastroenterol Motil* (2011) 17:338–48. doi:10.5056/jnm.2011.17.4.338
 46. Flores O, Perez H, Valladares L, Morgan C, Gatica A, Burgos H, et al. Hidden prenatal malnutrition in the rat: role of beta(1)-adrenoceptors on synaptic plasticity in the frontal cortex. *J Neurochem* (2011) 119:314–23. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07429.x
 47. Liu F, Liu Y, Liu J, Ma LY. Antenatal taurine improves intrauterine growth-restricted fetal rat brain development which is associated with increasing the activity of PKA-CaMKII/c-fos signal pathway. *Neuropediatrics* (2015) 46:299–306. doi:10.1055/s-0035-1558434
 48. Miller SL, Huppi PS, Mallard C. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *J Physiol* (2016) 594:807–23. doi:10.1113/JP271402
 49. Simasko SM, Wiens J, Karpel A, Covasa M, Ritter RC. Cholecystokinin increases cytosolic calcium in a subpopulation of cultured vagal afferent neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2002) 283:R1303–13. doi:10.1152/ajpregu.00050.2002
 50. Cohen JE, Fields RD. CaMKII inactivation by extracellular Ca(2+) depletion in dorsal root ganglion neurons. *Cell Calcium* (2006) 39:445–54. doi:10.1016/j.ceca.2006.01.005

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Ndjim, Poinignon, Parnet and Le Dréan. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

DISCUSSION GENERALE

L'objectif de cette thèse était d'étudier l'effet d'une dénutrition périnatale sur l'axe intestin – cerveau dont la programmation de certaines de ses composantes (CEE, SNE, nerf vague) pourrait contribuer aux défauts de régulation de la prise alimentaire observés à l'âge adulte chez le rat dénutri en période périnatale.

Nos résultats montrent qu'une restriction protéique au cours de la gestation et la lactation chez le rat semble être à l'origine d'une programmation des CEE, premier maillon de l'axe intestin-cerveau impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. Nous avons effectivement montré chez le rat ayant subi une dénutrition périnatale que le nombre de CEE totales et le nombre de CEE sécrétrices de CCK sont augmentés dans le duodénum, au moins au jeune âge. Cette programmation nutritionnelle des CEE semble également être à l'origine d'une modulation de leur fonction puisque le « sensing » des AGCL par les CEE, notamment d'un AGCL monoinsaturé est favorisé au jeune âge (60 jours) chez les rats dénutris en période périnatale. Chez ces derniers en effet, la concentration plasmatique de CCK ainsi que l'expression de FFAR4 sont augmentées en réponse à une administration orale d'acide palmitoléique. Cependant, ce « sensing » est associé à une altération de la barrière épithéliale intestinale, qui se reflète par une augmentation de la perméabilité paracellulaire duodénale. Nous avons mis en évidence pour la première fois par des approches pharmacologiques que la CCK aurait des effets directs sur des fonctions régulées par le SNE telles que la perméabilité intestinale. A l'âge adulte (130 jours), ces perturbations de barrière liées au « sensing » nutritionnel ne sont plus retrouvées. A cet âge, la dénutrition périnatale semble plutôt altérer l'absorption et/ou le métabolisme des acides gras mais ces résultats restent pour le moment préliminaires. Enfin, nous avons montré qu'une restriction protéique maternelle entraîne une perte de sensibilité vagale aux effets satiétogènes de la CCK chez les animaux adultes mais pas au jeune âge. L'ensemble de nos données montre donc bien que l'axe intestin-cerveau incluant les CEE, le SNE et les afférences vagues est une cible de la programmation nutritionnelle mais que ces effets, et ce point est déjà documenté dans la littérature ([Ozanne et al., 2011](#)), peuvent être modulés par d'autres facteurs tels que l'âge.

Les cellules entéro-endocrines sont-elles programmables ?

Dans la littérature, de nombreuses données indiquent que les cellules épithéliales intestinales telles que les entérocytes et les cellules de la lignée sécrétrice (cellules à mucus et cellules de Paneth) font l'objet d'une programmation par un stress environnemental *in utero*

(dénutrition périnatale) pouvant conduire à un petit poids à la naissance (Dong et al., 2014a; Fanca-Berthon et al., 2009; Ferenc et al., 2014; Ferenc et al., 2017; Fung et al., 2016; Mickiewicz et al., 2012; Schoffen et al., 2014; Wang et al., 2005). A l'opposé, les données faisant état d'une programmation des CEE par un stress (nutritionnel ou non) en période périnatale sont éparses. Schoffen et al. ont montré qu'une restriction calorique post-sevrage chez le rat module la différenciation des CEE sécrétrices de sérotonine dont la densité est augmentée à l'âge adulte (Schoffen et al., 2014). Par ailleurs, Estienne et al. ont montré qu'un stress de séparation maternelle au cours des 15 derniers jours de lactation entraîne une augmentation du nombre de CEE dans le duodénum de rats adultes (Estienne et al., 2010). En dehors de ces rares études de programmation, il a été démontré que la diminution du nombre de CEE associée au SII est réversible par un régime alimentaire appauvri en monosaccharides et en fibres insolubles en combinaison avec des probiotiques (El-Salhy and Gundersen, 2015; Mazzawi and El-Salhy, 2017; Mazzawi et al., 2015). Ces données soulignent la plasticité des CEE en réponse à des modifications de régimes alimentaires.

Afin d'étudier la programmation nutritionnelle des CEE, une première étape de ce travail de thèse a été de développer un modèle de rat transgénique qui exprime la GFP sous le contrôle du promoteur du gène qui code pour la CCK. En effet la faible représentativité des CEE sécrétrices de CCK au sein de l'épithélium intestinal (0.3-0.5% (van der Flier and Clevers, 2009)) nous a conduit à établir une collaboration avec la plateforme *Transgénèse Rat et ImmunoPhénomique (TRIP)* de Nantes afin de faciliter l'étude de ces CEE. Ainsi, grâce à ce modèle nous avons étudié l'effet d'une restriction protéique maternelle sur la densité des CEE sécrétrices de CCK, exprimant la GFP. Les CEE totales ont été marquées avec la chromogranine A, considéré dans de nombreuses études comme un marqueur pan-endocrine car impliqué dans le processus de sécrétion des peptides (Cetin et al., 1989; Facer et al., 1985; Mahata et al., 2002; Nagatake et al., 2014; Norlen et al., 2001; O'Connor et al., 1983; Rindi et al., 2004). Cependant, lors de nos analyses, nous avons visualisé des CEE exprimant la GFP qui n'étaient pas marquées par la *CHGA* (Figure 21).

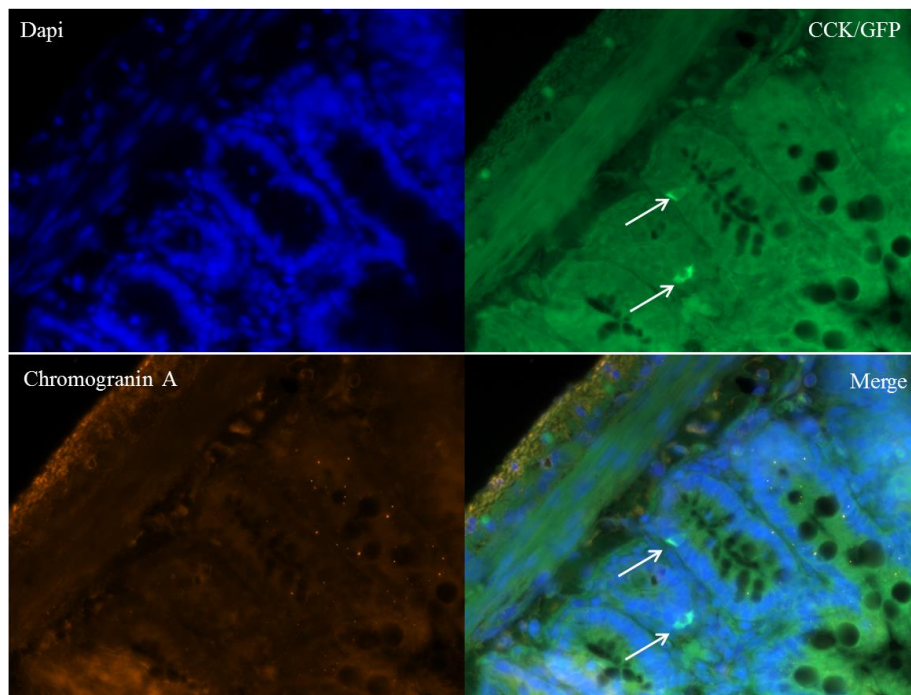


Figure 21 : Cellules entéro-endocrines qui expriment la GFP sous le contrôle du promoteur du gène qui code pour la CCK (CEE-CCK) mais qui ne sont pas immunoréactives pour la chromogranine A.

CCK (GFP) en vert et chromogranine A en rouge marquée par immunohistochimie

Cette observation semble signifier que, contrairement à ce qui est couramment admis, la ChgrA n'est peut-être pas exprimée par toutes les populations de CEE. Une étude assez ancienne avait déjà suggéré que l'immunoréactivité à la ChgrA était variable d'une espèce à une autre (homme, porc chat, cobaye), d'un segment intestinal à un autre mais aussi et surtout au sein d'une même sous population de CEE (Cetin et al., 1989). Des études très récentes viennent soutenir ces données en montrant que toutes les CEE sécrétrices de GLP-1 ne semblent pas exprimer la ChgrA (Basak et al., 2017; Kampmann et al., 2016). Dans la continuité de ce travail de thèse, il serait donc intéressant de déterminer la densité totale de toutes les sous-populations de CEE au moyen d'un autre marqueur. A ce jour, quelques études indiquent qu'il existerait d'autres marqueurs caractéristiques de toutes les CEE tels que la synaptophysine (Rindi et al., 2004). Néanmoins, cette dernière semble être spécifique d'une sous-population de CEE caractérisée par la présence de vésicules synaptiques (SLMVs), tandis que la ChgrA serait spécifique des CEE à larges vésicules (LDCVs) (Gunawardene et al., 2011; Rindi et al., 2004; Varndell et al., 1985; Wiedenmann et al., 1986). Par ailleurs, les CEE partagent avec les cellules neuronales un certain nombre de marqueurs neuroendocriniens tel que le PGP9.5 retrouvé dans le cytoplasme et qui pourrait également être considéré comme un marqueur potentiel des CEE (Bishop et al., 1988; Rindi et al., 2004).

Pour déterminer l'effet potentiel d'une dénutrition périnatale sur la différenciation des CEE, nous avons choisi de caractériser la densité des CEE sécrétrices de CCK dans l'intestin proximal où elles sont localisées de façon majoritaire (Furness et al., 2013; Latorre et al., 2016). Nous avons démontré qu'une restriction protéique maternelle est à l'origine d'une augmentation du nombre de ces CEE dans le duodénum mais pas dans le jéjunum où une autre population de cellules sécrétrices, les cellules à mucus, semblent être affectée. Ce résultat est en accord avec les rares études de la littérature puisque Radlowski et al., ont montré qu'un petit poids à la naissance chez le porcelet augmentait le nombre de CEE sécrétrices de sérotonine (Radlowski et al., 2014). De la même façon, comme évoqué au préalable, il a été démontré que les cellules à mucus font l'objet d'une programmation fœtale puisque leur nombre varie en fonction du stress environnemental subi *in utero* (Fanca-Berthon et al., 2009; Fung et al., 2016; Schoffen et al., 2014; Wang et al., 2005). Toutefois, ces données ont pour la plupart été obtenues dans des segments autres que l'intestin proximal, notamment le côlon et l'iléon et en plus très tôt au cours du développement postnatal à des âges où il est difficile de segmenter l'intestin.

Compte tenu des effets à long terme de la programmation nutritionnelle sur le risque de survenu d'un diabète de type 2 (Cottrell and Ozanne, 2008; Coupe et al., 2010; Desai et al., 2015; Garofano et al., 1997; Orozco-Solis et al., 2009; Ozanne, 2001; Ozanne and Hales, 2004), il serait également intéressant d'étudier les effets de la programmation sur d'autres sous-populations de CEE telles que celles sécrétrices de GLP-1 ou du GIP. Avec l'utilisation de notre modèle CCK-eGFP, couplé à des méthodes immunohistochimiques, il est tout à fait envisageable de caractériser la densité de ces autres sous-population de CEE et d'étudier si la co-localisation de ces peptides avec la CCK comme déjà démontrée (Egerod et al., 2012; Habib et al., 2012; Habib et al., 2013; Martins et al., 2017) est altérée par une restriction protéique maternelle.

Vu l'effet de la restriction protéique maternelle sur la densité de CEE, nous nous sommes intéressés à l'expression des différents facteurs impliqués dans leur différenciation. L'analyse transcriptomique à partir de la muqueuse de l'intestin proximal a produit des résultats peu voire pas concluants. En effet, bien que la densité des CEE sécrétrices de CCK soit augmentée dans le duodénum, nous n'avons pas mis en évidence un effet sur les gènes impliqués dans leur différenciation. Une des limites à l'utilisation de la muqueuse entière pour ce type de caractérisation génique est que le signal transcriptomique obtenu n'est pas propre aux CEE sécrétrices de CCK puisque certains gènes évalués sont spécifiques soit de toute la lignée pro-sécrétrice soit de toute la lignée endocrine (Posovszky, 2017). De plus, le très

faible niveau de représentativité de cette population de cellules dans la paroi duodénale génère probablement un signal également très faible, de surcroît dilué par les autres constituants de la paroi intestinale. Le modèle de rat CCK-eGFP a été mis en œuvre pour pallier ce biais puisqu'il est possible de récupérer les cellules fluorescentes en les triant par FACS à partir de cellules épithéliales extraites de muqueuse intestinale. Cependant, cette technique nécessite des mises au point de protocoles de dissociation cellulaire qui ont été réalisées au cours de la thèse mais l'étape cruciale du tri n'a pas pu être atteinte dans ce cadre. Nous tentons d'adapter les protocoles développés chez la souris (Bellono et al., 2017; Bohorquez et al., 2011; Chandra et al., 2010; Egerod et al., 2012; Habib et al., 2012; Liou et al., 2011a; Sykaras et al., 2012; Sykaras et al., 2014; Tolhurst et al., 2011) au rat. Il semble que nous n'arrivions pas à extraire un nombre suffisant de cellules pour effectuer un tri cellulaire (environ 6 millions de cellules par échantillon de duodénum alors qu'il en faudrait idéalement 40 millions). Nous envisageons donc de faire un pool de cellules extraites de plusieurs animaux du même groupe afin d'atteindre le nombre de cellules requis et de procéder au tri de la population de CEE CCK-eGFP. L'isolement de ces cellules devrait ainsi permettre de faire une étude plus fine de leur transcriptome mais aussi de leur épigénome. Il a été démontré qu'au niveau moléculaire, les processus qui sous-tendent la programmation nutritionnelle passe essentiellement par la modulation des mécanismes épigénétiques pouvant conduire à la modification de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation et la plasticité tissulaire (El-Salhy et al., 2010; Joss-Moore and Lane, 2009; Vickers, 2014; Waterland, 2009; Waterland et al., 2006).

En conclusion, nos résultats nous permettent de proposer que les CEE sécrétrices de CCK et par conséquent les CCE localisées dans le duodénum, sont sensibles à la nutrition périnatale et sont donc programmables. Cette augmentation de la densité de CEE sécrétrices de CCK pourrait contribuer à compenser un défaut de fonction lié au retard de développement de la muqueuse intestinale bien décrit chez les modèles de rats nés avec un RCIU (Avila et al., 1989; Che et al., 2016; D'Inca et al., 2011; Fanca-Berthon et al., 2010; Fanca-Berthon et al., 2009; Fung et al., 2016; Wang et al., 2005; Wang et al., 2010). Ces résultats ont néanmoins été obtenus chez des animaux jeunes (entre 40 et 60 jours) et il reste à étudier si ces effets perdurent à l'âge adulte.

La fonction de « sensing » nutritionnel des CEE est-elle programmable ?

Les CEE représentent un des premiers acteurs de la régulation de la prise alimentaire en détectant la présence des nutriments dès leur arrivée dans le duodénum. La première partie de notre travail nous a montré que la lignée sécrétrice de CCK du duodénum semblait soumise

aux effets d'une programmation nutritionnelle. Au-delà de cette étude sur la capacité endocrine intestinale, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une dénutrition périnatale sur la fonction de « sensing » nutritionnel de ces cellules. A notre connaissance, aucune étude sur la programmation de cette fonction dans l'intestin n'a été menée. Cependant, plusieurs autres organes qui détectent les nutriments circulants tels que l'hypothalamus et le placenta ont été décrits comme sensibles à une restriction protéique périnatale avec une fonction de « sensing » nutritionnel altérée (Jansson and Powell, 2013; Orozco-Solis et al., 2010). Ces données ont renforcé notre idée que cette fonction intestinale principalement gérée par les CEE pourrait également faire l'objet d'une programmation. Compte tenu des effets modulables par l'âge de la programmation nutritionnelle, notamment sur la prise alimentaire, nous avons mené notre étude à 2 stades de développement des rats (60 et 130 jours). Pour étudier le « sensing » des CEE sécrétrices de CCK, nous avons administré aux rats dénutris en période périnatale, par voie orale, soit une solution d'AGCL (palmitoléate, PAL), soit une solution « vehicle » et mesuré les fonctions régulées par les CEE (sécrétion de CCK, satiété) mais aussi des fonctions digestives (perméabilité) en lien avec le « sensing ».

Au jeune âge, chez le rat ayant subi une restriction protéique maternelle mais pas chez les rats contrôles, une augmentation de la concentration plasmatique de la CCK en réponse à une administration orale d'un AGCL monoinsaturé (PAL) a été mesurée. Ce résultat indique que la restriction protéique maternelle serait à l'origine d'une détection plus « importante » de ce nutriment par les CEE sécrétrices de CCK. De plus, nous avons montré que le niveau d'expression duodénale des récepteurs aux AGCL, notamment de FFAR4, est augmenté en réponse au PAL chez ces rats. Ces résultats pourraient être mis en lien avec le résultat précédemment décrit concernant la plus forte densité de CEE dans ce modèle qui favoriserait la capacité globale de « sensing » nutritionnel.

De façon inattendue, chez les rats contrôles, dans les mêmes conditions, la concentration plasmatique de la CCK est diminuée. Ceci est en désaccord avec une précédente étude sur laquelle nous nous sommes en grande partie basés pour définir notre protocole expérimental. En effet, dans cette étude, la concentration plasmatique de CCK mesurée au bout de 60 minutes, est augmentée en réponse à PAL et s'accompagne d'une diminution de la prise alimentaire (Yang et al., 2013), effet que nous n'avons pas reproduit dans notre étude. Dans un travail similaire, Liou et al. ont montré qu'un autre acide gras, l'acide oléique, augmente la concentration plasmatique de CCK également au bout de 60 minutes (Liou et al., 2011a). Cette seule différence de temps de mesure entre les deux protocoles (90 minutes dans notre étude vs 60 minutes dans Yang et al.) reste sans doute

insuffisante pour expliquer cette diminution de la concentration plasmatique de CCK chez les rats contrôles. Est-il envisageable que chez ces derniers, les capacités endocrines des CEE sécrétrices de CCK aient été réduites en deçà du niveau basal ? Est-ce qu'une mesure à un temps plus court aurait donné le même résultat ? Nous n'avons pas d'éléments cinétiques pour répondre à ces questions. Néanmoins, et de façon intéressante, ces résultats sont également retrouvés à l'âge adulte, ce qui permet d'exclure un éventuel artefact lié au gavage de l'acide gras *per se*. Une étude de la cinétique de sécrétion de la CCK en réponse à un gavage d'acide gras permettrait de mieux comprendre les résultats obtenus chez les rats contrôles.

Les CEE sécrétrices de CCK sont sensibles aux AGCL mais aussi aux protéines (Foltz et al., 2008; McLaughlin et al., 1999; Sidhu et al., 2000; Wang et al., 2002). Ainsi, une autre limite de notre étude réside dans le fait que nous avons utilisé uniquement des AGCL pour déterminer l'effet de la dénutrition périnatale sur le « sensing » nutritionnel de ces CEE. Il n'est donc pas exclu de potentiels effets de cette programmation sur la détection d'autres nutriments.

Le « sensing » nutritionnel impacte directement la sécrétion des peptides régulateurs de la satiété mais également les fonctions digestives associées à la prise alimentaire en régulant le SNE (Schemann et Neunlist, 2014). Nous avons donc voulu déterminer l'effet de la restriction protéique périnatale sur ces fonctions impliquant des interactions entre CEE et SNE. De récentes études ont apporté les preuves anatomiques d'un contact physique entre les CEE et le SNE à travers des prolongements cytoplasmiques appelés neuropodes (Bellono et al., 2017; Bohorquez et al., 2014; Bohorquez et al., 2015; Chandra et al., 2010). Nous avons ainsi mesuré l'effet des acides gras sur des fonctions digestives régulées par le SNE, telles que la motricité gastrique et la perméabilité paracellulaire intestinale (Bregeon et al., 2016; Neunlist et al., 2013). Nous n'avons montré aucun effet de la restriction protéique maternelle sur la motricité mesurée au niveau antrale. En revanche, une administration orale de PAL induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire chez les rats ayant subi une restriction protéique maternelle. On peut donc avancer que, même si la dénutrition périnatale favorise la détection de ce nutriment, elle semble entraîner une altération de la barrière épithéliale intestinale.

Compte tenu des effets du PAL sur la perméabilité intestinale, nous nous sommes ensuite concentrés sur l'étude des mécanismes qui pourraient expliquer cet effet. Sayegh et al. ont montré qu'une infusion d'acide oléique est à l'origine d'une activation de différents neurones dans les plexi du SNE. Plus précisément, il semblerait que cet effet implique la CCK (Sayegh et al., 2004). Dans une autre étude, il a été montré *ex vivo* chez le rat, que la CCK

active les neurones nitrergiques dans le duodénum à l'origine d'une relaxation des muscles (Martins et al., 2006). Dans notre étude, nous avons mis en évidence pour la première fois un effet direct de la CCK sur la perméabilité duodénale par des approches pharmacologiques en chambre d'Ussing. Cet effet de la CCK sur la perméabilité passerait par l'activation des neurones cholinergiques puisque nous avons montré qu'une inhibition de la voie cholinergique du SNE par de l'atropine bloque les effets de la CCK. Un certain nombre de données indiquent que la perméabilité intestinale est en effet sous le contrôle des neurones notamment cholinergiques du plexus sous-muqueux (Cameron and Perdue, 2007; Gareau et al., 2007; Saunders et al., 1997). En poursuite immédiate à ce travail, nous sommes en train de déterminer l'immunoréactivité c-fos (marqueur d'activation neuronale) des neurones cholinergiques du SNE dans les échantillons de duodénum ayant reçu les traitements avec la CCK et/ou l'atropine.

Dans notre étude, cette augmentation de la perméabilité paracellulaire ne semble pas impliquer une modification du niveau d'expression des protéines de jonction serrée occludine et claudine-2. Les protéines de jonction serrée constituent une frontière entre la lumière intestinale et le milieu intérieur (Groschwitz and Hogan, 2009). Elles participent ainsi au maintien de l'homéostasie mécanique et chimique de l'épithélium intestinal mais favorisent néanmoins les échanges entre les cellules (Groschwitz and Hogan, 2009). Cependant plus que leur niveau d'expression protéique étudié ici, leur localisation membranaire ou intracytoplasmique est toute aussi importante. De plus, une panoplie d'autres protéines de jonctions serrées de la famille des claudines, mais aussi la cinguline ou encore ZO-1, que nous n'avons pas étudiées, sont impliquées dans la régulation de la perméabilité paracellulaire (Gunzel and Yu, 2013; Lee, 2015; Lu et al., 2013; Suzuki, 2013). Il serait donc souhaitable d'étudier la localisation de l'occludine et de la claudine-2 mais aussi de quelques autres comme ZO-1, *in situ* par immunohistochimie avant de conclure à un effet excluant les jonctions serrées.

Ainsi, l'étude du « sensing nutritionnel » chez le jeune rat ayant subi une restriction protéique périnatale nous a permis de suggérer un effet de la programmation nutritionnelle sur cette fonction essentielle à l'initiation de la prise alimentaire. Nous avons également montré que le « sensing » nutritionnel des CEE sécrétrices de CCK pourrait avoir des conséquences sur des fonctions digestives régulées par le SNE, notamment la perméabilité intestinale. Nous proposons enfin que la CCK, peptide satiétogène sécrété en réponse aux AGCL, pourrait être le médiateur des effets du « sensing » nutritionnel sur la perméabilité intestinale.

Le nerf vague afférent est-il programmable ?

Les signaux générés par le « sensing » nutritionnel sont intégrés par le tronc cérébral et l'hypothalamus en grande partie *via* le nerf vague afférent. Les effets satiétogènes de la CCK sont principalement médiés par le nerf vague (Dockray, 2009a, 2012). Aussi, nous nous sommes intéressés à la programmation de cet autre acteur de l'axe intestin-cerveau impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. Une seule étude fait état d'une programmation du nerf vague et de ses fonctions. De Oliveira et al. ont démontré qu'une restriction protéique maternelle au cours de la lactation entraîne chez le rat une inhibition de l'activité électrique efférente du nerf vague à l'âge adulte (de Oliveira et al., 2011). Cependant, d'autres données indiquent une certaine plasticité du nerf vague qui serait sensible au statut nutritionnel. En effet, une résistance des afférences vagales aux effets satiétogènes de la leptine et de la CCK a été décrite chez le rat soumis à un régime obésogène (de Lartigue et al., 2012). Dans une autre étude chez la souris, il a également été démontré une diminution de l'excitabilité de la membrane cellulaire des neurones afférents du nerf vague et de leur sensibilité aux effets satiétogènes d'un régime obésogène (Daly et al., 2011). La modulation du niveau d'expression des récepteurs à la CCK situés sur les afférences vagales selon le statut nutritionnel est connue depuis longtemps (Broberger et al., 2001). Des études complémentaires ont montré depuis chez le rat que la plasticité neurochimique du nerf vague par le statut nutritionnel était orchestré par la CCK (Burdyga et al., 2004; de Lartigue et al., 2007; Dockray, 2009a). Ce mécanisme permettrait une régulation fine du déclenchement ou de l'arrêt de la prise alimentaire.

Ainsi, au début de ce projet, nous avons envisagé qu'une malnutrition périnatale pouvait être à l'origine d'une programmation du nerf vague pouvant conduire à une diminution de sa sensibilité ou de sa plasticité, expliquant au moins en partie les défauts de satiété observés dans notre modèle de rat issu de mères restreintes en protéines durant la gestation et la lactation.

Nous avons confirmé dans notre étude en cages physiologiques que les rats adultes ayant subi une restriction protéique périnatale présentaient des défauts de satiété (Coupe et al., 2010; Orozco-Solis et al., 2009). Chez ces animaux, la quantité de nourriture ingérée est plus élevée que chez les rats contrôles alors même que la concentration plasmatique de CCK postprandiale est également plus élevée. Ces observations nous ont amenés à l'hypothèse d'une résistance aux effets satiétogènes de la CCK chez les rats dénutris en période périnatale. Pour étudier les effets de la dénutrition périnatale sur la sensibilité vagale aux effets satiétogènes de la CCK, nous avons mesuré la prise alimentaire en réponse à des injections

par voie intrapéritonéale de doses croissantes de CCK et analysé dans le ganglion plexiforme (regroupe les corps cellulaires des afférences vagales) l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la régulation vagale de la PA (Burdyga et al., 2008; Burdyga et al., 2004; Burdyga et al., 2006; de Lartigue et al., 2011; de Lartigue et al., 2007; Dockray, 2009b; Dockray and Burdyga, 2011). Nos résultats ont montré qu'une dénutrition protéique périnatale induit à l'âge adulte une résistance aux effets de la plus faible dose satiétogène CCK (0.25 nmol/kg) utilisée (Savastano and Covasa, 2005). En revanche, notre hypothèse d'altération du switch phénotypique vagal n'a pas pu être soutenue dans notre étude. Nous n'avons en effet pas reproduit ce switch chez les rats contrôles. En effet, nous n'avons pas mesuré d'effet une injection intra-péritonéale de CCK (10 nmol comme indiqué dans les protocoles publiés) sur l'expression (RTqPCR et IHC) dans le ganglion plexiforme des marqueurs sensibles à la CCK publiés par cette équipe (MCH et récepteurs au MCH, récepteur au PYY, CART, NPY, etc.). Ces observations invalident ainsi complètement les conclusions qui pourraient être faites chez les rats dénutris. Il nous est difficile de comprendre la raison de cette non-reproduction de résultats dans un protocole très similaire (durée de jeûne, doses de CCK, âge des animaux, etc). D'autres auteurs, en utilisant une approche électrophysiologique, n'ont également pas retrouvé cet effet de la CCK sur le switch phénotypique du nerf vague (Yuan et al., 2016), et notamment sur la production de MCH, peptide orexigène.

