

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE

---

**École Doctorale Biologie Santé**

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**IMPACT D'UN REGIME WESTERN DIET  
SUR LA PLASTICITE DU SYSTEME NERVEUX  
ENTERIQUE ET REPERCUSSIONS  
FONCTIONNELLES.**

---

**THÈSE DE DOCTORAT**

Discipline : Biologie – Médecine – Santé  
Spécialité : Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire, Physiologie et Nutrition.

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Charlotte Baudry**

*Le 10 novembre 2011, devant le jury ci-dessous*

*Rapporteurs*

Dr André BADO, Directeur de Recherche INSERM U773, Paris

Pr Philippe DUCROTTE, Professeur des universités-Praticien Hospitalier, Rouen

*Examineurs*

Dr Michel NEUNLIST, Directeur de Recherche INSERM U913, Nantes

Dr Raphaël MORIEZ, Post-doctorant INSERM U913, Nantes

*Directeur de thèse*

Pr Stanislas BRULEY DES VARANNES, Professeur des universités-Praticien Hospitalier, Nantes

---

.....	
<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET DES CONFERENCES.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>8</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>10</b>

<i>1. Anatomie et physiologie gastro-intestinales .....</i>	<i>10</i>
1.1. Anatomie du tube digestif.....	10
1.1.1. Organisation générale du tube digestif .....	10
1.1.2. L'œsophage .....	12
1.1.3. L'estomac .....	13
1.1.3.1. Les différentes régions de l'estomac.....	13
1.1.3.2. Particularités de la musculature gastrique.....	13
1.1.3.3. Particularités de la muqueuse gastrique .....	14
1.1.4. L'intestin grêle .....	16
1.1.4.1. Organisation de la muqueuse intestinale.....	16
1.1.4.2. La barrière épithéliale intestinale.....	17
1.1.5. Le côlon.....	19
1.2. Physiologie du tube digestif .....	20
1.2.1. Motricité gastro-intestinale.....	20
1.2.1.1. Motricité gastrique.....	21
1.2.1.1.1. Fonction de réservoir .....	21
1.2.1.1.2. Activité contractile de l'estomac et vidange gastrique.....	21
1.2.1.1.3. Régulation de la vidange gastrique .....	23
1.2.1.1.4. Activité contractile de l'estomac en période interdigestive.....	24
1.2.1.2. Motricité de l'intestin grêle.....	24
1.2.1.2.1. Segmentation .....	24
1.2.1.2.2. Péristaltisme.....	25
1.2.1.2.3. Activité contractile de l'intestin grêle en période interdigestive .....	26
1.2.1.3. Motricité du côlon .....	27
1.2.1.3.1. Mouvements segmentaires.....	27
1.2.1.3.2. Mouvements de masse .....	27
1.2.2. Activité sécrétoire du tractus gastro-intestinal.....	28
1.2.2.1. Sécrétions enzymatiques.....	28
1.2.2.1.1. Sécrétions gastriques.....	28
1.2.2.1.2. Sécrétions intestinales, pancréatiques et biliaires.....	28
1.2.2.2. Peptides gastro-intestinaux .....	31
1.2.2.2.1. Régulation des sécrétions gastro-intestinales .....	33
1.2.2.2.2. Régulation des fonctions motrices gastro-intestinales.....	34
1.2.3. Fonction de barrière sélective.....	34
1.2.3.1. Barrière protectrice .....	35
1.2.3.1.1. Barrière physique .....	35
1.2.3.1.2. Barrière biologique .....	38
1.2.3.1.3. Homéostasie de la barrière .....	39
1.2.3.2. Perméabilité de la barrière épithéliale intestinale .....	40
1.2.3.2.1. Perméabilité paracellulaire.....	40
1.2.3.2.2. Perméabilité transcellulaire.....	41
2. <i>Le système nerveux entérique .....</i>	<i>46</i>
2.1. Caractéristiques générales du système nerveux entérique .....	46
2.1.1. Découverte du système nerveux entérique .....	46
2.1.2. Organisation du système nerveux entérique .....	47
2.1.3. Composants cellulaires du système nerveux entérique.....	49
2.1.3.1. Les neurones entériques.....	49
2.1.3.1.1. Caractéristiques morphologiques.....	49