Enfin, à défaut d'observer des effets sur les niveaux d'expression des gènes contrôlés par la CCK, nous avons recherché si la voie de signalisation induite par la CCK dans le ganglion plexiforme était altérée. Plusieurs études ont en effet montré que l'effet inhibiteur de la CCK sur la prise alimentaire passe par l'activation d'une cascade de voie de signalisation impliquant ERK, CaMKII et CREB (Babic et al., 2009; Sutton et al., 2004). Celles-ci sont activées au niveau des terminaisons des afférences du nerf vague retrouvées dans le NTS du tronc cérébral et ces activations se produisent seulement quelques minutes après une injection de CCK (Sutton et al., 2004). Dans le ganglion plexiforme, nous n'avons ainsi pas mesuré d'activation d'ERK ou de CaMKII 20 minutes après une injection de CCK (0,25 nmol/kg). Cette dose plus faible et ce temps plus long que ceux décrits dans la littérature peuvent expliquer ce résultat. Toutefois, nous avons fait le choix délibéré de cette dose de CCK pour reproduire des conditions physiologiques. Une analyse à un temps plus court de cette voie de signalisation au niveau des terminaisons des afférences vagales (et non dans le ganglion plexiforme) devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent cette régulation. De façon intéressante, nous avons montré qu'une restriction protéique maternelle

est à l'origine d'une diminution du niveau d'expression basale de CaMKII. Cette observation avait déjà été faite dans le cortex frontal chez le rat soumis à une restriction protéique maternelle (Flores et al., 2011) et cette diminution pourrait être mise en lien avec la perte de plasticité synaptique observée chez ces rats. Dans notre étude, cette diminution du niveau d'expression de CaMKII et des récepteurs à la CCK pourrait de la même façon contribuer à la perte de sensibilité des afférences du nerf vague.

Cette résistance à la plus faible dose satiétogène de CCK, observée à l'âge adulte chez les rats ayant subi une restriction protéique n'est pas retrouvée à 60 jours (Figure 22).

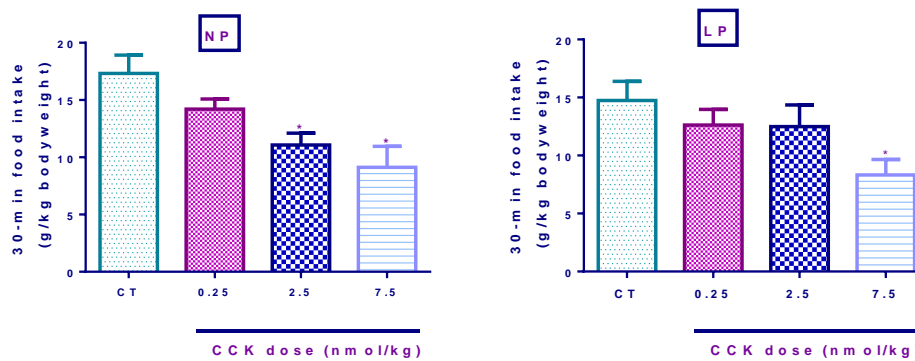


Figure 22 : Effet d'une injection intrapéritonéale de CCK à dose croissante sur la prise alimentaire chez des rats âgés de 60 jours.

La prise alimentaire a été mesurée pendant 30 minutes après un jeûne de 15h.

Cette résistance aux effets satiétogènes de la CCK observée dans notre étude est cohérente avec l'âge des animaux (Balasko et al., 2013; MacIntosh et al., 1999; Silver et al., 1988). Balasko et al. décrit l'homéostasie énergétique en trois phases : la première est une phase de croissance (âge jeune), la deuxième une phase « d'obésité » (âge adulte) et la dernière est une phase d'anorexie tardive (âge avancé) (Balasko et al., 2013; Balasko et al., 2012). Ces auteurs ont montré que l'effet anorexigène induit par la CCK change avec l'âge. Une injection intrapéritonéale de CCK (5µg) n'a pas d'effet chez les rats âgés de 2 mois (jeune âge). Cette efficacité est retrouvée à 3 mois et augmente à 6 mois. Au jeûne âge, l'expression des facteurs anorexigènes serait diminuée alors que l'expression des facteurs orexigènes serait amplifiée car les animaux sont en période de croissance (Akimoto and Miyasaka, 2010). Ces données ainsi que nos observations semblent donc suggérer que chez les animaux âgés de 2 mois, la CCK n'a que peu d'effet satiétogène et cela indépendamment de la programmation nutritionnelle. Il n'en reste pas moins que notre modèle de rat semble encore plus résistant que les rats contrôles aux effets de la CCK puisque seule la dose utilisée

pour induire une satiété dans les modèles d'obésité génétique (MC4 -/- (Blevins et al., 2009)) diminue significativement les quantités ingérées (Figure 24).

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes spécifiquement intéressés à la CCK or d'autres peptides sont impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Cependant, il a été montré que le PYY et le GLP-1 ne sont pas soumis à un effet âge (MacIntosh et al., 1999) contrairement à la ghréline dont le niveau d'expression semble augmenter au cours du développement postnatal (Lee et al., 2002) et avec l'âge (Akimoto et al., 2012). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la programmation nutritionnelle périnatale au cours du développement sur ces autres peptides gastrointestinaux.

CONCLUSION

Au cours de la première année de vie suivant la naissance, le poids et la taille s'accroissent considérablement, de 200% et 50% respectivement. Le rôle premier de la nutrition précoce est d'apporter les nutriments requis pour cette croissance. Pour les bébés nés avec un poids inférieur à la normale (< 2.5 kg) ou prématurément, l'impact de cette nutrition précoce est encore plus déterminante. A ce jour, ces enfants sont nourris en routine à l'aide de laits enrichis à 70% en protéines en comparaison au lait maternel (Fenton et al., 2014; Lapillonne et al., 2011). Cette supplémentation en protéines a pour but d'une part de rattraper la croissance et d'autre part de favoriser un développement psychomoteur optimal. Toutefois, de nombreuses données indiquent que bien que bénéfique à court terme, ces régimes entraînent des effets délétères à long terme (Forsen et al., 2000; Hokken-Koelega et al., 1995; Kelishadi et al., 2015; Lucas, 1991; Tinnion et al., 2014). En effet, les études épidémiologiques de Barker ont donné naissance à la théorie du DOHAD qui stipule que les enfants nés avec un petit poids ont un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires, un diabète de type 2 et une obésité à l'âge adulte (Barker, 1990, 2004, 2007; Barker and Osmond, 1986; Barker et al., 2009). Toutefois, plus que le poids à la naissance, la trajectoire de croissance qui s'en suit contribue largement à l'apparition de ce syndrome métabolique (Crume et al., 2014; Koletzko et al., 2017; Stutte et al., 2017). Ainsi, une altération des facteurs environnementaux, notamment nutritionnels, au cours de stade critique du développement, déterminent la santé de l'individu au long terme. Aujourd'hui les enjeux de la nutrition précoce visent non seulement à assurer le rattrapage de croissance mais aussi à limiter les effets délétères à l'âge adulte.

Les travaux réalisés durant cette thèse permettent de conclure qu'un stress nutritionnel au cours du développement périnatal entraîne une programmation de différents systèmes de l'axe intestin-cerveau impliqués dans la régulation de la prise alimentaire à court terme (**Figure 23**). Nous avons en effet montré l'impact de cette programmation sur deux composantes majeures de la régulation de la prise alimentaire par l'axe intestin-cerveau, les CEE et le nerf vague, ainsi que sur une des premières fonctions impliquée dans ce processus, le « sensing » nutritionnel.

Nous avons d'abord montré qu'une restriction protéique maternelle au cours de la gestation et la lactation chez le rat est à l'origine d'une augmentation de la densité de CEE au jeune âge et plus spécifiquement d'une augmentation du nombre de CEE sécrétrices de CCK dans le duodénum. Nous avons ensuite lié cette augmentation à une amplification de la

détection d'un AGCL monoinsaturé qui stimule la sécrétion de CCK dans ce modèle. L'impact positif ou compensatoire de la restriction protéique maternelle sur la capacité endocrine duodénale ainsi que sur le « sensing » d'un nutriment connu pour stimuler la sécrétion de CCK et induire une satiété (le palmitoléate) a été mesuré uniquement au jeune âge. Cependant, ce stade correspond à une phase de croissance durant laquelle les effets satiétogènes de la CCK sont naturellement réduits pour favoriser une prise alimentaire adéquate (Balaskó et al., 2013; MacIntosh et al., 1999; Silver et al., 1988). L'effet à long terme de la programmation des CEE reste donc à étudier à l'âge adulte où des défauts de satiété sont maintenus. En effet, à l'âge adulte, nous avons montré que la restriction protéique maternelle entraîne une perte de sensibilité vagale à la CCK qui pourrait contribuer aux défauts de régulation de la prise alimentaire observés à l'âge adulte. Bien que des données anciennes démontrent une résistance à la CCK chez le rat obèse (Niederau et al., 1997), nous avons décrit pour la première fois une résistance à la CCK chez les rats soumis à une restriction protéique maternelle. Ces résultats nouveaux apportent des éléments de compréhension pouvant expliquer le risque d'apparition accru de l'obésité chez les individus soumis à un stress nutritionnel au cours de la période de vie critique.

Bien que le « sensing » nutritionnel semble amélioré par une restriction protéique maternelle au jeune âge, nous avons montré qu'il aurait un impact sur des fonctions digestives telles que la perméabilité duodénale qui est augmentée en réponse à un des stimuli nutritionnels testés (palmitoléate). Nous avons de plus montré que cette augmentation de la perméabilité paracellulaire s'accompagne d'une augmentation du niveau d'expression dans le duodénum de cytokines pro-inflammatoires. La détection du contenu luminal et notamment des nutriments par la panoplie de « senseurs » situés au pôle apical des cellules épithéliales intestinales joue un rôle crucial dans la régulation de réponses physiologiques telles que l'absorption, la motricité gastrointestinale et l'homéostasie glucidique (Buchan, 1999; Dockray, 2004; Parker et al., 2009; Rasoamanana et al., 2012; Sufian et al., 2006). Aussi, l'altération du « sensing » nutritionnel pourrait contribuer à l'apparition de situations pathologiques (Berg and Kaunitz, 2016; Little et al., 2014; Ozdener et al., 2014; Stewart et al., 2011a; Stewart et al., 2011b). Par exemple, chez des individus en surpoids, la densité des récepteurs aux AGCL (CD36 et FFAR4) ainsi que la proportion de CEE (sécrétrices de GLP-1 et de CCK) sont corrélées avec l'indice de masse corporelle (Ozdener et al., 2014) suggérant ainsi l'importance potentielle du « sensing » nutritionnel dans le développement de pathologies métaboliques. De plus, quelques études suggèrent que la détection des

macronutriments par les « senseurs » des CEE représenterait une cible thérapeutique pour prévenir l'obésité (Breen et al., 2013; Norton and Murphy, 2017).

Un nombre croissant d'études a permis de démontrer que l'obésité est associée à une inflammation de « bas grade » caractérisée par un taux élevé de cytokines pro-inflammatoires (Boulangé et al., 2016; Castro et al., 2017; Emanuela et al., 2012; Jahng and Kim, 2016; Monteiro and Azevedo, 2010; Winer et al., 2016; Zimmermann and Aeberli, 2008). En effet, bien qu'un processus inflammatoire a pour but de rétablir l'homéostasie lorsqu'elle est dérégulée par divers stimuli, un état inflammatoire chronique ou excessif peut être à l'origine d'effets délétères (Rodriguez-Hernandez et al., 2013). Chez des individus souffrant d'une obésité abdominale, Blackburn et al. ont mis en évidence une augmentation du taux plasmatique de marqueurs d'inflammation pouvant contribuer à l'insulino-résistance observée chez ces patients 8h après un repas riche en gras (Blackburn et al., 2006). Ainsi, compte tenu de ces résultats et de l'augmentation du niveau d'expression de cytokines pro-inflammatoire observée dans notre étude, il est donc tout à fait envisageable que le développement d'un processus inflammatoire soit la conséquence d'un « sensing » nutritionnel amplifié, pouvant ainsi contribuer au développement de l'obésité chez des individus ayant subi un stress nutritionnel durant la période périnatale. Une meilleure compréhension de la mise en place de ces processus pro-inflammatoires pourrait fonder la base d'un ciblage thérapeutique dans les pathologies types du syndrome métabolique.

Les résultats que nous avons obtenus montrant une programmation du « sensing » et les conséquences sur les fonctions digestives telles que la perméabilité nous ont amenés à considérer de façon plus approfondie les interactions entre les CEE et le SNE. En effet, le SNE, avec ses deux plexi, régule les fonctions digestives telles que la motricité et la perméabilité intestinales. Nous avons démontré pour la première fois encore que le « gut connectome », composé par les CEE et le SNE, semble soumis aux effets de la programmation nutritionnelle mais les mécanismes qui régissent cet effet restent à être déterminés. De plus, dans ce travail de thèse, nous avons montré un effet direct de la CCK sur la perméabilité duodénale, effet qui serait médié par les neurones cholinergiques. En perspective à cette étude, il est prévu d'approfondir plus en avant ces interactions CEE/SNE qui pourraient jouer un rôle dans le développement de maladies métaboliques et/ou gastro-intestinales. Des études in vitro à l'aide d'organoïdes, composés de cellules épithéliales reconstituées à partir de cryptes intestinales issues de rats dénutris, mis en co-culture avec des neurones entériques pourraient apporter d'une part des informations mécanistiques sur la

nature des signaux échangés entre ces 2 composantes et d'autre part, d'élucider l'impact de la programmation nutritionnelle sur ce « cross-talk » entre les CEE et le SNE.

Outre son rôle dans la régulation de la digestion, des données indiquent qu'une altération du SNE est associée au développement de pathologies gastro-intestinales telles que le syndrome de l'intestin irritable (Bercik et al., 2005; Gershon, 2005; Jahng and Kim, 2016; Wood, 2001). Or de récentes études ont aussi permis de démontrer que les CEE joueraient un rôle primordial dans l'apparition des symptômes tels que l'hypersensitivité viscérale et la constipation qui caractérisent le SII (El-Salhy et al., 2017). En effet, les anomalies du système endocrine dans l'iléon de patients souffrant de SII sont caractérisées par une réduction du nombre de cellules progénitrices de la lignée endocrine et de la densité des CEE sécrétrices de sérotonine (El-Salhy and Gilja, 2017; El-Salhy et al., 2013). La cause des symptômes liés au SII pourrait donc être due à une dérégulation du système de signalisation de la sérotonine puisque cette dernière active le plexus sous-muqueux du SNE et contrôle la motricité intestinale (Gershon, 2004; Sikander et al., 2009). De plus la sérotonine régule la sécrétion de chlorure dont le transport est essentiel pour la sécrétion des fluides dans l'intestin et par conséquent pour une digestion enzymatique et une absorption des nutriments efficaces (Barrett and Keely, 2000; Mawe and Hoffman, 2013). Il semble donc que chacune des composantes du « gut connectome » jouerait un rôle spécifique sur le développement du SII mais il est tout à fait envisageable que les CEE et le SNE agissent en synergie dans ce processus.

Par ailleurs, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin qui prennent en compte le SII se caractérisent par une inflammation de la paroi du tube digestif et des changements structuraux du SNE tels qu'une augmentation des cellules ganglionnaires et une dégénération axonale (Di Giovangiulio et al., 2015; Lakhan and Kirchgessner, 2010; Margolis and Gershon, 2016; Sharkey and Kroese, 2001; Villanacci et al., 2008). Des données expérimentales suggèrent que l'inflammation, même si elle est minime, peut conduire à ces changements phénotypiques et structuraux des nerfs du tractus gastrointestinal entraînant ainsi des troubles de la motricité ainsi qu'une hypersensitivité viscérale (Lakhan and Kirchgessner, 2010). Ainsi, compte tenu des interactions entre le SNE et les cellules immunitaires intestinales, le SNE pourrait également réguler la réponse immunitaire (Di Giovangiulio et al., 2015; Franco et al., 2007; Mayer, 2011; Steinman, 2004).

Dans l'ensemble, ces données viennent étayer nos propos et démontre l'importance d'étudier les interactions du SNE avec les autres types cellulaires de l'intestin. L'identification des mécanismes qui sous-tendent non seulement les interactions entre les

CEE et le SNE mais aussi celles entre le SNE et les cellules immunitaires pourrait donc contribuer à mieux décrire les défauts de communication entre l'intestin et le cerveau aussi bien dans les dérégulations de la prise alimentaire que dans les pathologies gastro-intestinales dont le risque d'apparition est plus important chez les enfants ayant subi un stress environnemental *in utero* et au cours de leur développement précoce.

En conclusion ce travail de thèse a permis de montrer que les CEE et le nerf vague sont soumis aux effets de la dénutrition périnatale. Cette thèse a apporté des éléments nouveaux de compréhension des mécanismes à l'origine des défauts de régulation de la prise alimentaire observés chez le rat soumis à une restriction protéique maternelle. De plus nos résultats ouvrent de nouvelles pistes d'études pour une meilleure compréhension des défauts de communication entre l'intestin et le cerveau. Par ailleurs, il est connu que les effets de la programmation nutritionnelle périnatale passent essentiellement par des perturbations des mécanismes épigénétiques. Il serait donc intéressant de déterminer si des modifications épigénétiques des gènes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et le « sensing » nutritionnel sous-tendent la programmation de l'axe intestin-cerveau. L'approfondissement des données obtenues dans cette thèse *via* l'étude des fonctions neuroendocrines impliquant: (i) les récepteurs aux nutriments des CEE, (ii) les récepteurs aux peptides gastrointestinaux situés sur le SNE ainsi que, (iii) l'activité vagale, devrait également permettre de proposer de nouvelles cibles d'étude des pathologies métaboliques et gastrointestinales. En effet, l'enjeu serait de mettre en évidence de nouveaux marqueurs intestinaux et neuronaux qui pourraient être utilisés dans les études d'interventions nutritionnelles et thérapeutiques. Ainsi, des stratégies de prévention du développement d'un syndrome métabolique chez les individus nés avec un petit poids et/ou ayant subi des trajectoires de croissance défavorables pourraient être envisagée.

Programmation de l'axe intestin cerveau

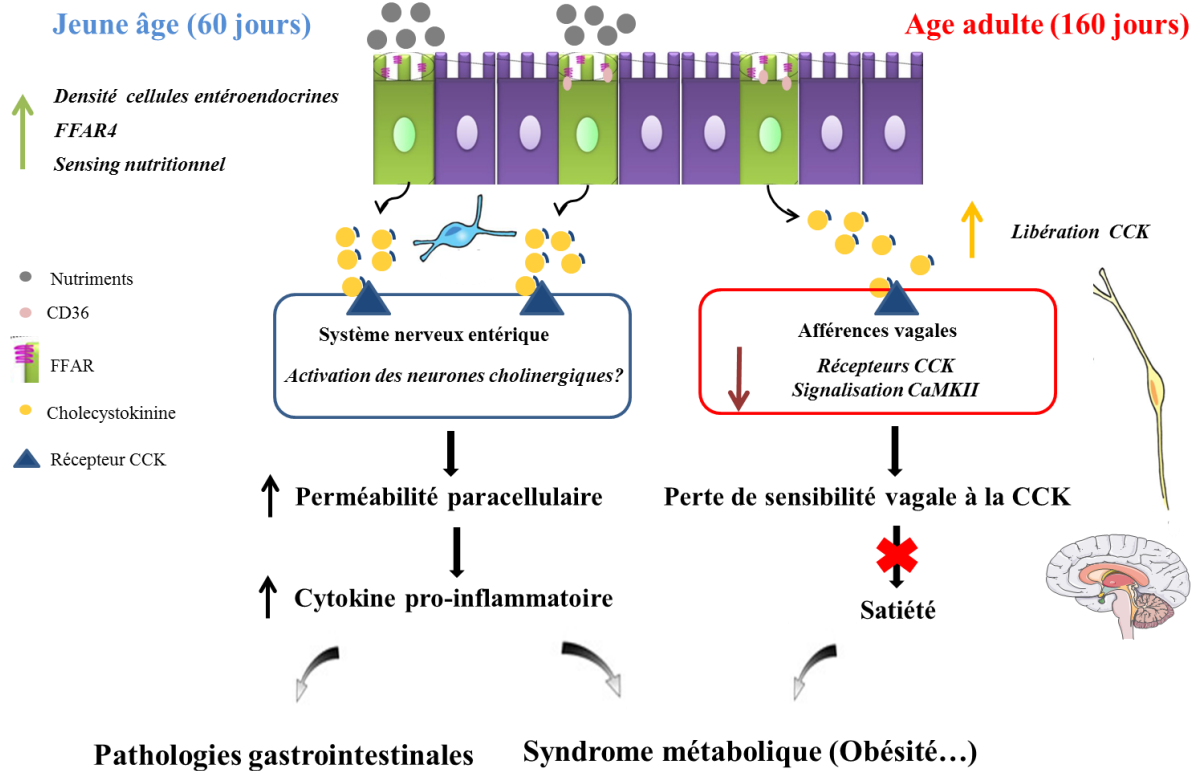


Figure 23 : Schéma de synthèse des principaux résultats montrant les effets d'une restriction protéique maternelle sur l'axe intestin-cerveau impliqué dans la régulation de la prise alimentaire à court terme.

Au jeune âge (60 jours), un stress nutritionnel périnatal chez le rat favorise la détection des nutriments par les cellules entéroendocrines sécrétrices de cholecystokinine (CCK) entraînant ainsi une augmentation de la libération de cette dernière. Cette amélioration du « sensing » nutritionnel favoriserait l'activation des neurones cholinergiques du système nerveux entérique par la CCK et serait à l'origine d'une augmentation de la perméabilité paracellulaire et du niveau d'expression de cytokines pro-inflammatoires.

A l'âge adulte (160 jours), une restriction protéique maternelle est à l'origine d'une plus forte sécrétion de CCK en réponse à un repas. Toutefois, le niveau d'expression des récepteurs à la CCK est diminué dans les afférences du nerf vague. De plus, on observe un défaut d'intégration des effets physiologiques de la CCK associé à une dérégulation de l'expression de CaMKII. Nos résultats indiquent donc qu'un stress nutritionnel périnatal entraîne une perte de sensibilité vagale à la CCK et par conséquent une dérégulation de la satiété.

L'altération de la communication entre l'axe intestin-cerveau pourrait contribuer au risque d'apparition accru de l'obésité et des pathologies gastrointestinales chez les individus soumis à un stress nutritionnel au cours de la période périnatale.

REFERENCES

-A-

- <Building a brain in the gut development of the enteric nervous system..pdf>.
- Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *Faseb j* 24, 1082-1094.
- Abumrad, N.A., and Davidson, N.O. (2012). Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev* 92, 1061-1085.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., and Flier, J.S. (1998). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 101, 1020-1027.
- Ahima, R.S., Saper, C.B., Flier, J.S., and Elmquist, J.K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in neuroendocrinology* 21, 263-307.
- Ahlman, H., and Nilsson (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 12 Suppl 2, S63-68.
- Ait-Omar, A., Monteiro-Sepulveda, M., Poitou, C., Le Gall, M., Cotillard, A., Gilet, J., Garbin, K., Houllier, A., Chateau, D., Lacombe, A., *et al.* (2011). GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes* 60, 2598-2607.
- Akimoto, S., and Miyasaka, K. (2010). Age-associated changes of appetite-regulating peptides. *Geriatrics & gerontology international* 10 Suppl 1, S107-119.
- Akimoto, Y., Kanai, S., Ohta, M., Akimoto, S., Uematsu, H., and Miyasaka, K. (2012). Age-associated reduction of stimulatory effect of ghrelin on food intake in mice. *Archives of gerontology and geriatrics* 55, 238-243.
- Al Massadi, O., Tschop, M.H., and Tong, J. (2011). Ghrelin acylation and metabolic control. *Peptides* 32, 2301-2308.
- Amarger, V., Giudicelli, F., Pagniez, A., and Parnet, P. (2017). Perinatal high methyl donor alters gene expression in IGF system in male offspring without altering DNA methylation. *Future Science OA* 3.
- Andrew, A., Kramer, B., and Rawdon, B.B. (1998). The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells--the last word? *The Journal of pathology* 186, 117-118.
- Anglade, P., Michel, C., and Roze, C. (1987). Intrinsic nerves of the pancreas after celiac and superior mesenteric ganglionectomy in rats: a morphologic study of acetylcholinesterase activity and catecholamine histofluorescence. *Pancreas* 2, 568-577.
- Antin, J., Gibbs, J., Holt, J., Young, R.C., and Smith, G.P. (1975). Cholecystokinin elicits the complete behavioral sequence of satiety in rats. *J Comp Physiol Psychol* 89, 784-790.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., and Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877-881.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Attig, L., Djiane, J., Gertler, A., Rampin, O., Larcher, T., Boukthir, S., Anton, P.M., Madec, J.Y., Gourdou, I., and Abdennebi-Najar, L. (2008). Study of hypothalamic leptin receptor expression in low-birth-weight piglets and effects of leptin supplementation on neonatal

growth and development. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 295, E1117-1125.

- Aube, A.C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55, 630-637.
- Avila, C.G., Harding, R., Rees, S., and Robinson, P.M. (1989). Small intestinal development in growth-retarded fetal sheep. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 8, 507-515.

-B-

- Babic, T., Townsend, R.L., Patterson, L.M., Sutton, G.M., Zheng, H., and Berthoud, H.R. (2009). Phenotype of neurons in the nucleus of the solitary tract that express CCK-induced activation of the ERK signaling pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R845-854.
- Babson, S.G., and Benda, G.I. (1976). Growth graphs for the clinical assessment of infants of varying gestational age. *The Journal of pediatrics* 89, 814-820.
- Bach-Ngohou, K., Mahe, M.M., Aubert, P., Abdo, H., Boni, S., Bourreille, A., Denis, M.G., Lardeux, B., Neunlist, M., and Masson, D. (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J Physiol* 588, 2533-2544.
- Badman, M.K., and Flier, J.S. (2005). The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 307, 1909-1914.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., *et al.* (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790-793.
- Balaskó, M., Rostás, I., Füredi, N., Mikó, A., Tenk, J., Cséplő, P., Koncsecskó-Gáspár, M., Soós, S., Székely, M., and Pétervári, E. (2013). Age and nutritional state influence the effects of cholecystokinin on energy balance. *Experimental Gerontology* 48, 1180-1188.
- Balasko, M., Soos, S., Parniczky, A., Koncsecsko-Gaspar, M., Szekely, M., and Petervari, E. (2012). Anorexic effect of peripheral cholecystokinin (CCK) varies with age and body composition (short communication). *Acta physiologica Hungarica* 99, 166-172.
- Balen, D., Ljubojevic, M., Breljak, D., Brzica, H., Zlender, V., Koepsell, H., and Sabolic, I. (2008). Revised immunolocalization of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. *American journal of physiology Cell physiology* 295, C475-489.
- Barker, D.J. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 301, 1111.
- Barker, D.J. (2004). The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of Nutrition* 23, 588s-595s.
- Barker, D.J. (2007). The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261, 412-417.
- Barker, D.J., and Osmond, C. (1986). Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. *J Epidemiol Community Health* 40, 37-44.

- Barker, D.J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., and Wadsworth, M.E. (1989a). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298, 564-567.
- Barker, D.J., Osmond, C., Kajantie, E., and Eriksson, J.G. (2009). Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Annals of human biology* 36, 445-458.
- Barker, D.J., Winter, P.D., Osmond, C., Margetts, B., and Simmonds, S.J. (1989b). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet (London, England)* 2, 577-580.
- Barker, N., Bartfeld, S., and Clevers, H. (2010). Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell stem cell* 7, 656-670.
- Barrett, K.E., and Keely, S.J. (2000). Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62, 535-572.
- Basak, O., Beumer, J., Wiebrands, K., Seno, H., van Oudenaarden, A., and Clevers, H. (2017). Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. *Cell stem cell* 20, 177-190.e174.
- Baschat, A.A., and Hecher, K. (2004). Fetal growth restriction due to placental disease. *Seminars in perinatology* 28, 67-80.
- Batterham, R.L., Heffron, H., Kapoor, S., Chivers, J.E., Chandarana, K., Herzog, H., Le Roux, C.W., Thomas, E.L., Bell, J.D., and Withers, D.J. (2006). Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell metabolism* 4, 223-233.
- Beck, B. (2001). KO's and organisation of peptidergic feeding behavior mechanisms. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 25, 143-158.
- Beglinger, C., Degen, L., Matzinger, D., D'Amato, M., and Drewe, J. (2001). Loxiglumide, a CCK-A receptor antagonist, stimulates calorie intake and hunger feelings in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, R1149-1154.
- Bellinger, L.L., and Bernardis, L.L. (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: Lessons learned from lesioning studies. *Physiology & Behavior* 76, 431-442.
- Bellono, N.W., Bayrer, J.R., Leitch, D.B., Castro, J., Zhang, C., O'Donnell, T.A., Brierley, S.M., Ingraham, H.A., and Julius, D. (2017). Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways. *Cell* 170, 185-198.e116.
- Bengtson, M., Rønning, T., Vatn, M.H., and Harris, J.R. (2006). Irritable bowel syndrome in twins: genes and environment. *Gut* 55, 1754-1759.
- Bercik, P., Verdu, E.F., and Collins, S.M. (2005). Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? *Gastroenterol Clin North Am* 34, 235-245, vi-vii.
- Berg, C.J., and Kaunitz, J.D. (2016). Gut chemosensing: implications for disease pathogenesis. *F1000Research* 5, 2424.
- Bernstein, I.M., Horbar, J.D., Badger, G.J., Ohlsson, A., and Golan, A. (2000). Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *American journal of obstetrics and gynecology* 182, 198-206.
- Berthoud, H.R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 26, 393-428.
- Berthoud, H.R. (2003). Neural systems controlling food intake and energy balance in the modern world. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 6, 615-620.

- Berthoud, H.R., Earle, T., Zheng, H., Patterson, L.M., and Phifer, C. (2001). Food-related gastrointestinal signals activate caudal brainstem neurons expressing both NMDA and AMPA receptors. *Brain Res* 915, 143-154.
- Berthoud, H.R., Sutton, G.M., Townsend, R.L., Patterson, L.M., and Zheng, H. (2006). Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol Behav* 89, 517-524.
- Bertrand, P.P., Kunze, W.A., Bornstein, J.C., Furness, J.B., and Smith, M.L. (1997). Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am J Physiol* 273, G422-435.
- Beucher, A., Gjernes, E., Collin, C., Courtney, M., Meunier, A., Collombat, P., and Gradwohl, G. (2012). The Homeodomain-Containing Transcription Factors Arx and Pax4 Control Enteroendocrine Subtype Specification in Mice. *PLoS One* 7.
- Bishop, A.E., Power, R.F., and Polak, J.M. (1988). Markers for Neuroendocrine Differentiation. *Pathology - Research and Practice* 183, 119-128.
- Blackburn, P., Despres, J.P., Lamarche, B., Tremblay, A., Bergeron, J., Lemieux, I., and Couillard, C. (2006). Postprandial variations of plasma inflammatory markers in abdominally obese men. *Obesity (Silver Spring, Md)* 14, 1747-1754.
- Blevins, J.E., Morton, G.J., Williams, D.L., Caldwell, D.W., Bastian, L.S., Wisse, B.E., Schwartz, M.W., and Baskin, D.G. (2009). Forebrain melanocortin signaling enhances the hindbrain satiety response to CCK-8. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R476-484.
- Blondel, B., Lelong, N., Kermarrec, M., and Goffinet, F. (2012). [Trends in perinatal health in France between 1995 and 2010: Results from the National Perinatal Surveys]. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction* 41, 151-166.
- Blundell, J.E., and Halford, J.C. (1994). Regulation of nutrient supply: the brain and appetite control. *Proc Nutr Soc* 53, 407-418.
- Bohorquez, D.V., Chandra, R., Samsa, L.A., Vigna, S.R., and Liddle, R.A. (2011). Characterization of basal pseudopod-like processes in ileal and colonic PYY cells. *Journal of molecular histology* 42, 3-13.
- Bohorquez, D.V., Samsa, L.A., Roholt, A., Medicetty, S., Chandra, R., and Liddle, R.A. (2014). An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS One* 9, e89881.
- Bohorquez, D.V., Shahid, R.A., Erdmann, A., Kreger, A.M., Wang, Y., Calakos, N., Wang, F., and Liddle, R.A. (2015). Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *J Clin Invest* 125, 782-786.
- Bouhours-Nouet, N., May-Panloup, P., Coutant, R., de Casson, F.B., Descamps, P., Douay, O., Reynier, P., Ritz, P., Malthiery, Y., and Simard, G. (2005). Maternal smoking is associated with mitochondrial DNA depletion and respiratory chain complex III deficiency in placenta. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 288, E171-177.
- Boulangé, C.L., Neves, A.L., Chilloux, J., Nicholson, J.K., and Dumas, M.E. (2016). Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine* 8.
- Bouret, S.G., Draper, S.J., and Simerly, R.B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304, 108-110.
- Bouret, S.G., and Simerly, R.B. (2004). Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology* 145, 2621-2626.

- Bozzetti, V., Tagliabue, P.E., Visser, G.H., van Bel, F., and Gazzolo, D. (2013). Feeding issues in IUGR preterm infants. *Early human development* 89 Suppl 2, S21-23.
- Breen, D.M., Rasmussen, B.A., Côté, C.D., Jackson, V.M., and Lam, T.K.T. (2013). Nutrient-Sensing Mechanisms in the Gut as Therapeutic Targets for Diabetes. *Diabetes* 62, 3005-3013.
- Breen, D.M., Yang, C.S., and Lam, T.K. (2011). Gut-brain signalling: how lipids can trigger the gut. *Diabetes/metabolism research and reviews* 27, 113-119.
- Bregeon, J., Coron, E., Da Silva, A.C., Jaulin, J., Aubert, P., Chevalier, J., Vergnolle, N., Meurette, G., and Neunlist, M. (2016). Sacral nerve stimulation enhances early intestinal mucosal repair following mucosal injury in a pig model. *J Physiol* 594, 4309-4323.
- Brittan, M., and Wright, N.A. (2004). STEM CELL IN GASTROINTESTINAL STRUCTURE AND NEOPLASTIC DEVELOPMENT. *Gut* 53, 899-910.
- Broberger, C., Holmberg, K., Shi, T.-J., Dockray, G., and Hökfelt, T. (2001). Expression and regulation of cholecystokinin and cholecystokinin receptors in rat nodose and dorsal root ganglia. *Brain Research* 903, 128-140.
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., *et al.* (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *The Journal of biological chemistry* 278, 11312-11319.
- Brubaker, P.L. (1991). Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides. *Endocrinology* 128, 3175-3182.
- Buchan, A.M. (1999). Nutrient Tasting and Signaling Mechanisms in the Gut III. Endocrine cell recognition of luminal nutrients. *Am J Physiol* 277, G1103-1107.
- Burdyga, G., de Lartigue, G., Raybould, H.E., Morris, R., Dimaline, R., Varro, A., Thompson, D.G., and Dockray, G.J. (2008). Cholecystokinin regulates expression of Y2 receptors in vagal afferent neurons serving the stomach. *J Neurosci* 28, 11583-11592.
- Burdyga, G., Lal, S., Varro, A., Dimaline, R., Thompson, D.G., and Dockray, G.J. (2004). Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J Neurosci* 24, 2708-2715.
- Burdyga, G., Varro, A., Dimaline, R., Thompson, D.G., and Dockray, G.J. (2006). Feeding-dependent depression of melanin-concentrating hormone and melanin-concentrating hormone receptor-1 expression in vagal afferent neurones. *Neuroscience* 137, 1405-1415.
- Burton, G.J., Palmer, M.E., and Dalton, K.J. (1989). Morphometric differences between the placental vasculature of non-smokers, smokers and ex-smokers. *British journal of obstetrics and gynaecology* 96, 907-915.
- Buttet, M., Poirier, H., Traynard, V., Gaire, K., Tran, T.T.T., Sundaresan, S., Besnard, P., Abumrad, N.A., and Niot, I. (2016). Deregulated Lipid Sensing by Intestinal CD36 in Diet-Induced Hyperinsulinemic Obese Mouse Model. *PLoS One* 11.
- Buyse, M., Ovesjo, M.L., Giot, H., Guilmeau, S., Peranzi, G., Moizo, L., Walker, F., Lewin, M.J., Meister, B., and Bado, A. (2001). Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *The European journal of neuroscience* 14, 64-72.

-C-

- Calkins, K., and Devaskar, S.U. (2011). Fetal Origins of Adult Disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 41, 158-176.
- Cameron, H.L., and Perdue, M.H. (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* 19, 47-56.
- Cameron, N., and Demerath, E.W. (2002). Critical periods in human growth and their relationship to diseases of aging. *American journal of physical anthropology Suppl* 35, 159-184.
- Castelucci, P., de Souza, R.R., de Angelis, R.C., Furness, J.B., and Liberti, E.A. (2002). Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. *Cell and tissue research* 310, 1-7.
- Castro, A.M., Macedo-de la Concha, L.E., and Pantoja-Meléndez, C.A. (2017). Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. *Revista Médica del Hospital General de México* 80, 101-105.
- Cetin, Y., Muller-Koppel, L., Aunis, D., Bader, M.F., and Grube, D. (1989). Chromogranin A (CgA) in the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system. II. CgA in mammalian entero-endocrine cells. *Histochemistry* 92, 265-275.
- Challis, B.G., Coll, A.P., Yeo, G.S., Pinnock, S.B., Dickson, S.L., Thresher, R.R., Dixon, J., Zahn, D., Rochford, J.J., White, A., *et al.* (2004). Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4695-4700.
- Chandra, R., and Liddle, R.A. (2007). Cholecystokinin. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 14, 63-67.
- Chandra, R., Samsa, L.A., Vigna, S.R., and Liddle, R.A. (2010). Pseudopod-like basal cell processes in intestinal cholecystokinin cells. *Cell and tissue research* 341, 289-297.
- Chatelain, P. (2000). Children born with intra-uterine growth retardation (IUGR) or small for gestational age (SGA): long term growth and metabolic consequences. *Endocrine regulations* 34, 33-36.
- Che, L., Hu, L., Liu, Y., Yan, C., Peng, X., Xu, Q., Wang, R., Cheng, Y., Chen, H., Fang, Z., *et al.* (2016). Dietary Nucleotides Supplementation Improves the Intestinal Development and Immune Function of Neonates with Intra-Uterine Growth Restriction in a Pig Model. *PLoS One* 11, e0157314.
- Chen, J., Chen, P., Bo, T., and Luo, K. (2016). Cognitive and Behavioral Outcomes of Intrauterine Growth Restriction School-Age Children. *Pediatrics* 137.
- Chen, S.J., Vohr, B.R., and Oh, W. (1993). Effects of birth order, gender, and intrauterine growth retardation on the outcome of very low birth weight in twins. *The Journal of pediatrics* 123, 132-136.
- Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *The American journal of anatomy* 141, 537-561.

- Cheung, G.W., Kokorovic, A., Lam, C.K., Chari, M., and Lam, T.K. (2009). Intestinal cholecystokinin controls glucose production through a neuronal network. *Cell metabolism* 10, 99-109.
- Cho, C.E., Sanchez-Hernandez, D., Reza-Lopez, S.A., Huot, P.S., Kim, Y.I., and Anderson, G.H. (2013). High folate gestational and post-weaning diets alter hypothalamic feeding pathways by DNA methylation in Wistar rat offspring. *Epigenetics* 8, 710-719.
- Chu, Z.L., Carroll, C., Alfonso, J., Gutierrez, V., He, H., Lucman, A., Pedraza, M., Mondala, H., Gao, H., Bagnol, D., *et al.* (2008). A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release. *Endocrinology* 149, 2038-2047.
- Coll, A.P., Farooqi, I.S., and O'Rahilly, S. (2007). The Hormonal Control of Food Intake. *Cell* 129, 251-262.
- Commare, C.E., and Tappenden, K.A. (2007). Development of the infant intestine: implications for nutrition support. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 22, 159-173.
- Costa, M., Brookes, S.J.H., and Hennig, G.W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47, iv15.
- Cottrell, E.C., and Ozanne, S.E. (2008). Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiology & Behavior* 94, 17-28.
- Coupe, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A., and Parnet, P. (2010). Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 151, 702-713.
- Coupe, B., Grit, I., Darmaun, D., and Parnet, P. (2009). The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297, R813-824.
- Crume, T.L. (2014). The long-term impact of intrauterine growth restriction in a diverse U.S. cohort of children: the EPOCH study. *Obesity (Silver Spring, Md)* 22, 608-615.
- Crume, T.L., Scherzinger, A., Stamm, E., McDuffie, R., Bischoff, K.J., Hamman, R.F., and Dabelea, D. (2014). The long-term impact of intrauterine growth restriction in a diverse U.S. cohort of children: the EPOCH study. *Obesity (Silver Spring, Md)* 22, 608-615.
- Cummings, D.E., Foster-Schubert, K.E., and Overduin, J. (2005). Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Current drug targets* 6, 153-169.
- Cummings, D.E., Frayo, R.S., Marmonier, C., Aubert, R., and Chapelot, D. (2004). Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 287, E297-304.
- Cummings, D.E., and Overduin, J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117, 13-23.

-D-

- D'Inca, R., Gras-Le Guen, C., Che, L., Sangild, P.T., and Le Huerou-Luron, I. (2011). Intrauterine growth restriction delays feeding-induced gut adaptation in term newborn pigs. *Neonatology* 99, 208-216.

- D'Aquila, T. (2016). RECENT DISCOVERIES ON ABSORPTION OF DIETARY FAT: PRESENCE, SYNTHESIS, AND METABOLISM OF CYTOPLASMIC LIPID DROPLETS WITHIN ENTEROCYTES. *1861*, 730-747.
- Daly, D.M., Park, S.J., Valinsky, W.C., and Beyak, M.J. (2011). Impaired intestinal afferent nerve satiety signalling and vagal afferent excitability in diet induced obesity in the mouse. *J Physiol* *589*, 2857-2870.
- Dancis, J., O'Connell, J.R., and Holt, L.E., Jr. (1948). A grid for recording the weight of premature infants. *The Journal of pediatrics* *33*, 570-572.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M.S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* *141*, 4255-4261.
- Date, Y., Toshinai, K., Koda, S., Miyazato, M., Shimbara, T., Tsuruta, T., Nijima, A., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2005). Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology* *146*, 3518-3525.
- De Giorgio, R., Giancola, F., Boschetti, E., Abdo, H., Lardeux, B., and Neunlist, M. (2012). Enteric glia and neuroprotection: basic and clinical aspects. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* *303*, G887-G893.
- de Heuvel, E., Wallace, L., Sharkey, K.A., and Sigalet, D.L. (2012). Glucagon-like peptide 2 induces vasoactive intestinal polypeptide expression in enteric neurons via phosphatidylinositol 3-kinase-gamma signaling. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *303*, E994-1005.
- de Lartigue, G. (2014). Putative roles of neuropeptides in vagal afferent signaling. *Physiol Behav* *0*, 155-169.
- de Lartigue, G., Barbier de la Serre, C., Espero, E., Lee, J., and Raybould, H.E. (2012). Leptin resistance in vagal afferent neurons inhibits cholecystokinin signaling and satiation in diet induced obese rats. *PLoS One* *7*, e32967.
- de Lartigue, G., de La Serre, C.B., and Raybould, H.E. (2011). Vagal afferent neurons in high fat diet-induced obesity; intestinal microflora, gut inflammation and cholecystokinin. *Physiol Behav* *105*, 100-105.
- de Lartigue, G., Dimaline, R., Varro, A., and Dockray, G.J. (2007). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin. *J Neurosci* *27*, 2876-2882.
- de Oliveira, J.C., Scomparin, D.X., Andreazzi, A.E., Branco, R.C., Martins, A.G., Gravena, C., Grassioli, S., Rinaldi, W., Barbosa, F.B., and Mathias, P.C. (2011). Metabolic imprinting by maternal protein malnourishment impairs vagal activity in adult rats. *Journal of neuroendocrinology* *23*, 148-157.
- De Quelen, F., Chevalier, J., Rolli-Derkinderen, M., Mouro, J., Neunlist, M., and Boudry, G. (2011). n-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *J Physiol* *589*, 4341-4352.
- De Santa Barbara, P. (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *60*, 1322-1332.
- Defetos, L.J. (1991). Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocrine reviews* *12*, 181-187.

- Degen, L., Drewe, J., Piccoli, F., Grani, K., Oesch, S., Bunea, R., D'Amato, M., and Beglinger, C. (2007). Effect of CCK-1 receptor blockade on ghrelin and PYY secretion in men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R1391-1399.
- Delahaye, F., Breton, C., Risold, P.Y., Enache, M., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., Lesage, J., and Vieau, D. (2008). Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* 149, 470-475.
- Della-Zuana, O., Presse, F., Ortola, C., Duhault, J., Nahon, J.L., and Levens, N. (2002). Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 26, 1289-1295.
- Demenis, C., McLaughlin, J., and Smith, C.P. (2017). Sulfated Cholecystokinin-8 Promotes CD36—Mediated Fatty Acid Uptake into Primary Mouse Duodenal Enterocytes. *Frontiers in Physiology* 8.
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J., and Ross, M.G. (2005). Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R91-96.
- Desai, M., Jellyman, J.K., and Ross, M.G. (2015). Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)* 39, 633-641.
- Desai, M., Li, T., and Ross, M.G. (2011). Hypothalamic neurosphere progenitor cells in low birth-weight rat newborns: neurotrophic effects of leptin and insulin. *Brain Res* 1378, 29-42.
- Desai, S., Loomis, Z., Pugh-Bernard, A., Schruck, J., Doyle, M.J., Minic, A., McCoy, E., and Sussel, L. (2008). Nkx2.2 regulates cell fate choice in the enteroendocrine cell lineages of the intestine. *Dev Biol* 313, 58-66.
- Di Giovangiulio, M., Verheijden, S., Bosmans, G., Stakenborg, N., Boeckxstaens, G.E., and Matteoli, G. (2015). The Neuromodulation of the Intestinal Immune System and Its Relevance in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology* 6.
- Diakogiannaki, E., Pais, R., Tolhurst, G., Parker, H.E., Horscroft, J., Rauscher, B., Zietek, T., Daniel, H., Gribble, F.M., and Reimann, F. (2013). Oligopeptides stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in mice through proton-coupled uptake and the calcium-sensing receptor. *Diabetologia* 56, 2688-2696.
- Djiane, J., and Attig, L. (2008). Role of leptin during perinatal metabolic programming and obesity. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 59 Suppl 1, 55-63.
- Dockray, G. (2004). Gut endocrine secretions and their relevance to satiety. *Curr Opin Pharmacol* 4, 557-560.
- Dockray, G.J. (2009a). Cholecystokinin and gut-brain signalling. *Regul Pept* 155, 6-10.
- Dockray, G.J. (2009b). The versatility of the vagus. *Physiol Behav* 97, 531-536.
- Dockray, G.J. (2012). Cholecystokinin. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 19, 8-12.
- Dockray, G.J. (2013). Enteroendocrine cell signalling via the vagus nerve. *Curr Opin Pharmacol* 13, 954-958.

- Dockray, G.J. (2014). Gastrointestinal hormones and the dialogue between gut and brain. *J Physiol* 592, 2927-2941.
- Dockray, G.J., and Burdyga, G. (2011). Plasticity in vagal afferent neurones during feeding and fasting: mechanisms and significance. *Acta Physiol (Oxf)* 201, 313-321.
- Dong, L., Zhong, X., Ahmad, H., Li, W., Wang, Y., Zhang, L., and Wang, T. (2014a). Intrauterine Growth Restriction Impairs Small Intestinal Mucosal Immunity in Neonatal Piglets. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 62, 510-518.
- Dong, L., Zhong, X., Ahmad, H., Li, W., Wang, Y., Zhang, L., and Wang, T. (2014b). Intrauterine Growth Restriction Impairs Small Intestinal Mucosal Immunity in Neonatal Piglets. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 62, 510-518.
- Drozdowski, L.A., Clandinin, T., and Thomson, A.B.R. (2010). Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 16, 787-799.
- Drucker, D.J. (2016). Evolving Concepts and Translational Relevance of Enteroendocrine Cell Biology. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101, 778-786.
- Drucker, D.J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W.L., and Habener, J.F. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 3434-3438.
- Duca, F.A., Zhong, L., and Covasa, M. (2013). Reduced CCK signaling in obese-prone rats fed a high fat diet. *Hormones and behavior* 64, 812-817.

-E-

- Edfalk, S., Steneberg, P., and Edlund, H. (2008). Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* 57, 2280-2287.
- Edwards, L.J., and McMillen, I.C. (2002). Periconceptional nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R669-679.
- Egerod, K.L., Engelstoft, M.S., Grunddal, K.V., Nohr, M.K., Secher, A., Sakata, I., Pedersen, J., Windelov, J.A., Fuchtbauer, E.M., Olsen, J., *et al.* (2012). A major lineage of enteroendocrine cells coexpress CCK, secretin, GIP, GLP-1, PYY, and neurotensin but not somatostatin. *Endocrinology* 153, 5782-5795.
- Eissele, R., Goke, R., Willemer, S., Harthus, H.P., Vermeer, H., Arnold, R., and Goke, B. (1992). Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European journal of clinical investigation* 22, 283-291.
- El-Salhy, M., and Gilja, O.H. (2017). Abnormalities in ileal stem, neurogenin 3, and enteroendocrine cells in patients with irritable bowel syndrome. *BMC gastroenterology* 17, 90.
- El-Salhy, M., and Gundersen, D. (2015). Diet in irritable bowel syndrome. *Nutrition journal* 14, 36.

- El-Salhy, M., Gundersen, D., Gilja, O.H., Hatlebakk, J.G., and Hausken, T. (2014). Is irritable bowel syndrome an organic disorder? *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20, 384-400.
- El-Salhy, M., Gundersen, D., Ostgaard, H., Lomholt-Beck, B., Hatlebakk, J.G., and Hausken, T. (2012). Low densities of serotonin and peptide YY cells in the colon of patients with irritable bowel syndrome. *Digestive diseases and sciences* 57, 873-878.
- El-Salhy, M., Hausken, T., Gilja, O.H., and Hatlebakk, J.G. (2017). The possible role of gastrointestinal endocrine cells in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Expert review of gastroenterology & hepatology* 11, 139-148.
- El-Salhy, M., Vaali, K., Dizdar, V., and Hausken, T. (2010). Abnormal small-intestinal endocrine cells in patients with irritable bowel syndrome. *Digestive diseases and sciences* 55, 3508-3513.
- El-Salhy, M., Wendelbo, I.H., and Gundersen, D. (2013). Reduced chromogranin A cell density in the ileum of patients with irritable bowel syndrome. *Molecular medicine reports* 7, 1241-1244.
- Ellacott, K.L., and Cone, R.D. (2004). The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent progress in hormone research* 59, 395-408.
- Elliott, R.M., Morgan, L.M., Tredger, J.A., Deacon, S., Wright, J., and Marks, V. (1993). Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *The Journal of endocrinology* 138, 159-166.
- Emanuela, F., Grazia, M., Marco de, R., Maria Paola, L., Giorgio, F., and Marco, B. (2012). Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2012, 476380.
- Emond, M., Ladenheim, E.E., Schwartz, G.J., and Moran, T.H. (2001). Leptin amplifies the feeding inhibition and neural activation arising from a gastric nutrient preload. *Physiol Behav* 72, 123-128.
- Engelstoft, M.S., Egerod, K.L., Lund, M.L., and Schwartz, T.W. (2013a). Enteroendocrine cell types revisited. *Current Opinion in Pharmacology* 13, 912-921.
- Engelstoft, M.S., Park, W.M., Sakata, I., Kristensen, L.V., Husted, A.S., Osborne-Lawrence, S., Piper, P.K., Walker, A.K., Pedersen, M.H., Nohr, M.K., *et al.* (2013b). Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. *Molecular metabolism* 2, 376-392.
- Ergaz, Z., Avgil, M., and Ornoy, A. (2005). Intrauterine growth restriction-etiology and consequences: what do we know about the human situation and experimental animal models? *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)* 20, 301-322.
- Eriksson, J.G. (2006). Early growth, and coronary heart disease and type 2 diabetes: experiences from the Helsinki Birth Cohort Studies. *Int J Obes (Lond)* 30 *Suppl* 4, S18-22.
- Eriksson, J.G. (2011). Early growth and coronary heart disease and type 2 diabetes: findings from the Helsinki Birth Cohort Study (HBCS). *Am J Clin Nutr* 94, 1799s-1802s.
- Eriksson, J.G., Forsen, T., Tuomilehto, J., Winter, P.D., Osmond, C., and Barker, D.J. (1999). Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *Bmj* 318, 427-431.

- Estienne, M., Claustre, J., Clain-Gardechaux, G., Paquet, A., Tache, Y., Fioramonti, J., and Plaisancie, P. (2010). Maternal deprivation alters epithelial secretory cell lineages in rat duodenum: role of CRF-related peptides. *Gut* 59, 744-751.
- Ezcurra, M., Reimann, F., Gribble, F.M., and Emery, E. (2013). Molecular mechanisms of incretin hormone secretion. *Curr Opin Pharmacol* 13, 922-927.

-F-

- Facer, P., Bishop, A.E., Lloyd, R.V., Wilson, B.S., Hennessy, R.J., and Polak, J.M. (1985). Chromogranin: a newly recognized marker for endocrine cells of the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 89, 1366-1373.
- Fakhry, J., Wang, J., Martins, P., Fothergill, L.J., Hunne, B., Prieur, P., Shulkes, A., Rehfeld, J.F., Callaghan, B., and Furness, J.B. (2017). Distribution and characterisation of CCK containing enteroendocrine cells of the mouse small and large intestine. *Cell and tissue research*.
- Fall, C.H., Vijayakumar, M., Barker, D.J., Osmond, C., and Duggleby, S. (1995). Weight in infancy and prevalence of coronary heart disease in adult life. *Bmj* 310, 17-19.
- Fanca-Berthon, P., Hoebler, C., Mouzet, E., David, A., and Michel, C. (2010). Intrauterine growth restriction not only modifies the cecocolonic microbiota in neonatal rats but also affects its activity in young adult rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51, 402-413.
- Fanca-Berthon, P., Michel, C., Pagniez, A., Rival, M., Van Seuningen, I., Darmaun, D., and Hoebler, C. (2009). Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. *Pediatr Res* 66, 47-52.
- Fatehullah, A., Tan, S.H., and Barker, N. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature cell biology* 18, 246-254.
- Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext*, L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, *et al.*, eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.).
- Fenton, T.R., Premji, S.S., Al-Wassia, H., and Sauve, R.S. (2014). Higher versus lower protein intake in formula-fed low birth weight infants. *The Cochrane database of systematic reviews*, Cd003959.
- Ferenc, K., Pietrzak, P., Godlewski, M.M., Piwowarski, J., Kiliarczyk, R., Guilloteau, P., and Zabielski, R. (2014). Intrauterine growth retarded piglet as a model for humans--studies on the perinatal development of the gut structure and function. *Reproductive biology* 14, 51-60.
- Ferenc, K., Pilzys, T., Skrzypek, T., Garbicz, D., Marcinkowski, M., Dylewska, M., Gladysz, P., Skorobogatov, O., Gajewski, Z., Grzesiuk, E., *et al.* (2017). Structure and Function of Enterocyte in Intrauterine Growth Retarded Pig Neonates. *Disease markers* 2017, 5238134.
- Fitzhardinge, P.M., and Steven, E.M. (1972). The small-for-date infant. I. Later growth patterns. *Pediatrics* 49, 671-681.
- Flanagan, D.E., Moore, V.M., Godsland, I.F., Cockington, R.A., Robinson, J.S., and Phillips, D.I. (2000). Fetal growth and the physiological control of glucose tolerance in adults: a minimal model analysis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 278, E700-706.