2.1.3.1.2.	Propriétés électrophysiologiques .....	49
2.1.3.1.3.	Le phénotype neurochimique .....	50
2.1.3.1.4.	Caractéristiques fonctionnelles des neurones .....	51
2.1.3.2.	Les cellules gliales entériques.....	54
2.1.3.2.1.	Morphologie et marqueurs spécifiques des cellules gliales entériques .....	54
2.1.3.2.2.	Fonctions physiologiques des cellules gliales entériques .....	56
2.1.4.	Evolution du système nerveux entérique au cours de la vie .....	58
2.1.4.1.	Développement embryonnaire du système nerveux entérique .....	58
2.1.4.2.	Maturation postnatale du système nerveux entérique .....	61
2.1.4.3.	Modifications du phénotype du système nerveux entérique avec l'âge .....	61
2.1.4.3.1.	Perte de neurones myentériques au cours du vieillissement.....	61
2.1.4.3.2.	Populations neuronales affectées par la perte induite par le vieillissement.....	62
2.1.4.3.3.	Mécanismes à l'origine du vieillissement du système nerveux entérique .....	64
2.2.	Contrôle des fonctions gastro-intestinales par le système nerveux entérique .....	64
2.2.1.	Contrôle de la motricité gastro-intestinale par le système nerveux entérique .....	64
2.2.1.1.	Contrôle de la motricité gastrique .....	64
2.2.1.2.	Contrôle du péristaltisme .....	65
2.2.2.	Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par le système nerveux entérique .....	67
2.2.2.1.	Contrôle du transport vectoriel d'électrolytes et de mucus .....	67
2.2.2.2.	Contrôle de l'absorption intestinale .....	69
2.2.2.3.	Contrôle de la prolifération cellulaire de l'épithélium .....	69
2.2.2.4.	Contrôle de la perméabilité paracellulaire .....	69
2.3.	Impact des facteurs nutritionnels sur le système nerveux entérique .....	70
3.	<i>Impact d'un régime hyperlipidique sur les fonctions digestives et le système nerveux entérique</i> .....	72
3.1.	Réponses gastro-intestinales induites par les lipides alimentaires .....	72
3.2.	Effets d'un régime hyperlipidique sur les fonctions gastro-intestinales.....	73
3.2.1.	Les différents types de régimes hyperlipidiques.....	73
3.2.2.	Effets d'un régime hyperlipidique sur la motricité gastro-intestinale.....	74
3.2.3.	Effets d'un régime hyperlipidique sur les sécrétions gastro-intestinales .....	75
3.2.3.1.	Effets d'un régime hyperlipidique sur les sécrétions enzymatiques.....	75
3.2.3.2.	Effets d'un régime hyperlipidique sur les peptides gastro-intestinaux.....	76
3.2.3.2.1.	Cholécystokinine .....	76
3.2.3.2.2.	GLP-1 et GLP-2.....	76
3.2.3.2.3.	GIP.....	77
3.2.3.2.4.	Leptine .....	77
3.2.3.2.5.	Ghréline .....	77
3.2.3.2.6.	Autres hormones GI et neuromédiateurs.....	78
3.2.4.	Effets d'un régime hyperlipidique sur la barrière épithéliale intestinale .....	79
3.2.4.1.	Morphologie de la barrière épithéliale intestinale .....	79
3.2.5.	Absorption intestinale.....	79
3.2.5.1.	Perméabilité intestinale.....	80
3.3.	Effets d'un régime hyperlipidique sur le système nerveux entérique .....	83
	<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>85</b>
	<b>RESULTATS.....</b>	<b>86</b>
	<u>ARTICLE 1</u> .....	86
	EFFETS PROTECTEURS D'UN REGIME WESTERN DIET SUR LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE GASTRIQUE CHEZ LA SOURIS : IMPLICATION DE LA LEPTINE ET DU GDNF.....	86
	<u>ARTICLE 2</u> .....	126
	LE REGIME WESTERN DIET DIMINUE LA PERMEABILITE INTESTINALE : IMPLICATION DU PEPTIDE VASOACTIF INTESTINAL ET DE LA LEPTINE. ....	126
	<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>154</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>162</b>