- Flores, O., Perez, H., Valladares, L., Morgan, C., Gatica, A., Burgos, H., Olivares, R., and Hernandez, A. (2011). Hidden prenatal malnutrition in the rat: role of beta(1)-adrenoceptors on synaptic plasticity in the frontal cortex. *Journal of neurochemistry* *119*, 314-323.
- Foltz, M., Ansems, P., Schwarz, J., Tasker, M.C., Loubakos, A., and Gerhardt, C.C. (2008). Protein hydrolysates induce CCK release from enteroendocrine cells and act as partial agonists of the CCK1 receptor. *Journal of agricultural and food chemistry* *56*, 837-843.
- Forsen, T., Eriksson, J., Tuomilehto, J., Reunanen, A., Osmond, C., and Barker, D. (2000). The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Annals of internal medicine* *133*, 176-182.
- Fothergill, L.J., Callaghan, B., Hunne, B., Bravo, D.M., and Furness, J.B. (2017). Costorage of Enteroendocrine Hormones Evaluated at the Cell and Subcellular Levels in Male Mice. *Endocrinology* *158*, 2113-2123.
- Fowden, A.L., and Forhead, A.J. (2004). Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction (Cambridge, England)* *127*, 515-526.
- Franco, R., Pacheco, R., Lluís, C., Ahern, G.P., and O'Connell, P.J. (2007). The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends in immunology* *28*, 400-407.
- Fujita, Y., Wideman, R.D., Speck, M., Asadi, A., King, D.S., Webber, T.D., Haneda, M., and Kieffer, T.J. (2009). Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *296*, E473-479.
- Fung, C.M., White, J.R., Brown, A.S., Gong, H., Weitkamp, J.H., Frey, M.R., and McElroy, S.J. (2016). Intrauterine Growth Restriction Alters Mouse Intestinal Architecture during Development. *PLoS One* *11*, e0146542.
- Furness, J.B. (2016). Integrated Neural and Endocrine Control of Gastrointestinal Function. *Advances in experimental medicine and biology* *891*, 159-173.
- Furness, J.B., Callaghan, B.P., Rivera, L.R., and Cho, H.J. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Advances in experimental medicine and biology* *817*, 39-71.
- Furness, J.B., and Costa, M. (1980). Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* *5*, 1-20.
- Furness, J.B., Rivera, L.R., Cho, H.J., Bravo, D.M., and Callaghan, B. (2013). The gut as a sensory organ. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *10*, 729-740.

-G-

- Gaccioli, F., and Lager, S. (2016). Placental Nutrient Transport and Intrauterine Growth Restriction. *Frontiers in Physiology* *7*.
- Gareau, M.G., Jury, J., MacQueen, G., Sherman, P.M., and Perdue, M.H. (2007). Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut* *56*, 1522-1528.
- Garofano, A., Czernichow, P., and Breant, B. (1997). In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* *40*, 1231-1234.

- Geerling, J.C., Shin, J.W., Chiment, P.C., and Loewy, A.D. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *The Journal of comparative neurology* 518, 1460-1499.
- Gershon, M.D. (2004). Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther* 20 Suppl 7, 3-14.
- Gershon, M.D. (2005). Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *Journal of clinical gastroenterology* 39, S184-193.
- Gibbs, J., Young, R.C., and Smith, G.P. (1973). Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature* 245, 323-325.
- Gorboulev, V., Schurmann, A., Vallon, V., Kipp, H., Jaschke, A., Klessen, D., Friedrich, A., Scherneck, S., Rieg, T., Cunard, R., *et al.* (2012). Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes* 61, 187-196.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and Guillemot, F. (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1607-1611.
- Green, A.S., Rozance, P.J., and Limesand, S.W. (2010). Consequences of a Compromised Intrauterine Environment on Islet Function. *The Journal of endocrinology* 205, 211-224.
- Greenfield, J.R., Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Henning, E., Habib, A.M., Blackwood, A., Reimann, F., Holst, J.J., and Gribble, F.M. (2009). Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* 89, 106-113.
- Gremlich, S., Porret, A., Hani, E.H., Cherif, D., Vionnet, N., Froguel, P., and Thorens, B. (1995). Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. *Diabetes* 44, 1202-1208.
- Gribble, F.M., Williams, L., Simpson, A.K., and Reimann, F. (2003). A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes* 52, 1147-1154.
- Grill, H.J., and Kaplan, J.M. (2002). The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Frontiers in neuroendocrinology* 23, 2-40.
- Grill, H.J., and Norgren, R. (1978). Chronically decerebrate rats demonstrate satiation but not bait shyness. *Science* 201, 267-269.
- Groschwitz, K.R., and Hogan, S.P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 124, 3-20; quiz 21-22.
- Grosse, J., Heffron, H., Burling, K., Akhter Hossain, M., Habib, A.M., Rogers, G.J., Richards, P., Larder, R., Rimmington, D., Adriaenssens, A.A., *et al.* (2014). Insulin-like peptide 5 is an orexigenic gastrointestinal hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 11133-11138.
- Grundy, D., Al-Chaer, E.D., Aziz, Q., Collins, S.M., Ke, M., Tache, Y., and Wood, J.D. (2006). Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* 130, 1391-1411.
- Gunawardene, A.R., Corfe, B.M., and Staton, C.A. (2011). Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *International Journal of Experimental Pathology* 92, 219-231.

- Gunzel, D., and Yu, A.S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 93, 525-569.
- Gutbrod, T., Wolke, D., Soehne, B., Ohrt, B., and Riegel, K. (2000). Effects of gestation and birth weight on the growth and. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition* 82, F208-214.
- Gutierrez-Aguilar, R., and Woods, S.C. (2011). Nutrition and L and K-enteroendocrine cells. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 18.

-H-

- Habib, A.M., Richards, P., Cairns, L.S., Rogers, G.J., Bannon, C.A., Parker, H.E., Morley, T.C., Yeo, G.S., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2012). Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology* 153, 3054-3065.
- Habib, A.M., Richards, P., Rogers, G.J., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2013). Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells. *Diabetologia* 56, 1413-1416.
- Hack, M., and Breslau, N. (1986). Very low birth weight infants: effects of brain growth during infancy on intelligence quotient at 3 years of age. *Pediatrics* 77, 196-202.
- Hagan, M.M., Rushing, P.A., Pritchard, L.M., Schwartz, M.W., Strack, A.M., Van Der Ploeg, L.H., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2000). Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R47-52.
- Haid, D., Widmayer, P., and Breer, H. (2011). Nutrient sensing receptors in gastric endocrine cells. *Journal of molecular histology* 42, 355-364.
- Hales, C.N., and Barker, D.J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595-601.
- Hales, C.N., Barker, D.J., Clark, P.M., Cox, L.J., Fall, C., Osmond, C., and Winter, P.D. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303, 1019-1022.
- Hales, C.N., and Ozanne, S.E. (2003). For debate: Fetal and early postnatal growth restriction lead to diabetes, the metabolic syndrome and renal failure. *Diabetologia* 46, 1013-1019.
- Hand, K.V., Giblin, L., and Green, B.D. (2009). Acute and chronic effects of the n-3 fatty acid DHA on cholecystokinin (CCK) secretion, storage and metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society* 68.
- Hansen, K.B., Rosenkilde, M.M., Knop, F.K., Wellner, N., Diep, T.A., Rehfeld, J.F., Andersen, U.B., Holst, J.J., and Hansen, H.S. (2011). 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96, E1409-1417.
- Hansen, L., Lampert, S., Mineo, H., and Holst, J.J. (2004). Neural regulation of glucagon-like peptide-1 secretion in pigs. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 287, E939-947.

- Hara, T., Hirasawa, A., Ichimura, A., Kimura, I., and Tsujimoto, G. (2011). Free fatty acid receptors FFAR1 and GPR120 as novel therapeutic targets for metabolic disorders. *Journal of pharmaceutical sciences* *100*, 3594-3601.
- Harden, C.J., Jones, A.N., Maya-Jimenez, T., Barker, M.E., Hepburn, N.J., Garaiova, I., Plummer, S.F., and Corfe, B.M. (2012). Effect of different long-chain fatty acids on cholecystokinin release in vitro and energy intake in free-living healthy males. *Br J Nutr* *108*, 755-758.
- Havel, P.J. (2001). Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* *226*, 963-977.
- Heanue, T.A., and Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nature reviews Neuroscience* *8*, 466-479.
- Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., Slagboom, P.E., and Lumey, L.H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 17046-17049.
- Heird, W.C. (1999). The importance of early nutritional management of low-birthweight infants. *Pediatrics in review* *20*, e43-44.
- Helander, H.F., and Fandriks, L. (2012). The enteroendocrine "letter cells" - time for a new nomenclature? *Scandinavian journal of gastroenterology* *47*, 3-12.
- Helander, H.F., and Fandriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract - revisited. *Scandinavian journal of gastroenterology* *49*, 681-689.
- Hendrix, N., and Berghella, V. (2008). Non-placental causes of intrauterine growth restriction. *Seminars in perinatology* *32*, 161-165.
- Hetherington, A.W., and Ranson, S.W. (1983). Hypothalam1c Lesions And Adiposity In The Rat. *Nutrition Reviews* *41*, 124-127.
- Hill, M.E., Asa, S.L., and Drucker, D.J. (1999). Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* *13*, 1474-1486.
- Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., and Tsujimoto, G. (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature medicine* *11*, 90-94.
- Hofer, D., Asan, E., and Drenckhahn, D. (1999). Chemosensory Perception in the Gut. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* *14*, 18-23.
- Hokken-Koelega, A.C., De Ridder, M.A., Lemmen, R.J., Den Hartog, H., De Muinck Keizer-Schrama, S.M., and Drop, S.L. (1995). Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res* *38*, 267-271.
- Holst, J.J., Knop, F.K., Vilsbøll, T., Krarup, T., and Madsbad, S. (2011). Loss of Incretin Effect Is a Specific, Important, and Early Characteristic of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* *34*, S251-257.

- Huang, S.T., Vo, K.C., Lyell, D.J., Faessen, G.H., Tulac, S., Tibshirani, R., Giaccia, A.J., and Giudice, L.C. (2004). Developmental response to hypoxia. *Faseb j* 18, 1348-1365.

-I-

- Igarashi, M., DiPatrizio, N.V., Narayanaswami, V., and Piomelli, D. (2015). Feeding-induced oleoylethanolamide mobilization is disrupted in the gut of diet-induced obese rodents. *Biochimica et biophysica acta* 1851, 1218-1226.
- Innis, S.M., Dai, C., Wu, X., Buchan, A.M., and Jacobson, K. (2010). Perinatal lipid nutrition alters early intestinal development and programs the response to experimental colitis in young adult rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G1376-1385.

-J-

- Jahng, J., and Kim, Y.S. (2016). Irritable Bowel Syndrome: Is It Really a Functional Disorder? A New Perspective on Alteration of Enteric Nervous System. *Journal of neurogastroenterology and motility* 22, 163-165.
- Jang, H.J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M.J., Carlson, O.D., Kim, B.J., Zhou, J., Kim, H.H., Xu, X., Chan, S.L., Juhaszova, M., *et al.* (2007). Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15069-15074.
- Janot, M., Cortes-Dubly, M.L., Rodriguez, S., and Huynh-Do, U. (2014). Bilateral uterine vessel ligation as a model of intrauterine growth restriction in mice. *Reprod Biol Endocrinol* 12, 62.
- Jansson, N., Pettersson, J., Haafiz, A., Ericsson, A., Palmberg, I., Tranberg, M., Ganapathy, V., Powell, T.L., and Jansson, T. (2006). Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J Physiol* 576, 935-946.
- Jansson, T., and Powell, T.L. (2013). Role of placental nutrient sensing in developmental programming. *Clinical obstetrics and gynecology* 56, 591-601.
- Jaquet, D., Leger, J., Levy-Marchal, C., Oury, J.F., and Czernichow, P. (1998). Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83, 1243-1246.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355-358.
- Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Kedinger, M., and Gradwohl, G. (2002). Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *The EMBO journal* 21, 6338-6347.
- Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O.D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nature genetics* 24, 36-44.

- Jones, C.T., Lafeber, H.N., and Roebuck, M.M. (1984). Studies on the growth of the fetal guinea pig. Changes in plasma hormone concentration during normal and abnormal growth. *Journal of developmental physiology* 6, 461-472.
- Joss-Moore, L.A., and Lane, R.H. (2009). The developmental origins of adult disease. *Current opinion in pediatrics* 21, 230-234.
- Jung, K.B., Lee, H., Son, Y.S., Lee, J.H., Cho, H.S., Lee, M.O., Oh, J.H., Lee, J., Kim, S., Jung, C.R., *et al.* (2017). In vitro and in vivo imaging and tracking of intestinal organoids from human-induced pluripotent stem cells. *Faseb j.*

-K-

- Kaji, I., and Kaunitz, J.D. (2017). Luminal chemosensing in the gastroduodenal mucosa. *Current opinion in gastroenterology.*
- Kalra, S.P., Dube, M.G., Sahu, A., Phelps, C.P., and Kalra, P.S. (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10931-10935.
- Kampmann, K., Ueberberg, S., Menge, B.A., Breuer, T.G., Uhl, W., Tannapfel, A., and Meier, J.J. (2016). Abundance and turnover of GLP-1 producing L-cells in ileal mucosa are not different in patients with and without type 2 diabetes. *Metabolism: clinical and experimental* 65, 84-91.
- Kazafeos, K. (2011). Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes research and clinical practice* 93 Suppl 1, S32-36.
- Kelishadi, R., Haghdoost, A.A., Jamshidi, F., Aliramezany, M., and Moosazadeh, M. (2015). Low birthweight or rapid catch-up growth: which is more associated with cardiovascular disease and its risk factors in later life? A systematic review and cryptanalysis. *Paediatrics and international child health* 35, 110-123.
- Kellett, G.L., and Helliwell, P.A. (2000). The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *The Biochemical journal* 350 Pt 1, 155-162.
- Kelly, P., Menzies, I., Crane, R., Zulu, I., Nickols, C., Feakins, R., Mwansa, J., Mudenda, V., Katubulushi, M., Greenwald, S., *et al.* (2004). Responses of small intestinal architecture and function over time to environmental factors in a tropical population. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70, 412-419.
- Kind, K.L., Clifton, P.M., Grant, P.A., Owens, P.C., Sohlstrom, A., Roberts, C.T., Robinson, J.S., and Owens, J.A. (2003). Effect of maternal feed restriction during pregnancy on glucose tolerance in the adult guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R140-152.
- Kirchner, H., Tong, J., Tschop, M.H., and Pfluger, P.T. (2010). Ghrelin and PYY in the regulation of energy balance and metabolism: lessons from mouse mutants. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 298, E909-919.
- Kishi, T., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Mountjoy, K.G., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *The Journal of comparative neurology* 457, 213-235.

- Kishida, K., Pearce, S.C., Yu, S., Gao, N., and Ferraris, R.P. (2017). Nutrient sensing by absorptive and secretory progenies of small intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 312, G592-g605.
- Kissileff, H.R., Carretta, J.C., Geliebter, A., and Pi-Sunyer, F.X. (2003). Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R992-998.
- Knapper, J.M., Heath, A., Fletcher, J.M., Morgan, L.M., and Marks, V. (1995). GIP and GLP-1(7-36)amide secretion in response to intraduodenal infusions of nutrients in pigs. *Comparative biochemistry and physiology Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology* 111, 445-450.
- Koda, S., Date, Y., Murakami, N., Shimbara, T., Hanada, T., Toshinai, K., Niijima, A., Furuya, M., Inomata, N., Osuye, K., *et al.* (2005). The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology* 146, 2369-2375.
- Kohan, A.B., Wang, F., Lo, C.M., Liu, M., and Tso, P. (2015). ApoA-IV: current and emerging roles in intestinal lipid metabolism, glucose homeostasis, and satiety. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 308, G472-481.
- Kojima, I., and Nakagawa, Y. (2011). The Role of the Sweet Taste Receptor in Enteroendocrine Cells and Pancreatic β -Cells. *Diabetes & Metabolism Journal* 35, 451-457.
- Koletzko, B., Brands, B., Grote, V., Kirchberg, F.F., Prell, C., Rzehak, P., Uhl, O., and Weber, M. (2017). Long-Term Health Impact of Early Nutrition: The Power of Programming. *Ann Nutr Metab* 70, 161-169.
- Koletzko, B., Schiess, S., Brands, B., Haile, G., Demmelmair, H., von Kries, R., and Grote, V. (2010). [Infant feeding practice and later obesity risk. Indications for early metabolic programming]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 53, 666-673.
- Kunze, W.A., Bornstein, J.C., and Furness, J.B. (1995). Identification of sensory nerve cells in a peripheral organ (the intestine) of a mammal. *Neuroscience* 66, 1-4.

-L-

- Laffitte, A., Neiers, F., and Briand, L. (2014). Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 17, 379-385.
- Lager, S., and Powell, T.L. (2012). Regulation of nutrient transport across the placenta. *Journal of pregnancy* 2012, 179827.
- Lakhan, S.E., and Kirchgessner, A. (2010). Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. *Journal of Neuroinflammation* 7, 37.
- Langley-Evans, S.C. (2009). Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. *Journal of anatomy* 215, 36-51.
- Langley, S.C., and Jackson, A.A. (1994). Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* 86, 217-222; discussion 121.
- Lapillonne, A., Razafimahefa, H., Rigourd, V., and Granier, M. (2011). La nutrition du prématuré. *Archives de Pédiatrie* 18, 313-323.

- Lapillonne, A., and Salle, B.L. (1996). [Nutrition in the neonatal period]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 3 *Suppl 1*, 189s-190s.
- Laque, A., Yu, S., Qualls-Creekmore, E., Gettys, S., Schwartzburg, C., Bui, K., Rhodes, C., Berthoud, H.R., Morrison, C.D., Richards, B.K., *et al.* (2015). Leptin modulates nutrient reward via inhibitory galanin action on orexin neurons. *Molecular metabolism* 4, 706-717.
- Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessar, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J Clin Invest* 121, 3412-3424.
- Larsson, L.I., St-Onge, L., Hougaard, D.M., Sosa-Pineda, B., and Gruss, P. (1998). Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development. *Mechanisms of development* 79, 153-159.
- Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2016). Enteroendocrine Cells: A Review of Their Role In Brain-Gut Communication. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 28, 620-630.
- Lauffer, L.M., Iakoubov, R., and Brubaker, P.L. (2009). GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* 58, 1058-1066.
- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.Y., Lannoy, V., Decobecq, M.E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van Damme, J., *et al.* (2003). Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *The Journal of biological chemistry* 278, 25481-25489.
- Lee, H.M., Wang, G., Englander, E.W., Kojima, M., and Greeley, G.H., Jr. (2002). Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143, 185-190.
- Lee, S.H. (2015). Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal research* 13, 11-18.
- Li, H.J., Kapoor, A., Giel-Moloney, M., Rindi, G., and Leiter, A.B. (2012). Notch signaling differentially regulates the cell fate of early endocrine precursor cells and their maturing descendants in the mouse pancreas and intestine. *Dev Biol* 371, 156-169.
- Li, H.J., Ray, S.K., Singh, N.K., Johnston, B., and Leiter, A.B. (2011). Basic helix loop helix transcription factors and enteroendocrine cell differentiation. *Diabetes, obesity & metabolism* 13, 5-12.
- Li, Y., Hao, Y., and Owyang, C. (1997). High-affinity CCK-A receptors on the vagus nerve mediate CCK-stimulated pancreatic secretion in rats. *Am J Physiol* 273, G679-685.
- Lie, S., Morrison, J.L., Williams-Wyss, O., Suter, C.M., Humphreys, D.T., Ozanne, S.E., Zhang, S., Maclaughlin, S.M., Kleemann, D.O., Walker, S.K., *et al.* (2014). Periconceptional undernutrition programs changes in insulin-signaling molecules and microRNAs in skeletal muscle in singleton and twin fetal sheep. *Biology of reproduction* 90, 5.
- Liou, A.P., Lu, X., Sei, Y., Zhao, X., Pechhold, S., Carrero, R.J., Raybould, H.E., and Wank, S. (2011a). The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology* 140, 903-912.
- Liou, A.P., Sei, Y., Zhao, X., Feng, J., Lu, X., Thomas, C., Pechhold, S., Raybould, H.E., and Wank, S.A. (2011b). The extracellular calcium-sensing receptor is required for cholecystokinin

secretion in response to L-phenylalanine in acutely isolated intestinal I cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G538-546.

- Lira, L.A., Almeida, L.C., da Silva, A.A., Cavalcante, T.C., de Melo, D.D., de Souza, J.A., Campina, R.C., and de Souza, S.L. (2014). Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 38, 23-29.
- Little, T.J., Isaacs, N.J., Young, R.L., Ott, R., Nguyen, N.Q., Rayner, C.K., Horowitz, M., and Feinle-Bisset, C. (2014). Characterization of duodenal expression and localization of fatty acid-sensing receptors in humans: relationships with body mass index. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307, G958-967.
- Lodygensky, G.A., Seghier, M.L., Warfield, S.K., Tolsa, C.B., Sizonenko, S., Lazeyras, F., and Huppi, P.S. (2008). Intrauterine growth restriction affects the preterm infant's hippocampus. *Pediatr Res* 63, 438-443.
- Longo, S., Bollani, L., Decembrino, L., Di Comite, A., Angelini, M., and Stronati, M. (2013). Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR). *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 26, 222-225.
- Lu, Z., Ding, L., Lu, Q., and Chen, Y.H. (2013). Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue barriers* 1, e24978.
- Lubchenco, L.O., Hansman, C., and Boyd, E. (1966). Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. *Pediatrics* 37, 403-408.
- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation symposium* 156, 38-50; discussion 50-35.
- Lucas, A. (1998). Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr* 128, 401s-406s.
- Lucas, A., Morley, R., Cole, T.J., Gore, S.M., Lucas, P.J., Crowle, P., Pearce, R., Boon, A.J., and Powell, R. (1990). Early diet in preterm babies and developmental status at 18 months. *Lancet (London, England)* 335, 1477-1481.
- Lundgren, E.M., Cnattingius, S., Jonsson, B., and Tuvemo, T. (2001). Intellectual and psychological performance in males born small for gestational age with and without catch-up growth. *Pediatr Res* 50, 91-96.
- Luque, V., Closa-Monasterolo, R., Escribano, J., and Ferré, N. (2015). Early Programming by Protein Intake: The Effect of Protein on Adiposity Development and the Growth and Functionality of Vital Organs. *Nutrition and Metabolic Insights* 8, 49-56.
- Lytle, L.D., and Campbell, B.A. (1975). Effects of lateral hypothalamic lesions on consummatory behavior in developing rats. *Physiol Behav* 15, 323-331.
- Ma, J., Bellon, M., Wishart, J.M., Young, R., Blackshaw, L.A., Jones, K.L., Horowitz, M., and Rayner, C.K. (2009). Effect of the artificial sweetener, sucralose, on gastric emptying and incretin hormone release in healthy subjects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G735-739.

-M-

- Mace, O.J., Schindler, M., and Patel, S. (2012). The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *J Physiol* 590, 2917-2936.
- MacIntosh, C.G., Andrews, J.M., Jones, K.L., Wishart, J.M., Morris, H.A., Jansen, J.B., Morley, J.E., Horowitz, M., and Chapman, I.M. (1999). Effects of age on concentrations of plasma cholecystokinin, glucagon-like peptide 1, and peptide YY and their relation to appetite and pyloric motility. *Am J Clin Nutr* 69, 999-1006.
- Mahata, S.K., Mahapatra, N.R., Mahata, M., and O'Connor, D.T. (2002). Neuroendocrine cell type-specific and inducible expression of chromogranin/secretogranin genes: crucial promoter motifs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 971, 27-38.
- Mandruzzato, G., Antsaklis, A., Botet, F., Chervenak, F.A., Figueras, F., Grunebaum, A., Puerto, B., Skupski, D., and Stanojevic, M. (2008). Intrauterine restriction (IUGR). *J Perinat Med* 36, 277-281.
- March, M.I., Gupta, M., Modest, A.M., Wu, L., Hacker, M.R., Martin, C.R., and Rana, S. (2014). Maternal risk factors for neonatal necrotizing enterocolitis. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*, 1-6.
- Margolis, K.G., and Gershon, M.D. (2016). Enteric Neuronal Regulation of Intestinal Inflammation. *Trends Neurosci* 39, 614-624.
- Margolskee, R.F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K.S., Ilegems, E., Daly, K., Maillet, E.L., Ninomiya, Y., Mosinger, B., and Shirazi-Beechey, S.P. (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15075-15080.
- Martin Agnoux, A., Alexandre-Gouabau, M.C., Le Drean, G., Antignac, J.P., and Parnet, P. (2014). Relative contribution of foetal and post-natal nutritional periods on feeding regulation in adult rats. *Acta Physiol (Oxf)* 210, 188-201.
- Martin, A.M., Lumsden, A.L., Young, R.L., Jessup, C.F., Spencer, N.J., and Keating, D.J. (2017). The nutrient-sensing repertoires of mouse enterochromaffin cells differ between duodenum and colon. *Neurogastroenterol Motil* 29.
- Martin, C., Passilly-Degrace, P., Gaillard, D., Merlin, J.F., Chevrot, M., and Besnard, P. (2011). The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS One* 6, e24014.
- Martins, P., Fakhry, J., de Oliveira, E.C., Hunne, B., Fothergill, L.J., Ringuet, M., Reis, D.D., Rehfeld, J.F., Callaghan, B., and Furness, J.B. (2017). Analysis of enteroendocrine cell populations in the human colon. *Cell and tissue research* 367, 161-168.
- Martins, S.R., Oliveira, R.B., and Ballejo, G. (2006). Activation of neural cholecystokinin-1 receptors induces relaxation of the isolated rat duodenum which is reduced by nitric oxide synthase inhibitors. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 39, 271-275.
- Matsumura, K., Miki, T., Jhomori, T., Gono, T., and Seino, S. (2005). Possible role of PEPT1 in gastrointestinal hormone secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1028-1032.

- Matzinger, D., Degen, L., Drewe, J., Meuli, J., Duebendorfer, R., Ruckstuhl, N., D'Amato, M., Rovati, L., and Beglinger, C. (2000). The role of long chain fatty acids in regulating food intake and cholecystokinin release in humans. *Gut* 46, 688-693.
- Mawe, G.M., and Gershon, M.D. (1989). Structure, afferent innervation, and transmitter content of ganglia of the guinea pig gallbladder: relationship to the enteric nervous system. *The Journal of comparative neurology* 283, 374-390.
- Mawe, G.M., and Hoffman, J.M. (2013). Serotonin Signaling in the Gastrointestinal Tract:: Functions, dysfunctions, and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 473-486.
- May, C.L., and Kaestner, K.H. (2010a). Gut endocrine cell development. *Mol Cell Endocrinol* 323, 70-75.
- May, C.L., and Kaestner, K.H. (2010b). Gut Endocrine Cell Development. *Molecular and cellular endocrinology* 323, 70-75.
- Mayer, E.A. (2011). Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nature reviews Neuroscience* 12, 453-466.
- Mazzawi, T., and El-Salhy, M. (2017). Changes in duodenal enteroendocrine cells in patients with irritable bowel syndrome following dietary guidance. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 242, 1355-1362.
- Mazzawi, T., Gundersen, D., Hausken, T., and El-Salhy, M. (2015). Increased chromogranin a cell density in the large intestine of patients with irritable bowel syndrome after receiving dietary guidance. *Gastroenterology research and practice* 2015, 823897.
- McConalogue, K., and Furness, J.B. (1994). Gastrointestinal neurotransmitters. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism* 8, 51-76.
- McKay, J.A., Groom, A., Potter, C., Coneyworth, L.J., Ford, D., Mathers, J.C., and Relton, C.L. (2012). Genetic and non-genetic influences during pregnancy on infant global and site specific DNA methylation: role for folate gene variants and vitamin B12. *PLoS One* 7, e33290.
- McLaughlin, J., Lucà, M.G., Jones, M.N., D'Amato, M., Dockray, G.J., and Thompson, D.G. (1999). Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility. *Gastroenterology* 116, 46-53.
- McLaughlin, J.T., Lomax, R.B., Hall, L., Dockray, G.J., Thompson, D.G., and Warhurst, G. (1998). Fatty acids stimulate cholecystokinin secretion via an acyl chain length-specific, Ca²⁺-dependent mechanism in the enteroendocrine cell line STC-1. *The Journal of Physiology* 513, 11-18.
- Meurette, G., Blanchard, C., Duchalais-Dassonneville, E., Coquenlorge, S., Aubert, P., Wong, M., Lehur, P.A., and Neunlist, M. (2012). Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model. *Neurogastroenterol Motil* 24, 267-273, e110.
- Mickiewicz, M., Zabielski, R., Grenier, B., Le Normand, L., Savary, G., Holst, J.J., Oswald, I.P., Metges, C.C., and Guilloteau, P. (2012). Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 63, 225-239.
- Millington, G.W.M. (2007). The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutrition & Metabolism* 4, 18.
- Monteiro, R., and Azevedo, I. (2010). Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediators of Inflammation* 2010.

- Moran-Ramos, S., Tovar, A.R., and Torres, N. (2012). Diet: friend or foe of enteroendocrine cells--how it interacts with enteroendocrine cells. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)* 3, 8-20.
- Moran, G.W., and Leslie, F.C. (2008). Enteroendocrine Cells: Neglected Players in Gastrointestinal. *1*, 51-60.
- Moran, G.W., Leslie, F.C., Levison, S.E., Worthington, J., and McLaughlin, J.T. (2008). Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders? *Therapeutic advances in gastroenterology* 1, 51-60.
- Moran, T.H., Katz, L.F., Plata-Salaman, C.R., and Schwartz, G.J. (1998). Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. *Am J Physiol* 274, R618-625.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., and Cone, R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 8, 1298-1308.
- Mutoh, H., Fung, B.P., Naya, F.J., Tsai, M.J., Nishitani, J., and Leiter, A.B. (1997a). The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3560-3564.
- Mutoh, H., Fung, B.P., Naya, F.J., Tsai, M.J., Nishitani, J., and Leiter, A.B. (1997b). The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3560-3564.
- Mutoh, H., Naya, F.J., Tsai, M.J., and Leiter, A.B. (1998). The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes & development* 12, 820-830.
- Muurahainen, N., Kissileff, H.R., Derogatis, A.J., and Pi-Sunyer, F.X. (1988). Effects of cholecystokinin-octapeptide (CCK-8) on food intake and gastric emptying in man. *Physiol Behav* 44, 645-649.
- Myers, M.G., Cowley, M.A., and Munzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70, 537-556.

-N-

- Nagatake, T., Fujita, H., Minato, N., and Hamazaki, Y. (2014). Enteroendocrine cells are specifically marked by cell surface expression of claudin-4 in mouse small intestine. *PLoS One* 9, e90638.
- Nassir, F., Wilson, B., Han, X., Gross, R.W., and Abumrad, N.A. (2007). CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *The Journal of biological chemistry* 282, 19493-19501.
- Natali, M.R., and Miranda-Neto, M.H. (1996). Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. *Arquivos de neuro-psiquiatria* 54, 273-279.

- Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., and Tsai, M.J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes & development* *11*, 2323-2334.
- Nectow, A.R., Schneeberger, M., Zhang, H., Field, B.C., Renier, N., Azevedo, E., Patel, B., Liang, Y., Mitra, S., Tessier-Lavigne, M., *et al.* (2017). Identification of a Brainstem Circuit Controlling Feeding. *Cell* *170*, 429-442.e411.
- Nemoz-Gaillard, E., Bernard, C., Abello, J., Cordier-Bussat, M., Chayvialle, J.A., and Cuber, J.C. (1998). Regulation of cholecystokinin secretion by peptones and peptidomimetic antibiotics in STC-1 cells. *Endocrinology* *139*, 932-938.
- Neunlist, M., and Schemann, M. (2014). Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system. *J Physiol* *592*, 2959-2965.
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahe, M.M., Derkinderen, P., des Varannes, S.B., and Rolli-Derkinderen, M. (2013). The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *10*, 90-100.
- Niederau, C., Meereis-Schwanke, K., Klonowski-Stumpe, H., and Herberg, L. (1997). CCK-resistance in Zucker obese versus lean rats. *Regul Pept* *70*, 97-104.
- Noah, T.K., Donahue, B., and Shroyer, N.F. (2011). Intestinal development and differentiation. *Experimental cell research* *317*, 2702-2710.
- Nohr, M.K., Pedersen, M.H., Gille, A., Egerod, K.L., Engelstoft, M.S., Husted, A.S., Sichlau, R.M., Grunddal, K.V., Poulsen, S.S., Han, S., *et al.* (2013). GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology* *154*, 3552-3564.
- Nomura, M., and Kawahara, Y. (2015). [Role of the sweet taste receptor in glucose metabolism: no sweets for diabetes?]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* *135*, 763-767.
- Norlen, P., Curry, W.J., Bjorkqvist, M., Maule, A., Cunningham, R.T., Hogg, R.B., Harriott, P., Johnston, C.F., Hutton, J.C., and Hakanson, R. (2001). Cell-specific processing of chromogranin A in endocrine cells of the rat stomach. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* *49*, 9-18.
- Norton, M., and Murphy, K.G. (2017). Targeting gastrointestinal nutrient sensing mechanisms to treat obesity. *Curr Opin Pharmacol* *37*, 16-23.

-O-

- O'Connor, D.T., Burton, D., and Deftos, L.J. (1983). Chromogranin A: Immunohistology reveals its universal occurrence in normal polypeptide hormone producing endocrine glands. *Life Sciences* *33*, 1657-1663.
- Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L., and Wright, C.V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development (Cambridge, England)* *122*, 983-995.
- Orozco-Solis, R., Lopes de Souza, S., Barbosa Matos, R.J., Grit, I., Le Bloch, J., Nguyen, P., Manhaes de Castro, R., and Bolanos-Jimenez, F. (2009). Perinatal undernutrition-induced

obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav* 96, 481-492.

- Orozco-Solis, R., Matos, R.J., Guzman-Quevedo, O., Lopes de Souza, S., Bihouee, A., Houlgatte, R., Manhaes de Castro, R., and Bolanos-Jimenez, F. (2010). Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PLoS One* 5, e13537.
- Osmond, C., Barker, D.J., Winter, P.D., Fall, C.H., and Simmonds, S.J. (1993). Early growth and death from cardiovascular disease in women. *Bmj* 307, 1519-1524.
- Ozanne, S.E. (2001). Metabolic programming in animals. *Br Med Bull* 60, 143-152.
- Ozanne, S.E., and Hales, C.N. (2004). Lifespan: Catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 427, 411-412.
- Ozanne, S.E., Sandovici, I., and Constância, M. (2011). Maternal diet, aging and diabetes meet at a chromatin loop. *Aging (Albany NY)* 3, 548-554.
- Ozdener, M.H., Subramaniam, S., Sundaresan, S., Sery, O., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Besnard, P., Abumrad, N.A., and Khan, N.A. (2014). CD36- and GPR120-mediated Ca²⁺(+) signaling in human taste bud cells mediates differential responses to fatty acids and is altered in obese mice. *Gastroenterology* 146, 995-1005.

-P-

- Park, J.H., Stoffers, D.A., Nicholls, R.D., and Simmons, R.A. (2008). Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest* 118, 2316-2324.
- Parker, H.E., Adriaenssens, A., Rogers, G., Richards, P., Koepsell, H., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2012). Predominant role of active versus facilitative glucose transport for glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetologia* 55, 2445-2455.
- Parker, H.E., Habib, A.M., Rogers, G.J., Gribble, F.M., and Reimann, F. (2009). Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells. *Diabetologia* 52, 289-298.
- Pastrakuljic, A., Derewlany, L.O., Knie, B., and Koren, G. (2000). The effects of cocaine and nicotine on amino acid transport across the human placental cotyledon perfused in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 294, 141-146.
- Patel, C., Douard, V., Yu, S., Gao, N., and Ferraris, R.P. (2015a). Transport, metabolism, and endosomal trafficking-dependent regulation of intestinal fructose absorption. *Faseb j* 29, 4046-4058.
- Patel, C., Sugimoto, K., Douard, V., Shah, A., Inui, H., Yamanouchi, T., and Ferraris, R.P. (2015b). Effect of dietary fructose on portal and systemic serum fructose levels in rats and in KHK^{-/-} and GLUT5^{-/-} mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 309, G779-790.
- Patterson, L.M., Zheng, H., and Berthoud, H.R. (2002). Vagal afferents innervating the gastrointestinal tract and CCKA-receptor immunoreactivity. *Anat Rec* 266, 10-20.
- Penicaud, L., Larue-Achagiotis, C., and Le Magnen, J. (1983). Endocrine basis for weight gain after fasting or VMH lesion in rats. *Am J Physiol* 245, E246-252.

- Pepino, M.Y., Kuda, O., Samovski, D., and Abumrad, N.A. (2014). Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annual review of nutrition* 34, 281-303.
- Peters, J.H., Karpel, A.B., Ritter, R.C., and Simasko, S.M. (2004). Cooperative activation of cultured vagal afferent neurons by leptin and cholecystokinin. *Endocrinology* 145, 3652-3657.
- Phillips, D.I., Goulden, P., Syddall, H.E., Aihie Sayer, A., Dennison, E.M., Martin, H., and Cooper, C. (2005). Fetal and infant growth and glucose tolerance in the Hertfordshire Cohort Study: a study of men and women born between 1931 and 1939. *Diabetes* 54 Suppl 2, S145-150.
- Posovszky, C. (2017). Development and Anatomy of the Enteroendocrine System in Humans. *Endocrine development* 32, 20-37.
- Proulx, K., Richard, D., and Walker, C.D. (2002). Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology* 143, 4683-4692.
- Psichas, A., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2015a). Gut chemosensing mechanisms. *J Clin Invest* 125, 908-917.
- Psichas, A., Sleeth, M.L., Murphy, K.G., Brooks, L., Bewick, G.A., Hanyaloglu, A.C., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., and Frost, G. (2015b). The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int J Obes (Lond)* 39, 424-429.

-Q-

- Qi, Z., and Chen, Y.G. (2015). Regulation of intestinal stem cell fate specification. *Science China Life sciences* 58, 570-578.
- Qian, T., Zhang, R., Zhu, L., Shi, P., Yang, J., Yang, C.Y., Chen, D.M., Shi, J.Y., Zhou, X.G., Qiu, Y.P., *et al.* (2017). Necrotizing enterocolitis in low birth weight infants in China: Mortality risk factors expressed by birth weight categories. *Pediatrics and neonatology*.

-R-

- Raaijmakers, A., Jacobs, L., Rayyan, M., van Tienoven, T.P., Ortibus, E., Levtchenko, E., Staessen, J.A., and Allegaert, K. (2017). Catch-up growth in the first two years of life in Extremely Low Birth Weight (ELBW) infants is associated with lower body fat in young adolescence. *PLoS One* 12.
- Radlowski, E., Le Boedec, K., Zhang, X., Dilger, R., Johnson, R., and Lezmi, S. (2014). Development of the enteric nervous system and intestinal neuroendocrine systems in small for gestational age and average for gestational age piglets during the first month of life (1017.1). *The FASEB Journal* 28.
- Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307, 1904-1909.

- Rasoamanana, R., Darcel, N., Fromentin, G., and Tome, D. (2012). Nutrient sensing and signalling by the gut. *Proc Nutr Soc* *71*, 446-455.
- Ravelli, A.C., van der Meulen, J.H., Michels, R.P., Osmond, C., Barker, D.J., Hales, C.N., and Bleker, O.P. (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet (London, England)* *351*, 173-177.
- Ravelli, A.C., van Der Meulen, J.H., Osmond, C., Barker, D.J., and Bleker, O.P. (1999). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* *70*, 811-816.
- Ravelli, G.-P., Stein, Z.A., and Susser, M.W. (1976). Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. *New England Journal of Medicine* *295*, 349-353.
- Regev, R.H., and Reichman, B. (2004). Prematurity and intrauterine growth retardation--double jeopardy? *Clinics in perinatology* *31*, 453-473.
- Rehfeld, J.F. (2017a). Cholecystokinin—From Local Gut Hormone to Ubiquitous Messenger. *Frontiers in endocrinology* *8*.
- Rehfeld, J.F. (2017b). Cholecystokinin—From Local Gut Hormone to Ubiquitous Messenger. *Frontiers in endocrinology* *8*.
- Reimann, F., Habib, A.M., Tolhurst, G., Parker, H.E., Rogers, G.J., and Gribble, F.M. (2008). Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell metabolism* *8*, 532-539.
- Reimann, F., Tolhurst, G., and Gribble, F.M. (2012). G-protein-coupled receptors in intestinal chemosensation. *Cell metabolism* *15*, 421-431.
- Reimann, F., Williams, L., da Silva Xavier, G., Rutter, G.A., and Gribble, F.M. (2004). Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia* *47*, 1592-1601.
- Renner, E., Szabo-Meltzer, K.I., Puskas, N., Toth, Z.E., Dobolyi, A., and Palkovits, M. (2010). Activation of neurons in the hypothalamic dorsomedial nucleus via hypothalamic projections of the nucleus of the solitary tract following refeeding of fasted rats. *The European journal of neuroscience* *31*, 302-314.
- Richards, P., Parker, H.E., Adriaenssens, A.E., Hodgson, J.M., Cork, S.C., Trapp, S., Gribble, F.M., and Reimann, F. (2014). Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes* *63*, 1224-1233.
- Richardus, J.H., Graafmans, W.C., Verloove-Vanhorick, S.P., and Mackenbach, J.P. (2003). Differences in perinatal mortality and suboptimal care between 10 European regions: results of an international audit. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* *110*, 97-105.
- Rinaman, L., Baker, E.A., Hoffman, G.E., Stricker, E.M., and Verbalis, J.G. (1998). Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *Am J Physiol* *275*, R262-268.
- Rindi, G., Leiter, A.B., Kopin, A.S., Bordi, C., and Solcia, E. (2004). The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1014*, 1-12.
- Ritzel, U., Fromme, A., Otteleben, M., Leonhardt, U., and Ramadori, G. (1997). Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum. *Acta diabetologica* *34*, 18-21.
- Roder, P.V., Geillinger, K.E., Zietek, T.S., Thorens, B., Koepsell, H., and Daniel, H. (2014). The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One* *9*, e89977.

- Rodriguez-Hernandez, H., Simental-Mendia, L.E., Rodriguez-Ramirez, G., and Reyes-Romero, M.A. (2013). Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *International journal of endocrinology* 2013, 678159.
- Rogers, G.J., Tolhurst, G., Ramzan, A., Habib, A.M., Parker, H.E., Gribble, F.M., and Reimann, F. (2011). Electrical activity-triggered glucagon-like peptide-1 secretion from primary murine L-cells. *J Physiol* 589, 1081-1093.
- Rogers, R.C., and Hermann, G.E. (2008). Mechanisms of action of CCK to activate central vagal afferent terminals. *Peptides* 29, 1716-1725.
- Roseboom, T.J., van der Meulen, J.H., Ravelli, A.C., Osmond, C., Barker, D.J., and Bleker, O.P. (2001). Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 185, 93-98.
- Rosenberg, A. (2008). The IUGR newborn. *Seminars in perinatology* 32, 219-224.
- Rudovich, N.N., Nikiforova, V.J., Otto, B., Pivovarova, O., Gogebakan, O., Erban, A., Mohlig, M., Weickert, M.O., Spranger, J., Tschop, M.H., *et al.* (2011). Metabolomic linkage reveals functional interaction between glucose-dependent insulinotropic polypeptide and ghrelin in humans. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 301, E608-617.
- Rui, L. (2013). Brain Regulation of energy balance and body weights. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 14.
- Ryckman, K.K., Borowski, K.S., Parikh, N.I., and Saftlas, A.F. (2013). Pregnancy Complications and the Risk of Metabolic Syndrome for the Offspring. *Current cardiovascular risk reports* 7, 217-223.
- Rzehak, P., Oddy, W.H., Mearin, M.L., Grote, V., Mori, T.A., Szajewska, H., Shamir, R., Koletzko, S., Weber, M., Beilin, L.J., *et al.* (2017). Infant feeding and growth trajectory patterns in childhood and body composition in young adulthood. *Am J Clin Nutr* 106, 568-580.

-S-

- Sahu, A. (2003). Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Frontiers in neuroendocrinology* 24, 225-253.
- Sahu, A. (2004). Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 145, 2613-2620.
- Salam, R.A., Das, J.K., and Bhutta, Z.A. (2014). Impact of intrauterine growth restriction on long-term health. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 17, 249-254.
- Saleem, T., Sajjad, N., Fatima, S., Habib, N., Ali, S.R., and Qadir, M. (2011). Intrauterine growth retardation - small events, big consequences. *Italian Journal of Pediatrics* 37, 41.
- Sandhu, M.S., Luben, R., Day, N.E., and Khaw, K.T. (2002). Self-reported birth weight and subsequent risk of colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 11, 935-938.
- Sangild, P.T. (2006). Gut responses to enteral nutrition in preterm infants and animals. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 231, 1695-1711.

- Santer, R.M., and Conboy, V.B. (1990). Prenatal undernutrition permanently decreases enteric neuron number and sympathetic innervation of Auerbach's plexus in the rat. *Journal of anatomy* 168, 57-62.
- Sasselli, V., Pachnis, V., and Burns, A.J. (2012). The enteric nervous system. *Developmental Biology* 366, 64-73.
- Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G., Van Es, J.H., Van den Brink, S., Van Houdt, W.J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P.D., *et al.* (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762-1772.
- Saunders, P.R., Hanssen, N.P., and Perdue, M.H. (1997). Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol* 273, G486-490.
- Savastano, D.M., and Covasa, M. (2005). Adaptation to a high-fat diet leads to hyperphagia and diminished sensitivity to cholecystokinin in rats. *J Nutr* 135, 1953-1959.
- Sayegh, A.I., Covasa, M., and Ritter, R.C. (2004). Intestinal infusions of oleate and glucose activate distinct enteric neurons in the rat. *Auton Neurosci* 115, 54-63.
- Schemann, M., and Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1, 55-59.
- Schmitt, C.C., Aranas, T., Viel, T., Chateau, D., Le Gall, M., Waligora-Dupriet, A.J., Melchior, C., Rouxel, O., Kapel, N., Gourcerol, G., *et al.* (2017). Intestinal invalidation of the glucose transporter GLUT2 delays tissue distribution of glucose and reveals an unexpected role in gut homeostasis. *Molecular metabolism* 6, 61-72.
- Schneider, N., and Garcia-Rodenas, C.L. (2017). Early Nutritional Interventions for Brain and Cognitive Development in Preterm Infants: A Review of the Literature. *Nutrients* 9.
- Schoffen, J.P., Vicentini, F.A., Marcelino, C.G., Araujo, E.J., Pedrosa, M.M., and Natali, M.R. (2014). Food restriction beginning at lactation interferes with the cellular dynamics of the mucosa and colonic myenteric innervation in adult rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 86, 1833-1848.
- Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M., and Leiter, A.B. (2004a). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 145, 2639-2644.
- Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M., and Leiter, A.B. (2004b). Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types. *Dev Biol* 270, 443-454.
- Schwartz, G.J. (2006). Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 361, 1275-1280.
- Schwartz, G.J., Salorio, C.F., Skoglund, C., and Moran, T.H. (1999). Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression. *Am J Physiol* 276, R1623-1629.
- Schwartz, M.W., and Porte, D., Jr. (2005). Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307, 375-379.
- Sehested, L.T., and Pedersen, P. (2014). Prognosis and risk factors for intrauterine growth retardation. *Danish medical journal* 61, A4826.
- Seino, Y., Fukushima, M., and Yabe, D. (2010). GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. *Journal of diabetes investigation* 1, 8-23.

- Seljeset, S., and Siehler, S. (2012). Receptor-specific regulation of ERK1/2 activation by members of the "free fatty acid receptor" family. *Journal of receptor and signal transduction research* 32, 196-201.
- Serrano, A., Pavon, F.J., Tovar, S., Casanueva, F., Senaris, R., Dieguez, C., and de Fonseca, F.R. (2011). Oleoylethanolamide: effects on hypothalamic transmitters and gut peptides regulating food intake. *Neuropharmacology* 60, 593-601.
- Shamansurova, Z., Tan, P., Ahmed, B., Pepin, E., Seda, O., and Lavoie, J.L. (2016). Adipose tissue (P)RR regulates insulin sensitivity, fat mass and body weight. *Molecular metabolism* 5, 959-969.
- Sharabi, K., Tavares, C.D.J., Rines, A.K., and Puigserver, P. (2015). Molecular Pathophysiology of Hepatic Glucose Production. *Molecular aspects of medicine* 46, 21-33.
- Sharkey, K.A., and Kroese, A.B. (2001). Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat Rec* 262, 79-90.
- Sharma, D., Shastri, S., and Sharma, P. (2016). Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clinical Medicine Insights Pediatrics* 10, 67-83.
- Shroyer, N.F., Helmrath, M.A., Wang, V.Y., Antalfy, B., Henning, S.J., and Zoghbi, H.Y. (2007). Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (Math1) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology* 132, 2478-2488.
- Sidhu, S.S., Thompson, D.G., Warhurst, G., Case, R.M., and Benson, R.S.P. (2000). Fatty acid-induced cholecystokinin secretion and changes in intracellular Ca(2+) in two enteroendocrine cell lines, STC-1 and GLUTag. *J Physiol* 528, 165-176.
- Sigalet, D.L., Wallace, L., De Heuval, E., and Sharkey, K.A. (2010). The effects of glucagon-like peptide 2 on enteric neurons in intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 22, 1318-e1350.
- Sikander, A., Rana, S.V., and Prasad, K.K. (2009). Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 403, 47-55.
- Silver, A.J., Flood, J.F., and Morley, J.E. (1988). Effect of gastrointestinal peptides on ingestion in old and young mice. *Peptides* 9, 221-225.
- Simmons, R.A., Templeton, L.J., and Gertz, S.J. (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 50, 2279-2286.
- Simpson, K.A., and Bloom, S.R. (2010). Appetite and hedonism: gut hormones and the brain. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 39, 729-743.
- Skrzypek, T., Valverde Piedra, J.L., Skrzypek, H., Kazimierzak, W., Biernat, M., and Zabielski, R. (2007). Gradual disappearance of vacuolated enterocytes in the small intestine of neonatal piglets. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 58 Suppl 3, 87-95.
- Smith, G.P., Jerome, C., and Norgren, R. (1985). Afferent axons in abdominal vagus mediate satiety effect of cholecystokinin in rats. *Am J Physiol* 249, R638-641.
- Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B., and Hoet, J.J. (1990). Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biology of the neonate* 57, 107-118.
- Sobrino Crespo, C., Perianes Cachero, A., Puebla Jimenez, L., Barrios, V., and Arilla Ferreiro, E. (2014). Peptides and food intake. *Frontiers in endocrinology* 5, 58.

- Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J.P., and Neunlist, M. (2010). Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology* 138, 1772-1782.
- Stanner, S.A., Bulmer, K., Andres, C., Lantseva, O.E., Borodina, V., Poteen, V.V., and Yudkin, J.S. (1997). Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *Bmj* 315, 1342-1348.
- Steinman, L. (2004). Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nature immunology* 5, 575-581.
- Stengel, A., and Tache, Y. (2012). Ghrelin - a pleiotropic hormone secreted from endocrine x/a-like cells of the stomach. *Frontiers in neuroscience* 6, 24.
- Sternini, C., Anselmi, L., and Rozengurt, E. (2008). Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 15, 73-78.
- Sternini, C., Wong, H., Pham, T., De Giorgio, R., Miller, L.J., Kuntz, S.M., Reeve, J.R., Walsh, J.H., and Raybould, H.E. (1999). Expression of cholecystokinin A receptors in neurons innervating the rat stomach and intestine. *Gastroenterology* 117, 1136-1146.
- Stewart, J.E., Newman, L.P., and Keast, R.S. (2011a). Oral sensitivity to oleic acid is associated with fat intake and body mass index. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 30, 838-844.
- Stewart, J.E., Seimon, R.V., Otto, B., Keast, R.S., Clifton, P.M., and Feinle-Bisset, C. (2011b). Marked differences in gustatory and gastrointestinal sensitivity to oleic acid between lean and obese men. *Am J Clin Nutr* 93, 703-711.
- Stoffel, M., Espinosa, R., 3rd, Le Beau, M.M., and Bell, G.I. (1993). Human glucagon-like peptide-1 receptor gene. Localization to chromosome band 6p21 by fluorescence in situ hybridization and linkage of a highly polymorphic simple tandem repeat DNA polymorphism to other markers on chromosome 6. *Diabetes* 42, 1215-1218.
- Strader, A.D., and Woods, S.C. (2005). Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 128, 175-191.
- Strubbe, J.H., and Woods, S.C. (2004). The timing of meals. *Psychological review* 111, 128-141.
- Stutte, S., Gohlke, B., Peiler, A., Schreiner, F., Born, M., Bartmann, P., and Woelfle, J. (2017). Impact of Early Nutrition on Body Composition in Children Aged 9.5 Years Born with Extremely Low Birth Weight. *Nutrients* 9.
- Sufian, M.K., Hira, T., Miyashita, K., Nishi, T., Asano, K., and Hara, H. (2006). Pork peptone stimulates cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells and suppresses appetite in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 70, 1869-1874.
- Suga, A., Hirano, T., Inoue, S., Tsuji, M., Osaka, T., Namba, Y., Miura, M., and Adachi, M. (1999). Plasma leptin levels and triglyceride secretion rates in VMH-lesioned obese rats: a role of adiposity. *Am J Physiol* 276, E650-657.
- Sundaresan, S., and Abumrad, N.A. (2015). Dietary Lipids Inform the Gut and Brain about Meal Arrival via CD36-Mediated Signal Transduction. *J Nutr* 145, 2195-2200.
- Sundaresan, S., Shahid, R., Riehl, T.E., Chandra, R., Nassir, F., Stenson, W.F., Liddle, R.A., and Abumrad, N.A. (2013). CD36-dependent signaling mediates fatty acid-induced gut release of secretin and cholecystokinin. *Faseb j* 27, 1191-1202.

- Suply, E., de Vries, P., Soret, R., Cossais, F., and Neunlist, M. (2012). Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302, G1373-1380.
- Supramaniam, V.G., Jenkin, G., Loose, J., Wallace, E.M., and Miller, S.L. (2006). Chronic fetal hypoxia increases activin A concentrations in the late-pregnant sheep. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 113, 102-109.
- Sutherland, K., Young, R.L., Cooper, N.J., Horowitz, M., and Blackshaw, L.A. (2007). Phenotypic characterization of taste cells of the mouse small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1420-1428.
- Sutton, G.M., Duos, B., Patterson, L.M., and Berthoud, H.R. (2005). Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology* 146, 3739-3747.
- Sutton, G.M., Patterson, L.M., and Berthoud, H.R. (2004). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway in solitary nucleus mediates cholecystokinin-induced suppression of food intake in rats. *J Neurosci* 24, 10240-10247.
- Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 631-659.
- Swanson, A.M., and David, A.L. (2015). Animal models of fetal growth restriction: Considerations for translational medicine. *Placenta* 36, 623-630.
- Swanson, J.M., Entringer, S., Buss, C., and Wadhwa, P.D. (2009). Developmental Origins of Health and Disease: Environmental Exposures. *Seminars in reproductive medicine* 27, 391-402.
- Swartz, T.D., Duca, F.A., and Covasa, M. (2010). Differential feeding behavior and neuronal responses to CCK in obesity-prone and -resistant rats. *Brain Res* 1308, 79-86.
- Sykaras, A.G., Demenis, C., Case, R.M., McLaughlin, J.T., and Smith, C.P. (2012). Duodenal enteroendocrine I-cells contain mRNA transcripts encoding key endocannabinoid and fatty acid receptors. *PLoS One* 7, e42373.
- Sykaras, A.G., Demenis, C., Cheng, L., Pisitkun, T., McLaughlin, J.T., Fenton, R.A., and Smith, C.P. (2014). Duodenal CCK cells from male mice express multiple hormones including ghrelin. *Endocrinology* 155, 3339-3351.
- Sykes, S., Morgan, L.M., English, J., and Marks, V. (1980). Evidence for preferential stimulation of gastric inhibitory polypeptide secretion in the rat by actively transported carbohydrates and their analogues. *The Journal of endocrinology* 85, 201-207.
- Symonds, E.L., Peiris, M., Page, A.J., Chia, B., Dogra, H., Masding, A., Galanakis, V., Atiba, M., Bulmer, D., Young, R.L., *et al.* (2015). Mechanisms of activation of mouse and human enteroendocrine cells by nutrients. *Gut* 64, 618-626.
- Szecowka, J., Grill, V., Sandberg, E., and Efendic, S. (1982). Effect of GIP on the secretion of insulin and somatostatin and the accumulation of cyclic AMP in vitro in the rat. *Acta endocrinologica* 99, 416-421.
- Szostak-Wegierek, D., and Szamotulska, K. (2011). Fetal development and risk of cardiovascular diseases and diabetes type 2 in adult life. *Medycyna wieku rozwojowego* 15, 203-215.