# Liste des publications et des conférences

---

## PUBLICATIONS

- **Western diet has neuroprotective effects in murine gastric enteric nervous system: involvement of leptin and GDNF.** Baudry C, Reichardt F, Marchix J, Bado A, Schemann M, Bruley des Varannes S, Neunlist M, Moriez R. (*Soumis The Journal of Physiology le 30 août 2011*).
- **Western diet decreases intestinal paracellular permeability in mice: involvement of vasoactive intestinal peptide and leptin.** Baudry C, Bruley des Varannes P, Grueber L, Schemann M, Moriez R and Neunlist M. (*En préparation*).

## PARTICIPATION A DES CONGRES

### *Communications orales*

- **Effets d'un régime obésogène sur le phénotype du système nerveux entérique et sur la motricité gastrique chez la souris.** Baudry C, Moriez R, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *Journée de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, Juin 2011*.
- **Effects of diet-induced obesity on enteric nervous system phenotype and gastric motility in mice.** Baudry C, Moriez R, Letessier E, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *NeuroGastroenterology and Motility meeting, NGM, Boston, Août 2010*.
- **Effets d'un régime obésogène sur le phénotype du système nerveux entérique et sur la motricité gastrique chez la souris.** Baudry C, Moriez R, Letessier E, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *Réunion annuelle du groupe français de neuro-gastroentérologie, GFNG, Nantes, Juin 2010*
- **Effets d'un régime obésogène sur le phénotype du système nerveux entérique et sur la motricité gastrique chez la souris.** Baudry C, Moriez R, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *Journée de l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, Juin 2010*.

- **Effects of nutritional factors upon the enteric nervous system: functional impact upon gastrointestinal functions.** Moriez R, Baudry C, Soret R, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *Little Brain Big Brain meeting, LBBB, Kenosha, Août 2009.*
- **Altered gastric motility during Western diet-induced obesity in mice.** Baudry C, Moriez R, Aubert P, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *Réunion annuelle du groupe français de neuro-gastroentérologie, GFNG, Rouen, Juin 2009.*
- **Altered gastrointestinal motility during Western diet-induced obesity in mice.** Moriez R, Baudry C, Aubert P, Letessier E, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *Annual meeting of german society of neurogastroenterology, DGNM, Munich, Mars 2009.*

#### *Panneaux scientifiques lors de congrès*

- **Diet-induced enteric neuroplasticity accelerates gastric emptying in obese mice.** Baudry C, Moriez R, Aubert P, Letessier E, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *United European Gastroenterology Week, UEGW, Barcelone, Octobre 2010.*
- **Effet des facteurs nutritionnels sur le système nerveux entérique : impact sur les fonctions gastro-intestinales.** Baudry C, Soret R, Chevalier J, Segain JP, Neunlist M, Moriez R. *Rencontres Inserm Grand Ouest, Nantes, Mai 2010.*
- **Système nerveux entérique et motricité gastrique : modifications induites par un régime obésogène chez la souris.** Baudry C, Moriez R, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie, JFHOD, Paris, Mars 2010.*
- **Gastric neuronal plasticity during Western diet-induced obesity in mice.** Baudry C, Moriez R, Aubert P, Neunlist M, Bruley des Varannes S. *United European Gastroenterology Week, UEGW, Londres, Novembre 2009.*
- **Altered gastrointestinal motility during Western diet-induced obesity in mice.** Moriez R, Baudry C, Aubert P, Letessier E, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *NeuroGastroenterology and Motility meeting, Chicago, Août 2009.*
- **Altered gastrointestinal motility during Western diet-induced obesity in mice.** Moriez R, Baudry C, Aubert P, Letessier E, Bruley des Varannes S, Neunlist M. *Annual meeting of American Gastroenterology Association, AGA, Chicago, Mai 2008.*