-T-

- Tanaka, T., Katsuma, S., Adachi, T., Koshimizu, T.A., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2008). Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 377, 523-527.
- Tapanainen, P.J., Bang, P., Wilson, K., Unterman, T.G., Vreman, H.J., and Rosenfeld, R.G. (1994). Maternal hypoxia as a model for intrauterine growth retardation: effects on insulin-like growth factors and their binding proteins. *Pediatr Res* 36, 152-158.
- Tavernier, A., Cavin, J.B., Le Gall, M., Ducroc, R., Denis, R.G., Cluzeaud, F., Guilmeau, S., Sakar, Y., Barbot, L., Kapel, N., *et al.* (2014). Intestinal deletion of leptin signaling alters activity of nutrient transporters and delayed the onset of obesity in mice. *Faseb j* 28, 4100-4110.
- Tazoe, H., Otomo, Y., Karaki, S., Kato, I., Fukami, Y., Terasaki, M., and Kuwahara, A. (2009). Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 30, 149-156.
- Thanasupawat, T., Hammje, K., Adham, I., Ghia, J.E., Del Bigio, M.R., Krcek, J., Hoang-Vu, C., Klonisch, T., and Hombach-Klonisch, S. (2013). INSL5 is a novel marker for human enteroendocrine cells of the large intestine and neuroendocrine tumours. *Oncology reports* 29, 149-154.
- Thorens, B. (1992). Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8641-8645.
- Thorens, B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* 58, 221-232.
- Tian, H., Biehs, B., Chiu, C., Siebel, C., Wu, Y., Costa, M., de Sauvage, F.J., and Klein, O.D. (2015). Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis. *Cell reports* 11, 33-42.
- Tinnion, R., Gillone, J., Cheetham, T., and Embleton, N. (2014). Preterm birth and subsequent insulin sensitivity: a systematic review. *Archives of disease in childhood* 99, 362-368.
- Tobi, E.W., Lumey, L.H., Talens, R.P., Kremer, D., Putter, H., Stein, A.D., Slagboom, P.E., and Heijmans, B.T. (2009). DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Human molecular genetics* 18, 4046-4053.
- Toft-Nielsen, M.B., Damholt, M.B., Madsbad, S., Hilsted, L.M., Hughes, T.E., Michelsen, B.K., and Holst, J.J. (2001). Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 3717-3723.
- Toft, P.B., Leth, H., Ring, P.B., Peitersen, B., Lou, H.C., and Henriksen, O. (1995). Volumetric analysis of the normal infant brain and in intrauterine growth retardation. *Early human development* 43, 15-29.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* 61, 364-371.
- Tolhurst, G., Zheng, Y., Parker, H.E., Habib, A.M., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2011). Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca²⁺ and cAMP. *Endocrinology* 152, 405-413.

- Tolsa, C.B., Zimine, S., Warfield, S.K., Freschi, M., Sancho Rossignol, A., Lazeyras, F., Hanquinet, S., Pfizenmaier, M., and Huppi, P.S. (2004). Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 56, 132-138.
- Tong, J., Pfluger, P.T., and Tschöp, M.H. (2008). Gastric O-acyl transferase activates hunger signal to the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6213-6214.
- Tran, T.T.T., Poirier, H., Clément, L., Nassir, F., Pelsers, M., Petit, V., Degrace, P., Monnot, M.C., Glatz, J.F.C., Abumrad, N.A., *et al.* (2011). Luminal Lipid Regulates CD36 Levels and Downstream Signaling to Stimulate Chylomicron Synthesis. *The Journal of biological chemistry* 286, 25201-25210.
- Tritos, N.A., Vicent, D., Gillette, J., Ludwig, D.S., Flier, E.S., and Maratos-Flier, E. (1998). Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus. *Diabetes* 47, 1687-1692.
- Tschop, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913.

-V-

- Vambergue, A., and Fajardy, I. (2011). Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. *World journal of diabetes* 2, 196-203.
- van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71, 241-260.
- van Dommelen, P., van der Pal, S.M., Bennebroek Gravenhorst, J., Walther, F.J., Wit, J.M., and van der Pal de Bruin, K.M. (2014). The effect of early catch-up growth on health and well-being in young adults. *Ann Nutr Metab* 65, 220-226.
- Varndell, I.M., Lloyd, R.V., Wilson, B.S., and Polak, J.M. (1985). Ultrastructural localization of chromogranin: a potential marker for the electron microscopical recognition of endocrine cell secretory granules. *The Histochemical journal* 17, 981-992.
- Vickers, M.H. (2014). Early Life Nutrition, Epigenetics and Programming of Later Life Disease. *Nutrients* 6, 2165-2178.
- Vickers, M.H., Breier, B.H., Cutfield, W.S., Hofman, P.L., and Gluckman, P.D. (2000a). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 279, E83-E87.
- Vickers, M.H., Breier, B.H., Cutfield, W.S., Hofman, P.L., and Gluckman, P.D. (2000b). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 279, E83-87.
- Vickers, M.H., Gluckman, P.D., Coveny, A.H., Hofman, P.L., Cutfield, W.S., Gertler, A., Breier, B.H., and Harris, M. (2005). Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 146, 4211-4216.
- Victora, C.G., Barros, F.C., Horta, B.L., and Martorell, R. (2001). Short-term benefits of catch-up growth for small-for-gestational-age infants. *International journal of epidemiology* 30, 1325-1330.

- Villanacci, V., Bassotti, G., Nascimbeni, R., Antonelli, E., Cadei, M., Fisogni, S., Salerni, B., and Geboes, K. (2008). Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil* 20, 1009-1016.
- Vilsbøll, T., and Holst, J.J. (2004). Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 47, 357-366.
- Vilsboll, T., Krarup, T., Deacon, C.F., Madsbad, S., and Holst, J.J. (2001). Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50, 609-613.
- Vollmer, K., Holst, J.J., Baller, B., Ellrichmann, M., Nauck, M.A., Schmidt, W.E., and Meier, J.J. (2008). Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* 57, 678-687.
- Vonnahme, K.A., Hess, B.W., Hansen, T.R., McCormick, R.J., Rule, D.C., Moss, G.E., Murdoch, W.J., Nijland, M.J., Skinner, D.C., Nathanielsz, P.W., *et al.* (2003). Maternal undernutrition from early- to mid-gestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep. *Biology of reproduction* 69, 133-140.
- Vuguin, P. (2002). Animal models for assessing the consequences of intrauterine growth restriction on subsequent glucose metabolism of the offspring: a review. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 11, 254-257.
- Vuguin, P., Raab, E., Liu, B., Barzilai, N., and Simmons, R. (2004). Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation. *Diabetes* 53, 2617-2622.
- Vuguin, P.M. (2007). Animal Models for Small for Gestational Age and Fetal Programming of Adult Disease. *Hormone research* 68, 113-123.

-W-

- Wadhwa, P.D., Buss, C., Entringer, S., and Swanson, J.M. (2009). Developmental Origins of Health and Disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. *Seminars in reproductive medicine* 27, 358-368.
- Wang, F., Kohan, A.B., Lo, C.M., Liu, M., Howles, P., and Tso, P. (2015). Apolipoprotein A-IV: a protein intimately involved in metabolism. *Journal of lipid research* 56, 1403-1418.
- Wang, T., Huo, Y.J., Shi, F., Xu, R.J., and Hutz, R.J. (2005). Effects of intrauterine growth retardation on development of the gastrointestinal tract in neonatal pigs. *Biology of the neonate* 88, 66-72.
- Wang, W., Degroote, J., Van Ginneken, C., Van Poucke, M., Vergauwen, H., Dam, T.M., Vanrompay, D., Peelman, L.J., De Smet, S., and Michiels, J. (2016). Intrauterine growth restriction in neonatal piglets affects small intestinal mucosal permeability and mRNA expression of redox-sensitive genes. *Faseb j* 30, 863-873.
- Wang, X., Wu, W., Lin, G., Li, D., Wu, G., and Wang, J. (2010). Temporal proteomic analysis reveals continuous impairment of intestinal development in neonatal piglets with intrauterine growth restriction. *Journal of proteome research* 9, 924-935.

- Wang, Y., Chandra, R., Samsa, L.A., Gooch, B., Fee, B.E., Cook, J.M., Vigna, S.R., Grant, A.O., and Liddle, R.A. (2011). Amino acids stimulate cholecystokinin release through the Ca(2+)-sensing receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G528-537.
- Wang, Y., Prpic, V., Green, G.M., Reeve, J.R., Jr., and Liddle, R.A. (2002). Luminal CCK-releasing factor stimulates CCK release from human intestinal endocrine and STC-1 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G16-22.
- Waterland, R.A. (2009). Is epigenetics an important link between early life events and adult disease? *Hormone research* 71 *Suppl 1*, 13-16.
- Waterland, R.A., and Garza, C. (1999). Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 69, 179-197.
- Waterland, R.A., Lin, J.R., Smith, C.A., and Jirtle, R.L. (2006). Post-weaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (Igf2) locus. *Human molecular genetics* 15, 705-716.
- Wedel, T., Roblick, U., Gleiss, J., Schiedeck, T., Bruch, H.P., Kuhnel, W., and Krammer, H.J. (1999). Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholmount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 181, 327-337.
- Weng, J., Lou, D., Benoit, S.C., Coschigano, N., Woods, S.C., Tso, P., and Lo, C.C. (2017). Energy homeostasis in apolipoprotein AIV and cholecystokinin-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, ajpgu.00034.02017.
- Wheeler, M.B., Gelling, R.W., McIntosh, C.H., Georgiou, J., Brown, J.C., and Pederson, R.A. (1995). Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signaling properties. *Endocrinology* 136, 4629-4639.
- Wiedenmann, B., Franke, W.W., Kuhn, C., Moll, R., and Gould, V.E. (1986). Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 3500-3504.
- Wigglesworth, J.S. (1964). EXPERIMENTAL GROWTH RETARDATION IN THE FOETAL RAT. *The Journal of pathology and bacteriology* 88, 1-13.
- Winer, D.A., Luck, H., Tsai, S., and Winer, S. (2016). The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Cell metabolism* 23, 413-426.
- Wood, J.D. (2001). Enteric nervous system, serotonin, and the irritable bowel syndrome. *Current opinion in gastroenterology* 17, 91-97.
- Woods, S.C. (2005). Signals that influence food intake and body weight. *Physiology & Behavior* 86, 709-716.
- Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2001). Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 5992.

-X-

- Xu, R.J., Mellor, D.J., Birtles, M.J., Reynolds, G.W., and Simpson, H.V. (1994). Impact of intrauterine growth retardation on the gastrointestinal tract and the pancreas in newborn pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 18, 231-240.

-Y-

- Yadav, H., Lee, J.H., Lloyd, J., Walter, P., and Rane, S.G. (2013). Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *The Journal of biological chemistry* 288, 25088-25097.
- Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., and Zoghbi, H.Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294, 2155-2158.
- Yang, Z.H., Takeo, J., and Katayama, M. (2013). Oral administration of omega-7 palmitoleic acid induces satiety and the release of appetite-related hormones in male rats. *Appetite* 65, 1-7.
- Yanney, M., and Marlow, N. (2004). Paediatric consequences of fetal growth restriction. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 9, 411-418.
- Yarandi, S.S., Hebbar, G., Sauer, C.G., Cole, C.R., and Ziegler, T.R. (2011). Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 27, 269-275.
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., and Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature medicine* 5, 1066-1070.
- Ye, L., and Liddle, R.A. (2017). Gastrointestinal hormones and the gut connectome. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 24, 9-14.
- Yuan, X., Huang, Y., Shah, S., Wu, H., and Gautron, L. (2016). Levels of Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript in Vagal Afferents in the Mouse Are Unaltered in Response to Metabolic Challenges. *eNeuro* 3.

-Z-

- Zheng, H., Patterson, L.M., and Berthoud, H.R. (2002). CART in the dorsal vagal complex: sources of immunoreactivity and effects on Fos expression and food intake. *Brain Res* 957, 298-310.
- Zhu, Y., Wang, W., Yuan, T., Fu, L., Zhou, L., Lin, G., Zhao, S., Zhou, H., Wu, G., and Wang, J. (2017). MicroRNA-29a mediates the impairment of intestinal epithelial integrity induced by intrauterine growth restriction in pig. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 312, G434-g442.
- Zietek, T., and Daniel, H. (2015). Intestinal nutrient sensing and blood glucose control. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 18, 381-388.
- Zimmermann, M.B., and Aeberli, I. (2008). Dietary determinants of subclinical inflammation, dyslipidemia and components of the metabolic syndrome in overweight children: a review. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 6, S11-18.

- Zittel, T.T., De Giorgio, R., Sternini, C., and Raybould, H.E. (1994). Fos protein expression in the nucleus of the solitary tract in response to intestinal nutrients in awake rats. *Brain Res* 663, 266-270.

ANNEXE : ARTICLE SUPPLEMENTAIRE

ARTICLE 4:

Maternal protein restriction induced digestive dysfunctions and enteric nervous system remodeling in rat offspring (*En cours de préparation pour soumission dans Cellular and molecular gastroenterology and hepathology*).

Maternal protein restriction induced digestive dysfunctions and enteric nervous system remodeling in rat offspring

Short title: Nutritional imprinting in digestive functions

Philippe Aubert^{1*}, Elena Oleynikova^{1*}, Hina Rizvi¹, Marième Ndjim², Catherine Le Berre-Scoul¹, Pierre Antoine Grohard¹, Julien Chevalier¹, Jean-Pierre Segain², Gwenola Le Drian², Michel Neunlist^{1§}, Helene Boudin^{1§}

¹Université Bretagne Loire, Université de Nantes, INSERMU1235, Institut des Maladies de l'Appareil digestif du CHU, The enteric nervous system in gut and brain disorders, Nantes, France; ²Inra UMR1280 Phan, Institut des Maladies de l'Appareil digestif du CHU de Nantes, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Grand Ouest, Nantes, France

*Authors share co-first authorship, § Authors share co-senior authorship.

Grant support : INSERM, Region Pays de la Loire (Parimad), Fondation LCL, Fondation SantéDige.

Abbreviations : PBS, phosphate-buffered saline; BSA, bovine serum albumin; ChAT, choline acetyltransferase; CRF, corticotropine-releasing factor; EGC, enteric glial cells; ELA, early-life adversity; ENS, enteric nervous system; FPO, fecal pellet output; FSA, fluorescein–5.6 sulfonic acid; GI, gastrointestinal; HPA, hypothalamic–pituitary–adrenal; HRP, horseradish peroxidase; IBS, irritable bowel syndrome; IR, immunoreactive; MPR, maternal protein restriction; LMMP, longitudinal muscle and myenteric plexus; NMS, neonatal maternal separation; NOS, nitric oxide synthase; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; PFA, paraformaldehyde; PN, postnatal; RT, room temperature; WAS, water avoidance stress.

Correspondance :

Hélène Boudin

INSERM UMR1235, University of Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France.

Email : helene.boudin@univ-nantes.fr

Tel: +33 (0) 2 40 41 29 30 Fax: +33 (0)2 40 41 11 10

Or

Michel Neunlist

INSERM UMR1235, University of Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France

Email : michel.neunlist@univ-nantes.fr

Tel: +33 (0)2 40 41 28 44 Fax: +33 (0)2 40 41 11 10

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

Author Contributions: PA, MNe and HB designed the research study. MN and HB supervised the study and wrote the paper. EO, PA, HR, MNd, CLBS, PAG and JC performed experiments. EA, PA, HR, MNd, MNe and HB analyzed the data. JPS and GLD participated in the critical reading of the manuscript.

Acknowledgements. We are grateful to T Durant for help in cell culture and to G Hamery for help in the Nantes University animal facility.

Word count—Include word count of main document text, not including methods, tables/figures, or references.

Synopsis (2-3 sentences, 37/40 words)

This study shows that adverse early-life nutrition affects GI functions and GI tract response to a stress later in life. Increased corticosterone level contributed to the greater choline acetyltransferase expression and reduced autophagy found in enteric neurons.

Abstract (253/260 words)

Background and aims. Early-life adversity is a major risk factor for the development of gastrointestinal (GI) diseases later in life. Maternal protein restriction (MPR) is associated with morbidities in offspring affecting multiple organs, but its impact on the GI tract remains poorly studied. We examined in rat the consequences of MPR on GI functions and on the enteric nervous system (ENS) under basal state and following acute stress.

Methods. MPR was achieved during pregnancy and lactation and the analyses were performed on the progeny at post-natal day 35. Motility and permeability of distal colon were studied in basal conditions and after a water avoidance stress (WAS). Enteric neurons phenotype, and autophagy levels were studied in distal colon whole mounts and in ENS primary cultures.

Results. MPR rats exhibit a greater colonic motility, permeability and corticosteronemia compared to control rats. In contrast to control rats, MPR rats submitted to WAS presented no change in GI functions and corticosteronemia. Furthermore, MPR rats showed an increased proportion of choline acetyltransferase-immunoreactive (ChAT-IR) neurons and a reduced level of autophagy in colonic myenteric neurons compared to controls. In ENS cultures, corticosterone treatment enhanced the proportion of ChAT-IR neurons and reduced autophagy level in enteric neurons. Inhibition of autophagy in ENS cultures resulted in a higher vulnerability of enteric neurons to a cellular stress

Conclusion. MPR induced GI dysfunctions and ENS alterations in adolescent rats. MPR induced increased corticosteronemia might be involved as a putative factor responsible for ENS remodeling and altered responsiveness of the gut to stressors later in life.

Keywords: enteric neuron, stress, corticosterone, nutritional programming

Introduction

Early-life adversity (ELA) is a major risk factor for the onset and severity of several gastrointestinal (GI) diseases in adulthood, including irritable bowel syndrome (IBS) and inflammatory bowel disease ¹. Several early-life stressors including psychosocial (maternal deprivation, physical and emotional abuse), immunological (infection) and nutritional (maternal restriction diet) stress have been identified as risk factors of GI disorders later in life ¹. Although a large number of GI symptoms often start during adolescence ²⁻⁴, very little is known on GI disorders in the adolescent population compared to the vast knowledge pertaining to adults. Therefore, studies aiming at a better understanding of the pathophysiology of GI disorders in adolescence might help for prevention and treatment before the development as a chronic form in adulthood.

Among early-life stressors, nutritional environment during fetal and postnatal development has proved to deeply impact health later in life. Epidemiological studies showed that infants born small for gestational age, as a result of deficient provision of nutrients during pregnancy, are at significantly increased risk of morbidities affecting multiple organ systems, including the gastrointestinal tract, the cardiovascular, endocrine, pulmonary, and nervous system ⁵. The consequences on GI functions are a higher susceptibility to develop feeding intolerance ⁶, necrotizing enterocolitis ^{7,8} and irritable bowel syndrome (IBS) ^{9,10} compared to their normally grown counterparts. Studies in animal models also pointed to the importance on intestinal morphology and GI function of the nutritional environment during the fetal period. Piglets or rats born with intrauterine growth restriction showed reduced length of ileum and jejunum, decreased size of crypts and villi in the ileum ¹¹⁻¹³ and increased intestinal permeability in the small intestine ¹⁴. The mechanisms involved in these pathophysiological changes are still unclear, but proteomic approaches pointed out for a dysregulation of pathways linked to development, nutrient metabolism, oxydative stress, apoptosis and protein degradation ^{11, 15}. However, the specific cell types affected by these dysregulated pathways and their impact on cellular and gut physiology are still unknown. An issue from the

aforementioned animal models is that the nutritionally-deficient conditions were limited to the fetal period during pregnancy, and were therefore not applied during the whole period of gut maturation, which encompasses also the early postnatal period^{16, 17}. The introduction of a different diet at birth, which represents another perinatal stress, might affect the regulatory mechanisms involved in the gut postnatal maturation and therefore contribute to the long-term alterations of GI functions. To avoid this bias, animal models in which maternal diet restriction was applied during both gestation and lactation were developed in order to maintain the nutritionally-deficient diet during the whole period of gut maturation. Maternal protein restriction (MPR) during pregnancy and lactation in rats induced in adult an increased intestinal permeability and a maladaptive response to a high-fat diet characterized by a reduced induction of intestinal alkaline phosphatase expression in the jejunum^{18, 19}. However, the impact of MPR on intestinal motility remains still unknown. In addition, a number of studies have demonstrated the influence of ELA on the sensitivity to exposure to an additional stressor in adolescence or adulthood. For instance, a psychological stress, such as the water avoidance stress (WAS) induced greater colonic motility, macromolecular permeability and visceral hypersensitivity in adult rats which have experienced neonatal maternal separation (NMS)^{20, 21}. The impact of deficient perinatal nutrition on the sensitivity to an acute stress later in life, and subsequently to the susceptibility to develop GI disorders, has never been explored.

Furthermore, despite the central importance of the enteric nervous system (ENS) in regulating GI functions²², little is known about the consequences of perinatal malnutrition on ENS phenotype and function. The ENS is composed of enteric neurons and enteric glial cells (EGC) organized as interconnected ganglia along the gut. The ENS integrates local and systemic signals to control gut motility, secretion, intestinal permeability and epithelial cell proliferation²³. Enteric neurons have been shown to be sensitive to the nutrients contained in the intestinal lumen, which induced long-term changes in neurotransmitter expression, excitability, neuronal survival and ultimately impact on GI functions²⁴. A few studies, mainly descriptive, have shown that adult rats born from protein-restricted dams during gestation

and lactation had a reduced density of myenteric neurons in the small intestine but not in the colon^{25, 26}. However, neuronal counts were performed with NADH diaphorase staining, which only label a fraction of enteric neurons, and furthermore, the functional impact and underlying mechanisms of these changes still remains unknown.

In this study, we have examined in a rat model the consequences of MPR in adolescent rats on GI functions and in the ENS both in basal condition and in response to an acute stress. We found that MPR alters GI functions in basal conditions and in response to a psychological stress later in life. These effects are associated with increased corticosteronemia and myenteric neurons remodeling characterized by an increased proportion of choline acetyltransferase immunoreactive-neurons and reduced neuronal autophagy.

Materials and Methods

Rat model

MPRMPR model

All protocols were carried out in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals (Agreement # 02476.03). Sprague-Dawley rat dams were obtained on gestational day 1 (Janvier Labs). Two groups of 6 dams each were fed either a normal protein diet (20% of protein; Control) or an isocaloric low protein diet (8% of protein; MPR) from gestational day 1 to the weaning (postnatal day 21, PN21). Diets were purchased from Arie Blok Animal Nutrition (Netherlands). At birth (PN0), rat pups were weighed (Table 1), and the litter were equalized to 6 pups comprising equal number of males and females per litter. After weaning (PN21), all pups were fed a standard laboratory chow (M20, SDS, UK) until the end of the experiment at PN35, an age corresponding to mid-adolescence. The adolescence period in rats is comprised between days 28 and 42²⁷.

Water avoidance stress (WAS)

A single 1 hour-WAS (10 am to 11 am) was performed at PN35, during which rats were placed for 1 hour on a platform (diameter, 10 cm; height, 10 cm) positioned at the centre of a plastic tank (42x42x19 cm) filled with water at room temperature (RT) up to 1 cm of the top of the platform. The ratio of body weight/surface was 1.35 g/cm² and 1.09 g/cm² for control and MPR groups respectively giving a difference of 19% in the ratio values between the two groups. Considering that variation up to 28% of the ratio of body weight/surface value had no influence on the stress level²⁸, we considered that the variation observed in our study was not a confounding factor. The control non-WAS rats were placed individually in a clean cage without bedding, food and water. Rats were randomly assigned to four experimental groups: control without WAS, control with WAS, MPR without WAS, and MPR with WAS.

Fecal parameter measurements

To assess the fecal pellet output (FPO), non-WAS rats were placed individually in a clean cage without bedding, food and water for fecal pellet collection during 1h. For rats subjected to a WAS, the fecal pellet collection was performed for 1h during the WAS time period. Fecal pellets were collected and counted immediately after expulsion. The water content was calculated as follows: fecal water content (%) = [(fecal wet weight - fecal dry weight)/fecal wet weight] × 100.

Ex vivo measurement of colonic motility

At the end of the fecal pellet collection, portions of the distal colonic longitudinal muscles were placed in organ chamber (Radnoti, California, USA) with Krebs's solution (NaH₂PO₄·2H₂O 0.187 g/L, NaCl 6.84 g/L, KCl 0.35 g/L, NaHCO₃ 2.10 g/L, glucose 1.98 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.368 g/L, MgCl₂·6H₂O 0.244 g/L) at 37°C and continuously bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. The contractile response was continuously recorded using isometric force transducers (No. TRI202PAD, Panlab, Cornellã, Spain) coupled to a computer equipped with the PowerLab 8/30 System and the Labchart data analysis software (AD Instruments, Spechbach, Germany) as previously described²⁹. Drugs were added sequentially: (i) nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 50 µM; Sigma-Aldrich), an inhibitor of the nitric oxide synthase (NOS), (ii) atropine (1 µM; Sigma-Aldrich), a muscarinic receptors antagonist. Contractile activity was determined by measuring the average tension during a 2-min time. At the end of each experiment, a dose-response curve (10⁻⁹-10⁻² M) with bethanechol, a specific muscarinic receptors agonist (Sigma-Aldrich) was performed by measuring the area under the curve (AUC) of the bethanechol-induced contraction for 2 minutes after addition of bethanechol. All values were normalized to the tissue weight.

Ex vivo measurements of intestinal barrier permeability

Portions of distal colon were mounted in Ussing chambers (Physiological instruments, San Diego, CA, USA) in 2 mL of Ham's Nutrient Mixture (HAM/F12; Life Technologies) maintained at 37°C and bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. After 30 min of equilibrium, a

mixture of fluorescein-5.6 sulfonic acid (FSA; 1 mg/mL; Life Technologies) and horseradish peroxidase (HRP, 3.47 mg/mL; Sigma-Aldrich) was added at the apical side. Fluorescence intensity and HRP activity were analyzed from basolateral aliquots using a plate reader (Varioskan, Thermo). Permeability was determined by average of the gradient of change in fluorescence intensity and HRP activity over time, using a linear regression fit model measured in the specimens (GraphPad Software).

Serum corticosterone concentration

Blood was collected between 10 and 11 am by intra-cardiac puncture and was centrifuged at 1,500 x g for 5 min at 4°C. The serum was collected and frozen immediately at -80°C. Corticosterone concentration in serum was determined by enzyme immunoassay according to the manufacturer's instructions (Immunodiagnostic System, France). Each serum sample was assayed in duplicate which gave a variation of less than 5%.

Western blot

Distal colon segments were lysed in 50 mM Tris, containing 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA and protease inhibitors (Complete®; Roche, France), pH 7.4, using the Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, France) and followed by sonication with Vibracell 75186 device (Sonics, Newton CT, USA). Lysates from distal colon segments were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated overnight with a guinea-pig anti-P62 antibody diluted 1/1000 (Progen, #GP62-C), then with a HRP-conjugated anti-guinea-pig antibody (Thermoscientific; 1/5000) and visualized by chemiluminescence (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) using a Gel-Doc imager and the Image Lab Software (Bio-Rad). The value of P62 signal was normalized to the amount of β -actin, revealed with a mouse anti- β -actin antibody, (Sigma, #A5441; 1/5000) and expressed as a percentage of the average of controls.