# Liste des abréviations

---

**5-HT:** Sérotonine ou 5-hydroxytryptamine

**Ach:** Acétylcholine

**AG:** Acide gras

**AGCC:** Acide gras à chaîne courte

**AGCL:** Acide gras à chaîne longue

**AH:** After hyperpolarisation

**ATP:** Adénosine triphosphate

**BEI:** Barrière épithéliale intestinale

**CCK:** Cholécystokinine

**CEI:** Cellule épithéliale intestinale

**CGE:** Cellule gliale entérique

**CGRP:** Calcitonin gene-related peptide

**ChAT:** Choline acétyltransferase

**CIC:** Cellules interstitielles de Cajal

**CMM:** Complexe migrant moteur

**EDN-3:** Endothelin-3

**EDNR:** Endothelin Receptor

**ECE-1:** Endothelin Converting Enzyme-1

**FABP:** Fatty Acid Binding Protein

**FAK:** Focal Adhesion Kinase

**FD-4:** Fluorescein isothiocyanate-dextran 4 kDa

**FS:** Fluorescein sulfonic acid

**GABA:** Gamma amino butyric acid

**GDNF:** Glial cell-derived neurotrophic factor

**GFAP:** Glial fibrillary acidic protein

**GI:** Gastro-intestinal

**GIP:** Gastric Inhibitory Peptide ou Glucodependent Insulinotropic Peptide

**GLP:** Glucagon-like peptide

**GLUT:** Glucose Transporter

**GSH:** Glutathion réduit

**GSNO:** S-nitrosoglutathione  
**HRP:** Horseradish peroxidase  
**IEB:** Intestinal epithelial barrier  
**IEC:** Intestinal epithelial cell  
**IPAN:** Intrinsic Primary Afferent Neuron  
**JAM:** Junction Adhesion Molecule  
**LPS:** Lipopolysaccharide  
**MICI:** Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
**MLCK:** Myosine Light Chain Kinase  
**ND:** Normal diet  
**nNOS:** Neuronal nitric oxide synthase  
**NO:** Nitric oxide (monoxyde d'azote)  
**NPY:** Neuropeptide Y  
**PA:** Potentiel d'action  
**PACAP:** Pituitary Adenylate Cyclase Activating Protein  
**PepT:** Peptide Transporter  
**PGP:** Protein Gene Product  
**PPSE:** Potentiel Post-Synaptique Excitateur  
**PYY:** Peptide YY  
**ROS:** Reactive Oxygen Species  
**S:** Synaptic (neurones de type S "synaptic")  
**SERT:** Serotonin Transporter  
**SNC:** Système nerveux central  
**SNE:** Système nerveux entérique  
**SOM:** Somatostatine  
**SP:** Substance P  
**TPH:** Tryptophan Hydroxylase  
**TNF:** Tumor necrosis factor  
**TTX:** Tétrodotoxine  
**VIP:** Vasoactive intestinal peptide  
**WD:** Western diet  
**ZO:** Zonula occludens

# Introduction générale

---

Le tractus gastro-intestinal (GI) joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie de tout être vivant. Sa principale fonction est de transformer les aliments ingérés en nutriments utilisables par les cellules de l'organisme. Pour cela, les aliments subissent la digestion, qui permet leur décomposition en éléments assimilables (les nutriments), puis l'absorption à travers la muqueuse intestinale pour gagner la circulation générale. Ces processus font intervenir des fonctions diverses du tube digestif telle que la motricité, l'activité sécrétoire et les fonctions de barrière sélective de la barrière épithéliale intestinale (BEI). La BEI se situe à l'interface avec le milieu extérieur et elle doit remplir un double rôle de contrôle du passage des nutriments, tout en empêchant le passage de pathogènes. La diversité des fonctions GI reflète la complexité cellulaire du tube digestif, qui se compose de cellules musculaires, cellules endothéliales, cellules immunitaires, cellules épithéliales intestinales (CEI), neurones et cellules gliales. Ces cellules interagissent entre elles et avec le milieu extérieur par l'intermédiaire de la BEI.

Les fonctions GI sont soumises à un contrôle nerveux faisant intervenir l'innervation extrinsèque du tube digestif (système nerveux parasympathique et sympathique) et l'innervation intrinsèque constituant le système nerveux entérique (SNE). Le SNE est un système nerveux intégratif innervant l'ensemble du tractus GI. Capable de générer des réflexes GI, le SNE est considéré comme un véritable « deuxième cerveau ». Ces réflexes contrôlent les fonctions motrices et sécrétoires du tube digestif et participent également au maintien de l'homéostasie de la BEI. Constitué de neurones et de cellules gliales entériques (CGE), le SNE a pour origine embryonnaire les cellules de la crête neurale. Son phénotype poursuit son évolution après la naissance et tout au long de la vie, en particulier au cours du vieillissement.

Le phénotype du SNE peut être modulé par des facteurs endogènes provenant du microenvironnement neuro-glial (cellules musculaires ou CEI), mais aussi par des facteurs exogènes d'origine luminale. En effet, quelques travaux ont montré que des facteurs nutritionnels, tels que le glucose, l'oléate ou les acides gras à chaîne courte, étaient capables

d'activer sur le court terme les circuits entériques. De plus, l'impact à long terme du butyrate sur les propriétés phénotypiques et fonctionnelles du SNE a récemment été mis en évidence dans le côlon de rat, et est associé à des modifications des fonctions motrices coliques. Cependant, l'impact d'un déséquilibre nutritionnel, tel que celui impliqué dans le développement de l'obésité, sur le phénotype du SNE ainsi que ses répercussions sur les fonctions GI reste encore très largement inconnu.

Le régime alimentaire occidental (ou « Western diet ») se caractérise par un apport lipidique excessif. En France, selon l'étude INCA2 réalisée en 2007, les lipides alimentaires représentent, chez l'adulte, plus de 39% des apports énergétiques totaux, contre 30 à 35% recommandés par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. L'excès lipidique concerne particulièrement les acides gras saturés, qui représentent 44% des lipides totaux, contre 25% recommandés. D'autre part, l'apport alimentaire glucidique est inférieur à la moyenne recommandée mais la part de glucides simples est trop élevée.

L'impact des lipides sur les fonctions GI a été largement étudié mais leurs effets sont complexes et les mécanismes impliqués restent encore mal connus. En particulier, les lipides ralentissent la vidange gastrique et stimulent les sécrétions d'hormones GI. Cependant, une consommation excessive chronique de lipides modifie les réponses GI normalement induites par ces nutriments. En effet, un régime hyperlipidique induit une modification des mécanismes par lesquels les lipides régulent la motricité GI et conduit à une accélération de la vidange gastrique. Un tel régime exerce également des effets sur la BEI, en augmentant la perméabilité intestinale. L'ensemble de ces dysfonctionnements GI pourraient provoquer une augmentation de la prise alimentaire, en modifiant les signaux de satiété, et être à l'origine de l'établissement d'un état inflammatoire chronique. Ces altérations GI pourraient ainsi participer au développement des pathologies associées à la consommation d'un régime hyperlipidique, telles que l'obésité et ses complications. Cependant, l'implication du SNE dans les altérations des fonctions GI induites par un régime hyperlipidique reste inconnue.

Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail de thèse était donc d'étudier l'impact d'un régime hyperlipidique chronique sur le phénotype du SNE et sur le contrôle nerveux des fonctions GI.