ENS primary culture and treatment

Mixed culture of the enteric nervous system

Primary culture of rat ENS was performed as previously described³⁰. Embryonic day 15 (E15) rat intestine were removed and finely diced in Hank's buffered salt solution and were triturated mechanically using a scalpel. Tissue fragments were incubated for 15 min with 0.25% trypsin (Invitrogen) and for 10 min with 0.1% DNase I (Sigma) and dissociated cells were plated in DMEM/F12 containing antibiotics and 10% fetal bovine serum (FBS) at a density of 2.4×10^5 cells/cm² on 24-well plates previously coated with 0.5% gelatin (Sigma). After 24 h, the medium was replaced with the same medium without FBS but containing 1% of N-2 supplement (Invitrogen) and primary cultures were maintained for 12 days. Cultures were treated with 1 μ M corticosterone (Sigma) or vehicle at the culture day 1, 4, 6, 8 and 11 and were fixed at day 12.

Neuro-glial coculture model

For stress exposure of enteric neurons, we used a model of neuron-glia coculture model as previously described³¹. First, the EGC were prepared from ENS culture as described previously³² and were plated at a density of 7,500 cells/cm² in a 24-well plate in DMEM containing 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine and antibiotics. Enteric neuron culture was prepared from the intestine of E15 rat embryos gestated in dams fed a diet of 20% (control group) or 8% (MPR group) of protein, and was plated on glass coverslips suspended above a EGC feeder. A cellular stress of EGC deprivation was achieved by taking out the coverslips with the enteric neurons to place them in a new 24-well plate, without EGC. To assess the role of autophagy, 0.1 μ M of the autophagy inhibitor bafilomycin A (Sigma-Aldrich) was added for 24h in control and MPR wells.

Immunofluorescence staining

Tissue. Segments of distal colon were fixed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (PFA) at RT for 3 h. Whole mounts of longitudinal muscle and myenteric plexus (LMMP) were obtained by microdissection and were permeabilized with PBS containing 10% BSA and 0.5% Triton X-100 for 3h at RT. Tissues were then

incubated with the following primary antibodies: goat anti-choline acetyltransferase (ChAT, Millipore, #AB144P; 1:500), guinea-pig anti-P62 (1/1000), rabbit anti-neuronal nitric oxide synthase (nNOS, Alexis #ALX210-501; 1/1,000) and mouse anti-HuC/D (Molecular Probes, A21271; 1/500) diluted in PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA), 0.5 % Triton X-100 and 0.02 % sodium azide for 16h or 48h (for ChAT staining) at RT. After washing, tissues were incubated for 3h at RT with the appropriate secondary antibodies and mounted with ProLong Gold Antifade Reagents (ThermoFisher Scientific).

Cell culture. Cells were fixed in PBS containing 4% PFA for 15 min, permeabilized for 5 min in 0.25% TritonX-100 in PBS, and incubated with the following primary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA and 0.02% sodium azide: goat anti-ChAT (1/500), mouse anti-HuC/D (1/500), rabbit anti-active caspase 3 (Sigma-Aldrich, #C8487; 1/2000) for 16h or 48h (for ChAT staining) at RT. After washing, cells were incubated for 1h30 min at RT with the appropriate Alexa 488- or Alexa 568-conjugated secondary antibodies.

Image analysis and quantification

Images from immunostained tissues and cultures were acquired with a fluorescence microscope (BX51, Olympus) using a x20 objective. The number of Hu-, ChAT-, nNOS- and caspase 3-immunoreactive (IR) neurons was counted in 20 ganglia per animal or culture. The data were expressed as the percentage of ChAT-, nNOS- or caspase 3-IR neurons normalized to the total number of Hu-IR neurons. For quantification of the number and size of P62 aggregates, images were acquired with x100 oil immersion objective using a digital camera (DP50, Olympus) coupled to a fluorescence microscope (BX51, Olympus). For each animal or culture, the number and size of P62 clusters were determined from pictures of 8 to 16 ganglia using ImageJ software. The fluorescence intensity threshold for P62 clusters was defined as at least two times the average intensity of fluorescence in the underlying neuronal cytoplasm. Each Hu-IR cells was scored as nNOS-IR or nNOS-immunonegative neuron.

Statistics

Data analyses and statistics were performed using Excel and GraphPad Prism 5. Values indicated mean \pm SEM. Group comparison was made by Mann-Whitney Test or by Two-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test as indicated. The level of statistical significance was set at $*p < 0.05$.

All authors had access to the study data and had reviewed and approved the final manuscript.

Results

Maternal protein restriction induces a lower body weight and size.

Maternal protein restriction during gestation and lactation resulted in fetal growth retardation reflected by a significant lower birth weight of MPR rats compared to control rats (Table 1). In adolescence, at PN35, the body weight of MPR rats remained lower compared to control rats (Table 1). In addition, body and bowel size at PN35 were also lower in MPR rats compared to control rats (Table 1).

Colonic propulsive motor function is increased in MPR rats.

In vivo colonic propulsive motor function was assessed in control and MPR rats by measuring the FPO. FPO was significantly increased in MPR as compared to control rats (control: 1.18 ± 0.50 , MPR: 2.5 ± 0.54 n=11-12, $p < 0.05$; Mann-Whitney test; Fig. 1A). We next analyzed *ex vivo* spontaneous contractile activity of longitudinal muscle strips of distal colon collected from control and MPR rats. Mean resting tension was significantly higher in MPR compared to control group (control: 1.17 ± 0.08 N/g, MPR: 1.65 ± 0.15 N/g; n=7-8, $p < 0.05$, Two way ANOVA repeated measure with Bonferroni post hoc test; Fig. 1B). After addition of L-NAME (50 μ M), the basal tension increased with the same amplitude in control and MPR rats and still remained significantly higher in MPR than in control rats (control: 1.44 ± 0.12 N/g, MPR: 1.91 ± 0.16 N/g, n=8, $p < 0.05$; Fig. 1B). Following addition of atropine (1 μ M), the tension decreased to the same level between the two groups (control: 0.804 ± 0.10 N/g, MPR: 1.05 ± 0.16 N; n=8, $p > 0.05$; Fig. 1B). The muscarinic receptors agonist bethanechol induced a similar dose-dependent increase in contractile response in tissues from control and MPR rats (Fig. 1C).

Colonic permeability to small molecules is increased in MPR rats.

The *ex vivo* intestinal permeability to small (FSA) and large (HRP) molecules was measured in distal colon segments. The permeability to FSA was significantly increased in MPR compared to control rats (control: 0.28 ± 0.03 , MPR: 0.41 ± 0.04 , n=11-12, $p < 0.05$;

Mann-Whitney test; Fig. 1D). A similar profile was observed for permeability to HRP, but no statistical difference was observed between control and MPR groups (Fig. 1D).

Serum corticosterone concentration is increased in MPR rats

Given that ELA have been reported to be associated with altered stress hormone levels (Pohl et al., 2015), we assessed corticosterone level in control and MPR rats. The serum corticosterone concentration was significantly higher in MPR compared to control rats (control: 352.8 ± 24.7 ng/mL; MPR: 575.9 ± 33.7 ng/mL $n=10-11$ (range 363.1 - 722.4 ng/mL), $p<0.05$, Mann-Whitney test; Fig. 1E).

The GI and corticosterone response to a WAS is blunted in MPR rats

Given that ELA have also been shown to influence the GI response to activation of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis induced by acute psychological stress later in life^{20, 21}, we analyzed at PN35 in control and MPR rats the impact of a 1h WAS on the colonic functions previously evaluated. First, we showed that FPO response to WAS was significantly different in control compared to MPR rats ($p<0.05$, $n=11-12$, control vs MPR rats, Mann-Whitney test). While WAS significantly increased FPO in control rats (253.9 ± 34.5 % compared to non-WAS rats, $p<0.05$, Mann-Whitney test; Fig. 1F), no change was induced by WAS in MPR rats (112.7 ± 20.1 %; $p>0.05$ compared to non-WAS MPR rats, Mann-Whitney test; Fig. 1F). Similarly, permeability to FSA in response to WAS was significantly different in control as compared to MPR rats ($p<0.05$, $n=11-12$, Mann-Whitney test; Fig. 1F). While WAS significantly increased the colonic permeability to FSA in control rats (149.5 ± 17.5 % compared to non-WAS rats, $p<0.05$, Mann-Whitney test; Fig. 1F), no change was induced by WAS in MPR rats (93.0 ± 9.7 %, $p>0.05$ compared to non-WAS MPR rats, Mann-Whitney test; Fig. 1F). A similar profile was observed for permeability to HRP, but no statistical difference was observed between the control and MPR groups following a WAS exposure (Fig. 1F).

Finally, we aimed to determine whether the lack of functional changes induced by WAS in MPR could reflect an altered response in corticosterone levels induced by WAS between control and MPR animals. Indeed, we showed that WAS induced-changes in corticosterone was different in control as compared to MPR rats ($p < 0.05$, $n = 10-11$, Mann-Whitney test; Fig. 1F). While WAS significantly increased serum corticosterone concentration in control rats (123.8 ± 7.1 % compared to non-WAS rats ($p < 0.05$, Mann-Whitney test; Fig. 1F), no change was induced by WAS in MPR rats (100.7 ± 6.7 %; $p > 0.05$ compared to non-WAS MPR rats, Mann-Whitney test; Fig. 1F).

The proportion of ChAT-IR cholinergic neurons is increased in the ENS of MPR rats

As the ENS represents a key regulator of intestinal motility and permeability²², we investigated whether changes in cholinergic pathway, which regulates motility and permeability, occurred in MPR rats. Immunohistochemical analysis performed in the myenteric plexus of whole mount preparations from distal colon showed that the proportion of cholinergic ChAT-IR neurons identified as ChAT-IR, was significantly increased in MPR compared to control colon (38.6 ± 2.1 % vs. 23.6 ± 1.9 % ; $n = 5-7$; $p < 0.05$, Mann-Whitney test; Fig. 2A,B). No difference was found between control and MPR rats for the total number of neurons per ganglion (detected with Hu immunolabeling) and the proportion of nNOS-IR neurons (Fig. 2C,D).

Impaired autophagy occurs in a specific neurochemically-defined subpopulation of MPR neurons

A key pathway involved in the cellular response to a large panel of stress, including nutritional stress, is autophagy³³. We therefore analyzed the expression of P62, a protein substrate for autophagy present in autophagosomes, in the distal colon from control and MPR rats by Western blot. The P62 expression was higher in MPR than control rats, indicative of a reduced degradation of P62 in MPR colon as a result of a decreased autophagy level (control: 93.6 ± 31.9 , MPR: 257.9 ± 44.9 , $n = 6-8$, $p < 0.05$ Mann-Whitney test;

Fig. 3A,B). We next assessed whether the reduction of autophagy was present within the ENS, and also potentially restricted to specific neurochemically defined subpopulations of myenteric neurons. Triple immunostaining of whole mount preparations of rat colon LMMP was performed for P62, the neuronal marker Hu and nNOS (Fig. 3C). The quantification of the size and number of P62 clusters was performed both in nNOS-IR and non-nNOS-IR neurons (Fig. 3D). In nNOS-IR neurons, the size and number of P62 clusters was similar in colon from control and MPR rats (Fig. 3C,D). By contrast, in non-nNOS-IR neurons, both the size and number of P62 clusters were significantly increased in MPR compared to control rat colon (size of P62 clusters, control: $4.6 \pm 0.9 \mu\text{m}^2$, MPR: $12.3 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$, $n=5$, $p<0.05$; number of P62 clusters, control: 0.63 ± 0.10 , MPR: 2.17 ± 0.52 ; $n=5$, $p<0.01$, Mann-Whitney test; Fig. 3C,D).

Corticosterone enhances the proportion of ChAT-IR neurons and reduces autophagy in non-nNOS-IR neurons

Given that corticosterone administration in rat has been shown to reduce the level of autophagy in colon tissue³⁴, and that MPR induces an increased serum corticosterone level, we postulated that corticosterone might regulate autophagy level and ChAT expression in enteric neurons. Incubation of ENS culture with corticosterone (1%M) increased the proportion of ChAT-IR neurons compared to control culture ($26.0 \pm 3.8 \%$ vs. $10.0 \pm 2.7 \%$, respectively; $n=4$; $p<0.05$, Mann-Whitney test; Fig. 4A,B). The level of autophagy following corticosterone treatment was assessed in nNOS-IR and non-nNOS-IR enteric neurons. A similar number of P62 clusters occurred in nNOS-IR neurons between control and corticosterone-treated ENS culture (Fig. 4C). However, a greater number of P62 clusters was observed in non-nNOS-IR neurons from corticosterone treated ENS culture compared to non-nNOS-IR neurons from control culture (3.3 ± 0.3 vs 1.8 ± 0.3 , respectively; $n=5$, $p<0.05$, Mann-Whitney test; Fig. 4C,D).

Autophagy inhibition in enteric neurons of MPR rats results in a higher vulnerability to cellular stress

We next examined the consequences of reduced autophagy on the vulnerability of enteric neurons from control or MPR animals to a stress. To address this issue, we used a non-contact primary coculture model of enteric neurons and EGC³¹ (Fig. 5A). As EGC are essential for proper *in vitro* neuronal development and survival^{31, 35}, we characterized the impact of EGC deprivation (i.e. culturing enteric neurons alone for 24h) upon cell death from neurons isolated from control or MPR animals (Fig. 5A).

After a 24h EGC deprivation, the size of P62-IR clusters was significantly higher in neurons derived from MPR rats than from control rats (MPR: $0.13 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$; control: $0.10 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$, $n=6$, $p<0.05$ Mann-Whitney test). In addition, EGC deprivation induced a significant increase in the proportion of caspase 3-IR neurons derived from MPR embryos compared to those from control embryos (control: $11.6 \pm 2.1 \%$, MPR: $19.2 \pm 2.6 \%$; $n=8$, $p<0.05$ Mann-Whitney test; Fig. 5B,C). To determine whether autophagy was involved in the neuronal cell death induced by EGC deprivation, pharmacological blockade of autophagy was achieved using the inhibitor bafilomycin A³⁶. Treatment with bafilomycin A significantly increased the proportion of caspase 3-IR neurons by $166.3 \pm 25.8 \%$ and $193.5 \pm 33.2 \%$ in control and MPR neurons respectively compared to untreated cells ($p<0.05$, Mann-Whitney test; Fig. 5D) but did not differ between control or MPR neurons ($p>0.05$, Mann-Whitney test; Fig. 5D).

Discussion

Our study showed that rats exposed to a nutritionally-induced ELA exhibit long-term alterations of GI responses and ENS phenotype in their adolescent life. In particular, fecal pellet output, permeability to small molecules and serum corticosterone levels were increased in MPR as compared to controls rats. Surprisingly, WAS induced changes in GI functions and corticosteronemia in adolescent control but not in MPR rats. Besides these functional changes, we showed that MPR induced a remodeling in the ENS characterized by an increased proportion of ChAT-IR myenteric neurons and a decreased level of autophagy in a specific subset, i.e. non-nNOS-IR myenteric neurons in the distal colon as compared to controls. These effects were reproduced in ENS cultures incubated with corticosterone. Finally, we showed that i) stress susceptibility was significantly increased in enteric neurons derived from MPR rats as compared to controls and ii) vulnerability of enteric neurons to a cellular stress was enhanced by pharmacological inhibition of autophagy. Altogether our study showed that MPR can induce long-term remodeling of the ENS which is associated with altered GI functions later in life.

A first major finding of our study is that MPR induced changes in colonic functions characterized by an increased motility and permeability to small molecules in the adolescence period of rats. The increase in colonic permeability is consistent with a previous finding showing increased permeability in adult MPR rats ¹⁸ and suggests that these modifications take place during the adolescence life and persist into adulthood. Furthermore, to the best of our knowledge, our work also showed for the first time an impact of MPR on colonic motility. However, since each rat was placed alone in a new cage for the FPO monitoring, we cannot determine whether the increased FPO observed for the MPR group resulted from an increased of basal motility or from a different response to a novel environment between control and MPR rats. Of interest, changes in gut functions observed in MPR rats were associated with increased serum corticosterone concentration. Increased corticosterone levels were previously reported to mediate increased intestinal permeability to small molecules and FPO in rats subjected to an acute or chronic WAS ^{37, 38}. Therefore, one

potential contributing factor leading to gut dysfunctions in MPR rats might involve corticosterone-dependent signaling.

We found marked differences in the response to acute psychological stress between control and MPR rats. While control group exposed to a 1h WAS displayed increased FPO, *ex vivo* colonic permeability to small molecules and HPA axis response (higher corticosterone levels), MPR rats showed a striking blunted response to this psychological stress. The reaction of the control rats to WAS is consistent with previous studies^{28, 39, 40}, but surprisingly the MPR rats did not show an increase from their baseline value upon the WAS. These results contrast with previous studies using another ELA animal model, the NMS, in which increased FPO, permeability and visceral hyperalgesia were observed in NMS rats that were subjected to a WAS later in life^{20, 21, 41, 42}. The mechanisms underlying the lack of response to a WAS for MPR rats remain currently unknown but might be attributable to altered corticotropine-releasing factor (CRF)-dependent pathway as CRF is a central factor controlling the secretion of corticosterone. Indeed, reduction of hypothalamic CRF expression by probiotic treatment⁴³ or by intracerebroventricular injections of oxytocin⁴⁴ inhibited the acute psychological stress-induced increase of corticosterone levels together with that of permeability to small molecules⁴³ and colonic motility⁴⁴. Another possibility that could account for the maladaptive response of MPR rats to a WAS might rely on the developmental window during which the ELA is applied. Studies using repeated NMS performed during the early postnatal period show increased HPA axis response associated with gut dysfunctions upon acute WAS exposure^{20, 21}. In the MPR model used in the present study, the maternal protein deprivation was applied during the gestation and lactation, implying that the progeny was exposed to this nutritional stress during both the prenatal and early postnatal period. One hypothesis resulting from these observations is that an early stress exposure encompassing both the pre- and postnatal period could impact differently the responsiveness to psychological stressors later in life in comparison with an early stress exposure restricted to the postnatal period. Consistent with this hypothesis, the progeny from dams fed with high-fat diet during gestation and lactation present a blunted HPA axis and

emotional behavioral response following a psychological stress⁴⁵. Overall, our study suggest that MPR rats, not only present altered GI functions at a basal state, but also show reduced adaptive ability to psychological stressors. This latter observation extends previous study showing that MPR rats lack adaptive response to a high-fat diet¹⁹.

A second major finding observed in our study is that MPR induces neuronal neuroplastic changes in specific subpopulations of enteric neurons. While no change in the proportion of nNOS-IR neurons occurred in MPR, a significant increase in the proportion of ChAT-IR neurons was observed in the distal colon. Given that the cholinergic innervation is greater in the distal colon than in the proximal colon⁴⁶, it remains to be determined whether MPR differently regulate the proportion of ChAT-IR neurons in the proximal colon. In a previous study, it has been shown that MPR increased the density of myenteric neurons detected by NADH histochemistry in the colon of adolescent rats but the phenotype of the affected neuronal population had not been determined²⁵. In another ELA model, the early weaning stress in piglets, a greater proportion of ChAT-IR submucosal neurons has been reported in the ileum at PN 170⁴⁷. The increased proportion of ChAT-IR neurons in MPR rats could relate to the increased colonic permeability as acetylcholine has been shown to directly promote the epithelium barrier permeability^{48, 49}. We also found a reduced level of autophagy in the distal colon of MPR rats, which occurred in part in myenteric neurons. These neurons with reduced autophagy levels were identified as non-nNOS-IR, and therefore probably corresponded in part to cholinergic ones as the majority of non-nNOS-IR myenteric neurons in the colon are of cholinergic phenotype⁵⁰⁻⁵². Reduced autophagy and down-regulation of proteins involved in the maturation of the autophagosome signaling pathway have been previously reported in the liver of MPR piglets⁵³ but never in enteric neurons. Previous studies have shown that increased autophagy in ENS was associated with neurite damage of enteric neurons in mice lacking the transcriptional factor Homeodomain Interacting Protein Kinase 2 or the 5-HT₄ serotonin receptor, and that this association was thought to reflect a role of autophagy in helping neurons survive neurite damage^{54, 55}. In our model, we found that enteric neurons used autophagy to help neurons survive after a cellular stress produced

by EGC deprivation, as pharmacological inhibition of autophagy increased the proportion of caspase-3 IR neurons. In addition, the proportion of caspase-3-IR enteric neurons induced by EGC deprivation stress was increased in neurons derived from MPR as compared to control rats. Our results suggest that enteric neurons critically depend on the autophagy pathway to counteract the adverse effect of the cellular stress produced by EGC deprivation, and that consequently, the reduced autophagy level in MPR-derived enteric neurons resulted in a higher vulnerability to a cellular stress. One hypothesis is that in MPR rats, the reduced level of autophagy in enteric neurons would make them particularly sensitive to subsequent stress conditions.

We have identified corticosterone as an upstream signal for the regulation of ChAT-IR neuron proportion and level of autophagy in enteric neurons. This is consistent with the reported corticosterone-induced autophagy reduction in rat colon tissue ³⁴. Supporting the influence of corticosterone on ENS homeostasis, a previous study indicated that corticosterone modulated neuronal activity and expression of proteins involved in neurotransmission ⁵⁶. Corticosterone may thus represent a central regulator of gut physiology by modulating in a coordinated manner digestive functions ^{37, 38}, ENS activity and sensitivity to stress.

References

1. Pohl CS, Medland JE, Moeser AJ. Early-life stress origins of gastrointestinal disease: animal models, intestinal pathophysiology, and translational implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015;309:G927-41.
2. Christensen MF, Mortensen O. Long-term prognosis in children with recurrent abdominal pain. *Arch Dis Child* 1975;50:110-4.
3. Howell S, Poulton R, Talley NJ. The natural history of childhood abdominal pain and its association with adult irritable bowel syndrome: birth-cohort study. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2071-8.
4. Walker LS, Guite JW, Duke M, et al. Recurrent abdominal pain: a potential precursor of irritable bowel syndrome in adolescents and young adults. *J Pediatr* 1998;132:1010-5.
5. Regev RH, Reichman B. Prematurity and intrauterine growth retardation--double jeopardy? *Clin Perinatol* 2004;31:453-73.
6. Bozzetti V, Tagliabue PE, Visser GH, et al. Feeding issues in IUGR preterm infants. *Early Hum Dev* 2013;89 Suppl 2:S21-3.
7. March MI, Gupta M, Modest AM, et al. Maternal risk factors for neonatal necrotizing enterocolitis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014:1-6.
8. Zaw W, Gagnon R, da Silva O. The risks of adverse neonatal outcome among preterm small for gestational age infants according to neonatal versus fetal growth standards. *Pediatrics* 2003;111:1273-7.
9. Bengtson MB, Aamodt G, Vatn MH, et al. Co-occurrence of IBS and symptoms of anxiety or depression, among Norwegian twins, is influenced by both heredity and intrauterine growth. *BMC Gastroenterol* 2015;15:9.

10. Bengtson MB, Ronning T, Vatn MH, et al. Irritable bowel syndrome in twins: genes and environment. *Gut* 2006;55:1754-9.
11. D'Inca R, Kloareg M, Gras-Le Guen C, et al. Intrauterine growth restriction modifies the developmental pattern of intestinal structure, transcriptomic profile, and bacterial colonization in neonatal pigs. *J Nutr* 2010;140:925-31.
12. Fanca-Berthon P, Michel C, Pagniez A, et al. Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. *Pediatr Res* 2009;66:47-52.
13. Wang Y, Zhang L, Zhou G, et al. Dietary L-arginine supplementation improves the intestinal development through increasing mucosal Akt and mammalian target of rapamycin signals in intra-uterine growth retarded piglets. *Br J Nutr* 2012;108:1371-81.
14. Wang W, Degroote J, Van Ginneken C, et al. Intrauterine growth restriction in neonatal piglets affects small intestinal mucosal permeability and mRNA expression of redox-sensitive genes. *FASEB J* 2016;30:863-73.
15. Wang X, Wu W, Lin G, et al. Temporal proteomic analysis reveals continuous impairment of intestinal development in neonatal piglets with intrauterine growth restriction. *J Proteome Res* 2010;9:924-35.
16. de Vries P, Soret R, Suply E, et al. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G539-47.
17. Koldovsky O, Dobiasova M, Hahn P, et al. Development of gastrointestinal functions. *Physiol Res* 1995;44:341-8.
18. Le Drean G, Haure-Mirande V, Ferrier L, et al. Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway. *FASEB J* 2014;28:1059-70.

19. Lalles JP, Orozco-Solis R, Bolanos-Jimenez F, et al. Perinatal undernutrition alters intestinal alkaline phosphatase and its main transcription factors KLF4 and Cdx1 in adult offspring fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 2012;23:1490-7.
20. Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G307-16.
21. Soderholm JD, Yates DA, Gareau MG, et al. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G1257-63.
22. Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, et al. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol* 2014;817:39-71.
23. Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16 Suppl 1:55-9.
24. Neunlist M, Schemann M. Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system. *J Physiol* 2014;592:2959-65.
25. Castelucci P, de Souza RR, de Angelis RC, et al. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. *Cell Tissue Res* 2002;310:1-7.
26. Gomes OA, Castelucci P, de Vasconcellos Fontes RB, et al. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: a quantitative morphological study. *Auton Neurosci* 2006;126-127:277-84.
27. Schneider M. Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res* 2013;354:99-106.

28. Larauche M, Mulak A, Kim YS, et al. Visceral analgesia induced by acute and repeated water avoidance stress in rats: sex difference in opioid involvement. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:1031-e547.
29. Soret R, Chevalier J, De Coppet P, et al. Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology* 2010;138:1772-82.
30. Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, et al. Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol* 2008;586:1963-75.
31. Le Berre-Scoul C, Chevalier J, Oleynikova E, et al. A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J Physiol* 2017;595:583-598.
32. Van Landeghem L, Chevalier J, Mahe MM, et al. Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G976-87.
33. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011;147:728-41.
34. Giannogonas P, Apostolou A, Manousopoulou A, et al. Identification of a novel interaction between corticotropin releasing hormone (Crh) and macroautophagy. *Sci Rep* 2016;6:23342.
35. Abdo H, Derkinderen P, Gomes P, et al. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J* 2010;24:1082-94.
36. Yang YP, Hu LF, Zheng HF, et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34:625-35.

37. Hong S, Zheng G, Wu X, et al. Corticosterone mediates reciprocal changes in CB 1 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons in the chronically stressed rat. *Gastroenterology* 2011;140:627-637 e4.
38. Zheng G, Wu SP, Hu Y, et al. Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:e127-39.
39. Bonaz B, Tache Y. Water-avoidance stress-induced c-fos expression in the rat brain and stimulation of fecal output: role of corticotropin-releasing factor. *Brain Res* 1994;641:21-8.
40. Saunders PR, Santos J, Hanssen NP, et al. Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Dig Dis Sci* 2002;47:208-15.
41. Bian ZX, Qin HY, Tian SL, et al. Combined effect of early life stress and acute stress on colonic sensory and motor responses through serotonin pathways: differences between proximal and distal colon in rats. *Stress* 2011;14:448-58.
42. Schwetz I, McRoberts JA, Coutinho SV, et al. Corticotropin-releasing factor receptor 1 mediates acute and delayed stress-induced visceral hyperalgesia in maternally separated Long-Evans rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G704-12.
43. Ait-Belgnaoui A, Durand H, Cartier C, et al. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37:1885-1895.
44. Matsunaga M, Konagaya T, Nogimori T, et al. Inhibitory effect of oxytocin on accelerated colonic motility induced by water-avoidance stress in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:856-e59.

45. Rincel M, Lepinay AL, Delage P, et al. Maternal high-fat diet prevents developmental programming by early-life stress. *Transl Psychiatry* 2016;6:e966.
46. Hasler WL, Kurosawa S, Chung OY. Regional cholinergic differences between distal and proximal colonic myenteric plexus. *Am J Physiol* 1990;258:G404-10.
47. Medland JE, Pohl CS, Edwards LL, et al. Early life adversity in piglets induces long-term upregulation of the enteric cholinergic nervous system and heightened, sex-specific secretomotor neuron responses. *Neurogastroenterol Motil* 2016;28:1317-29.
48. Cameron HL, Perdue MH. Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:47-56.
49. Gareau MG, Jury J, Perdue MH. Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G198-203.
50. Erickson CS, Lee SJ, Barlow-Anacker AJ, et al. Appearance of cholinergic myenteric neurons during enteric nervous system development: comparison of different ChAT fluorescent mouse reporter lines. *Neurogastroenterol Motil* 2014;26:874-84.
51. Hao MM, Bornstein JC, Young HM. Development of myenteric cholinergic neurons in ChAT-Cre;R26R-YFP mice. *J Comp Neurol* 2013;521:3358-70.
52. Qu ZD, Thacker M, Castellucci P, et al. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell Tissue Res* 2008;334:147-61.
53. Long B, Yin C, Fan Q, et al. Global Liver Proteome Analysis Using iTRAQ Reveals AMPK-mTOR-Autophagy Signaling Is Altered by Intrauterine Growth Restriction in Newborn Piglets. *J Proteome Res* 2016;15:1262-73.

54. Chalazonitis A, Tang AA, Shang Y, et al. Homeodomain interacting protein kinase 2 regulates postnatal development of enteric dopaminergic neurons and glia via BMP signaling. *J Neurosci* 2011;31:13746-57.
55. Liu MT, Kuan YH, Wang J, et al. 5-HT₄ receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci* 2009;29:9683-99.
56. Lowette K, Tack J, Vanden Berghe P. Role of corticosterone in the murine enteric nervous system during fasting. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;307:G905-13.

Figure Legends

Figure 1. MPR rats exhibit impaired GI functions, increased corticosterone concentration and blunted response to a WAS. (A) *In vivo* colonic propulsive motor function assessed by the measure of the FPO for 1h. Data represent means \pm SEM (n=11-12), *p<0.05, Mann-Whitney test. (B) Average tension of distal colonic longitudinal muscular segments from control and MPR rats in basal condition and after sequential addition of L-NAME (50 μ M) and atropine (1 μ M). Data represent means \pm SEM (n=8), *p<0.05 control vs. MPR, §p<0.05 basal vs. L-NAME, #p<0.05 L-NAME vs. atropine, Two way ANOVA repeated measure with Bonferroni post hoc test. (C) Dose-curve response of distal colonic longitudinal muscular segments from control and MPR rats to bethanechol-induced AUC (n=8). (D) *Ex vivo* permeability for FSA and HRP in distal colon segments determined in Ussing chambers by measurements of mucosal to serosal flux of the markers. Data represent means \pm SEM (n=11-12), *p<0.05, Mann-Whitney test. (E) Serum corticosterone concentration measured in control and MPR rats. Data represent means \pm SEM (n=10-11), *p<0.05, Mann-Whitney test. (F) Effect of a 1h WAS on FPO (n=11-12), *ex vivo* permeability for FSA and HRP in distal colon segments (n=11-12), and serum corticosterone concentration (n=10-11). §p<0.05 non-WAS vs WAS, *p<0.05 control vs MPR, Mann-Whitney test.

Figure 2. Increased proportion of ChAT-IR neurons in the myenteric plexus of MPR rats.

(A) Double immunolabeling for ChAT (red; marker for cholinergic neurons, arrows) and HuC/D (green; marker for neurons, arrowheads) in the myenteric plexus of control and MPR rat distal colon. Scale bar, 50 μ m. (B) Quantitative analysis for the proportion of ChAT-IR neurons, (C) the proportion of nNOS-IR neurons and (D) the number of neurons per ganglion. Data represent means \pm SEM (n=5-7); *p<0.05, Mann-Whitney test.

Figure 3. Increased P62 expression in myenteric neurons of distal colon in MPR rats.

(A) Western blot of distal colon lysates prepared from control and MPR rats. For each sample, 10 µg of proteins were loaded on a 4-12% SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against P62 and β-actin. (B) Quantification of the P62 signal intensity normalized to β-actin signal in the same sample, expressed as a percentage of controls. Data represent means ± SEM (n=6-8); *p<0.05, Mann-Whitney test. (C) Triple immunolabeling for HuC/D (green), nNOS (blue) and P62 (red) in the myenteric plexus of control and MPR rat distal colon. Larger P62 puncta are observed in non-nNOS-IR neurons from MPR rats (arrows) Scale bar, 15 µm. (D) Quantitative analysis of the size and number of P62 aggregates in nNOS-IR and non-nNOS-IR neurons of the myenteric plexus of distal colon from control and MPR rats. Data represent means ± SEM (n=5); *p<0.05, Mann-Whitney test.

Figure 4. Corticosterone enhances the number of cholinergic neurons and reduces the level of autophagy.

(A) ENS cultures were treated for 10 days with vehicle (control) or 1µM corticosterone and were immunostained for ChAT (red, arrows) and HuC/D (green, arrowheads). Scale bar, 40 µm. (B) Quantitative analysis for the proportion of ChAT-IR neurons. Data represent means ± SEM (n=4); *p<0.05, Mann-Whitney test. (C) ENS cultures were treated for 10 days with vehicle (control) or 1µM corticosterone and were immunostained for P62 (red), nNOS (blue) and HuC/D (green). Larger P62 puncta are observed in non-nNOS-IR neurons from MPR rats (arrows). Scale bar, 10 µm. (D) Quantitative analysis of the number of P62 aggregates in nNOS-IR and non-nNOS-IR neurons from control and corticosterone-treated ENS cultures. Data represent means ± SEM (n=6); *p<0.05, Mann-Whitney test.

Figure 45. MPR enteric neurons require autophagy to counteract a cellular stress. (A) Schematic diagram of the EGC deprivation stress applied to cultured enteric neurons. (B) After 24h of EGC deprivation, enteric neurons derived from control or MPR embryos were fixed at 8 days of culture and immunolabeled with anti-Hu (red, arrows) and anti-active

caspase 3 (green, arrowheads) antibodies. Scale bar, 10 μm . (C) Quantification of the number of caspase 3-IR neurons expressed as percentage of total neurons identified with Hu immunostaining. Data are mean \pm SEM (n=8), *p<0.05, Mann-Whitney test. (D) After 24h of EGC deprivation in the absence or presence of the autophagy inhibitor bafilomycin A, enteric neurons were fixed at 8 days of culture and immunolabeled with anti-Hu and anti-active caspase 3 antibodies to analyze the proportion of caspase 3-IR neurons. Data represent the percentage of caspase-3-IR neurons treated by bafilomycin A normalized to untreated neurons. Values are mean \pm SEM (n=5), *p<0.05 for untreated vs bafilomycin A-treated neurons, Mann-Whitney test.

Table 1. Body **and fecal parameters** in control and MPR groups.

	control	IUGR
Body weight at birth (g)	6.36 ± 0.10 (n=36)	5.21 ± 0.06* (n=36)
Body weight at P35 (g)	106.0 ± 3.3 (n=23)	85.6 ± 1.8* (n=24)
Body size at P35 (cm)	16.8 ± 0.2 (n=23)	15.7 ± 0.1* (n=24)
Bowel size at P35 (cm)	119.9 ± 1.8 (n=23)	111.9 ± 1.1* (n=24)
Fecal water content (%)	81.2 ± 1.8 (n=5)	75.3 ± 3.0 (n=9)

*p<0.05, Mann-Whitney test

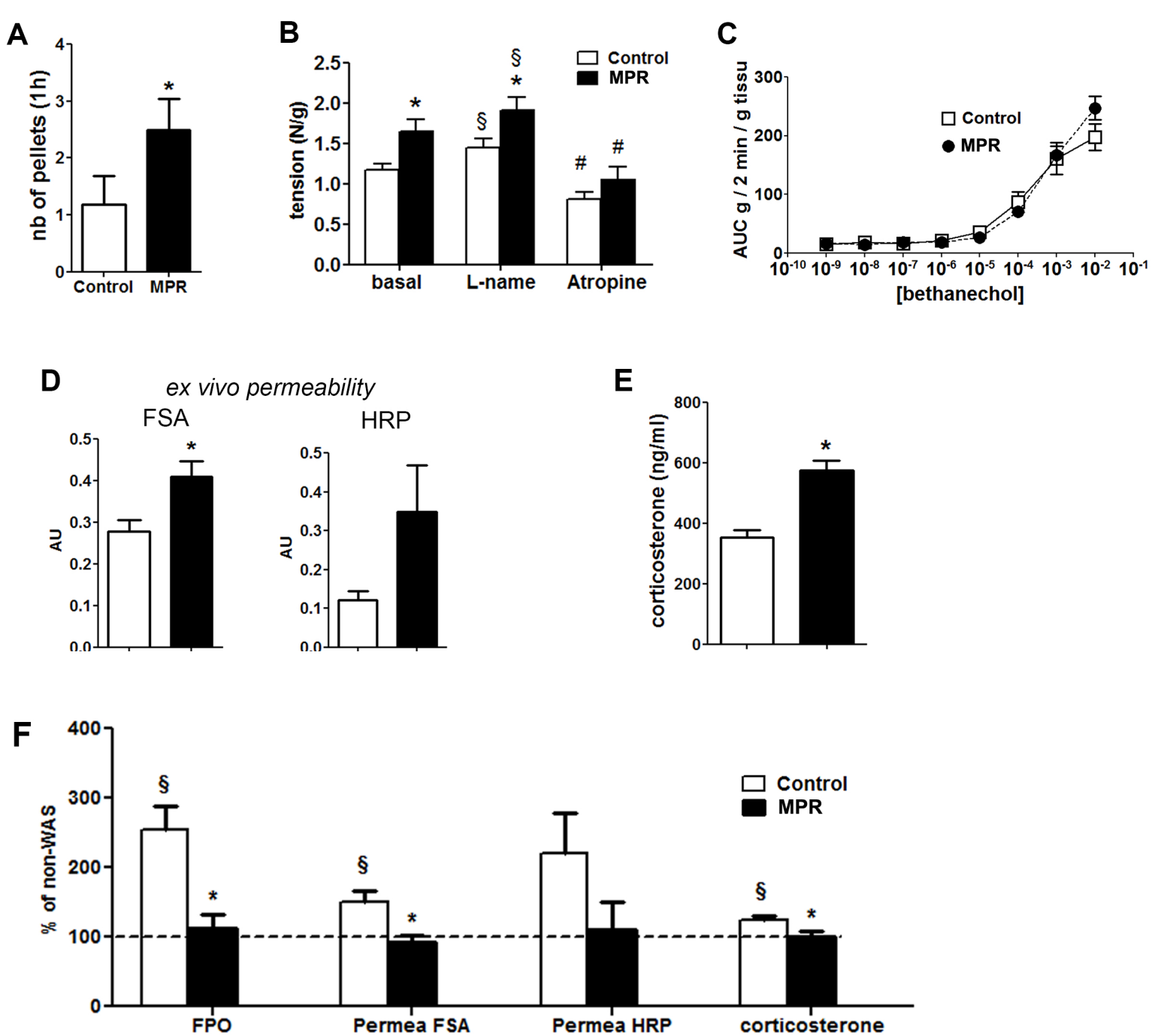


Figure 1

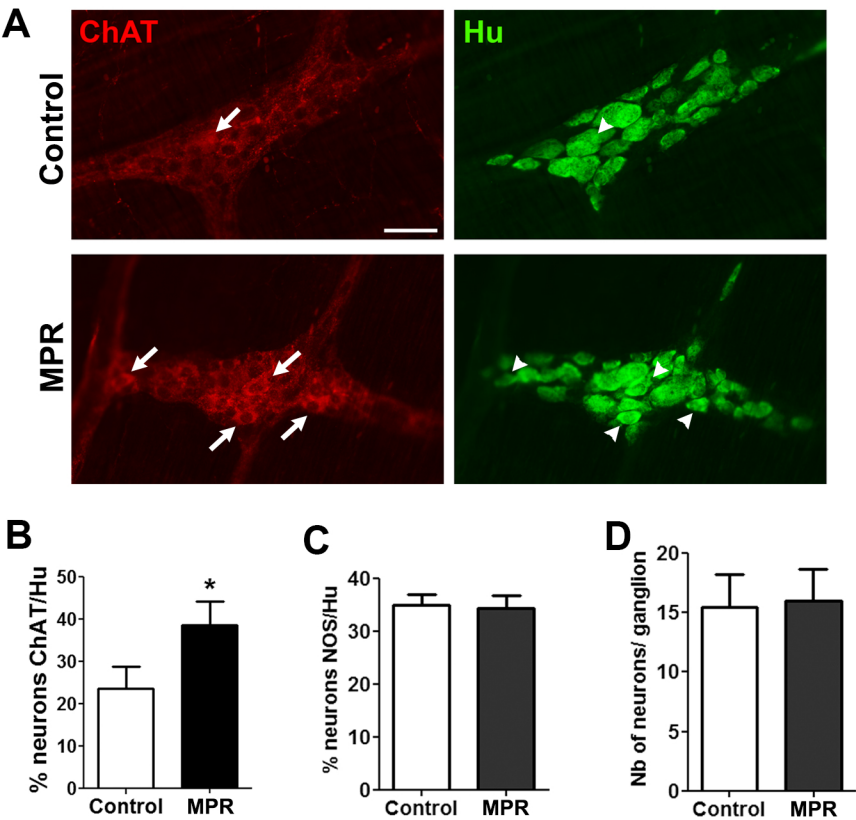


Figure 2

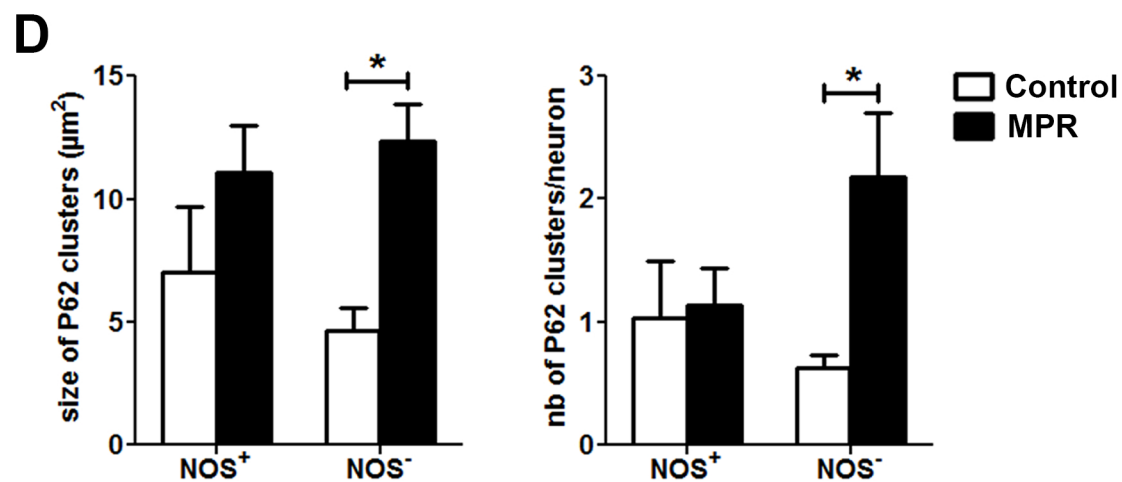
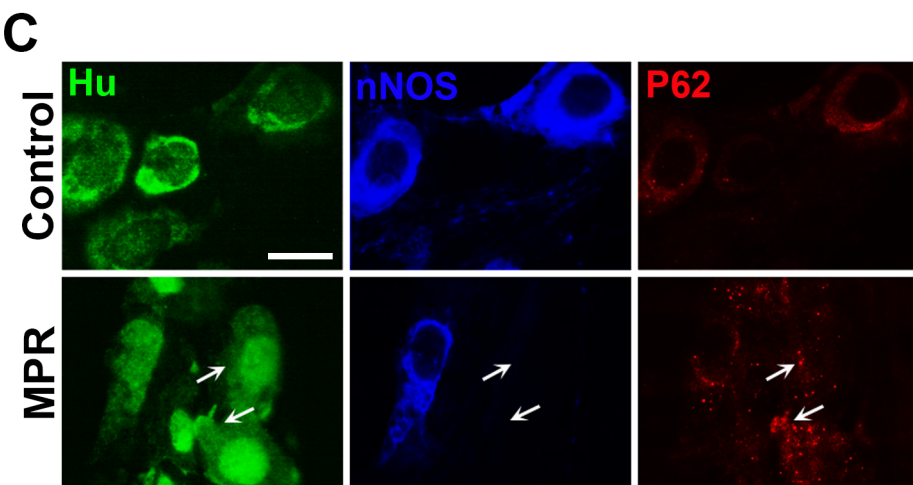
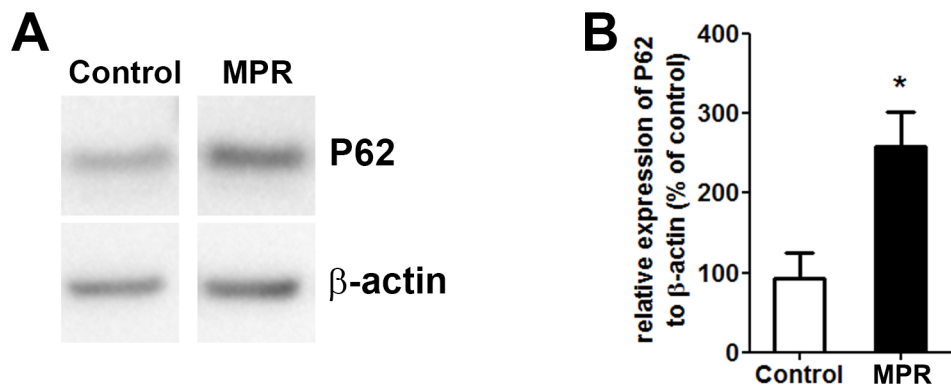


Figure 3

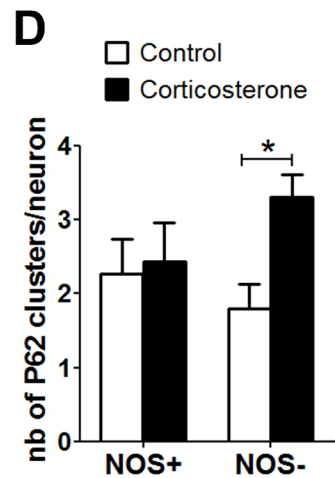
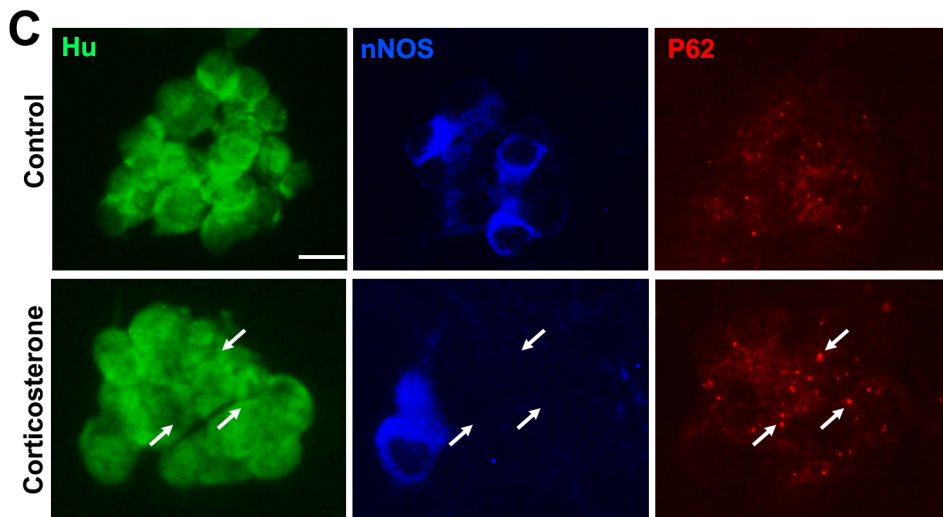
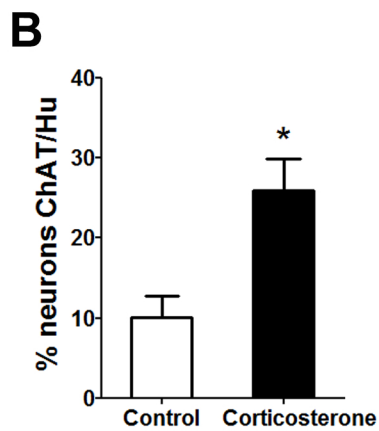
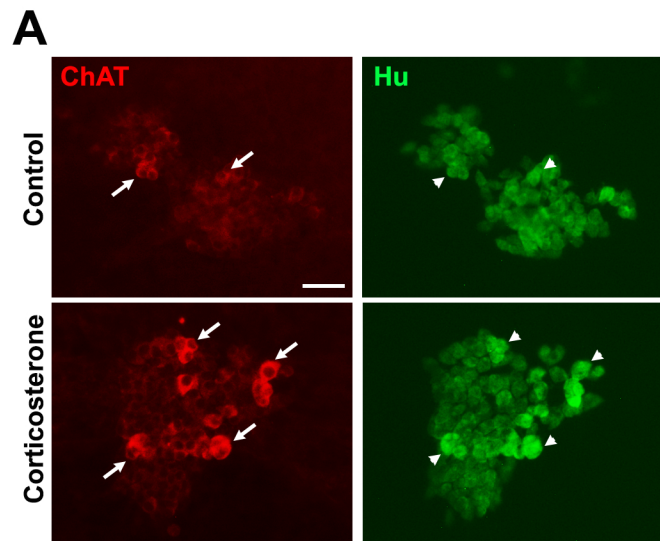


Figure 4

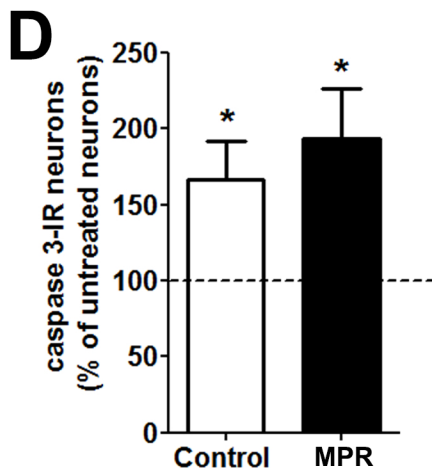
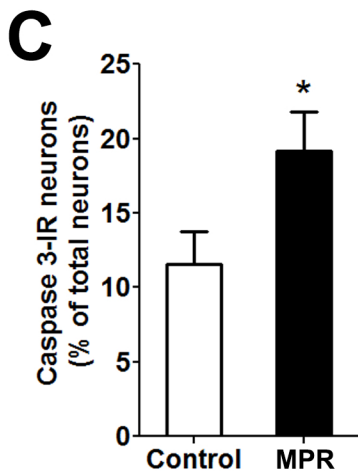
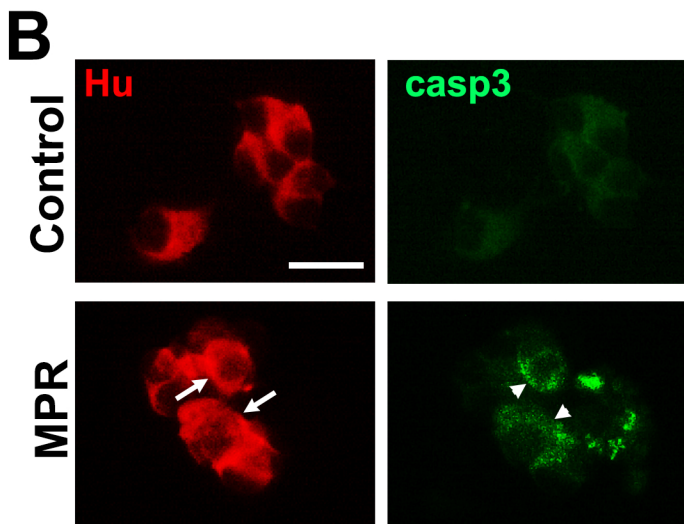
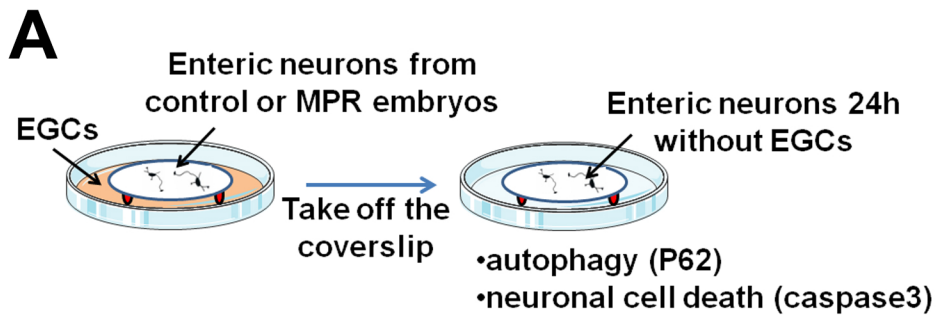


Figure 5

Thèse de Doctorat

Marième NDJIM

Nutrition périnatale et axe intestin –cerveau : rôle de la fonction CCKergique dans le sensing nutritionnel intestinal et la prise alimentaire chez le rat

Résumé

Un environnement nutritionnel périnatal délétère est à l'origine d'une programmation métabolique conduisant à un risque accru de développer un syndrome métabolique à l'âge adulte. Chez le rat une dénutrition protéique maternelle induit une hyperphagie au cours du développement postnatal et des défauts de satiété persistent à l'âge adulte. Ainsi, la composante homéostatique du comportement alimentaire reposant sur l'intégration centrale des signaux gastro-intestinaux pourrait être dérégulée. Cet axe intestin-cerveau implique les cellules entéro-endocrines (CEE) sécrétrices de peptides satiétogènes tels que la cholécystokinine (CCK) dont les effets sont médiés par le nerf vague et le système nerveux entérique (SNE). L'objectif de cette thèse était de déterminer chez le rat l'impact d'une dénutrition périnatale sur (i) la régulation vagale de la prise alimentaire par la CCK (ii) la maturation et la fonction de « sensing » nutritionnel des CEE sécrétant la CCK (iii) les interactions CEE-SNE. Nous avons montré qu'une restriction protéique maternelle induisait une perte de sensibilité vagale à la CCK à l'âge adulte. La densité de CEE sécrétrices de CCK était augmentée, contribuant vraisemblablement à la plus forte sécrétion de CCK en réponse au stimulus nutritionnel (acide gras). Néanmoins, cette réponse était accompagnée d'une augmentation de la perméabilité intestinale. Pour la première fois, un effet de la CCK sur cette fonction régulée par le SNE a été montré in vitro. Les interactions CEE-SNE constituent donc une cible nouvellement identifiée de la programmation métabolique et ouvrent de nouvelles pistes de compréhension des pathologies de l'axe intestin-cerveau, notamment du comportement alimentaire.

Mots clés :

Nutrition périnatale, origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD), cellules entéroendocrines, cholécystokinine, nerf vague, système nerveux entérique, sensing nutritionnel, prise alimentaire

Abstract

A deleterious nutritional environment induces a metabolic programming thus leading to an increased risk of developing metabolic pathologies. In rat perinatal protein restriction induced hyperphagia during the postnatal development and default in satiety establishment at adulthood. Therefore the homeostatic component of eating behavior ensured by the central integration of gastrointestinal signals could be deregulated. This gut-brain axis involves the enteroendocrine cells (EEC) which secrete satietyogenic peptides such as cholecystokinin (CCK) which physiological effects are mediated through the vagus nerve and probably the enteric nervous system (ENS). The aim of this thesis was to determine in rat the impact of perinatal denutrition on (i) the vagal regulation of food intake by CCK (ii) the maturation and the function of nutrient sensing of CCK secreting EEC (iii) the interaction between EEC and ENS. We demonstrated that perinatal protein restriction leads to a loss of vagal sensitivity to CCK at adulthood. The density of CCK-secreting EEC was increased likely contributing to the higher CCK secretion in response to nutritional stimulus such as long chain fatty acid. Nevertheless this response was accompanied by an increased intestinal permeability. For the first time a CCK effect on this function ensured by the ENS has been shown in vitro. The interactions between ENS and EEC constitute a novel identified target for metabolic programming thus opening new approaches for understanding gut brain axis pathologies notably eating behavior.

Key Words:

Perinatal nutrition, developmental origins of health and disease, enteroendocrine cell, cholecystokinin, vagus nerve, enteric nervous system, nutrient sensing, food intake