# Etude bibliographique

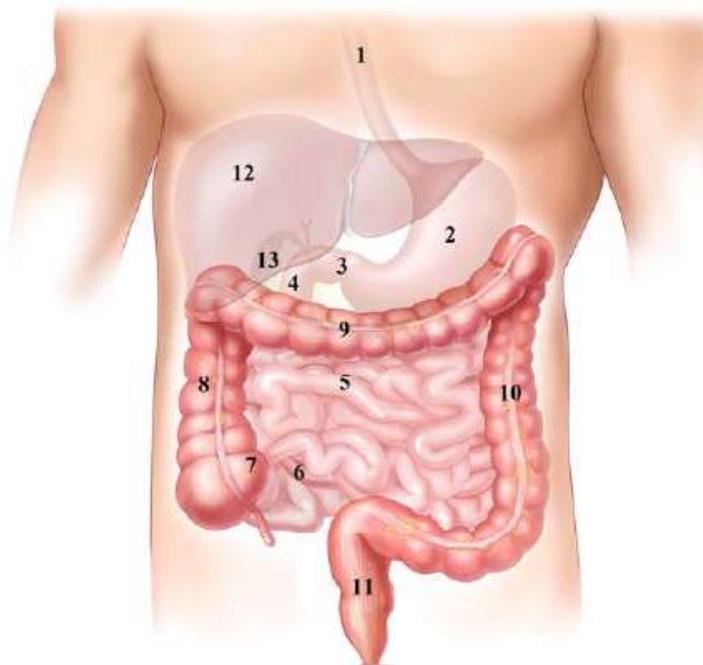
---

## 1. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE GASTRO-INTESTINALES

### 1.1. Anatomie du tube digestif

#### 1.1.1. Organisation générale du tube digestif

L'appareil digestif est composé de l'ensemble des organes constituant le tube digestif, au sein duquel circule le bol alimentaire, ainsi que des glandes annexes, participant à la fonction de digestion des aliments. Le tube digestif, d'environ 9 mètres de long chez l'homme, comprend successivement le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon) et le côlon (Figure 1). Les glandes annexes regroupent les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas, reliés au tube digestif par des canaux spécifiques.



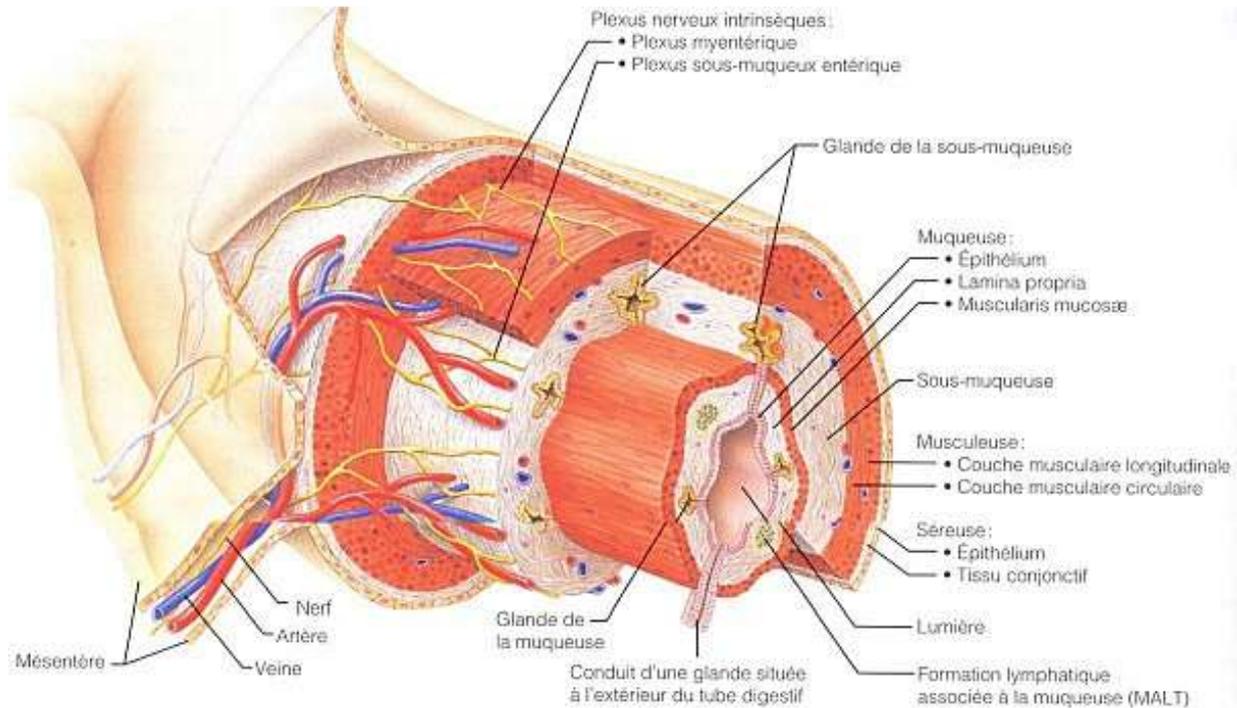
**Figure 1. Représentation schématique du tractus gastro-intestinal.**

1. œsophage
2. estomac
3. pylore
4. duodénum
5. jéjunum
6. iléon
7. valve iléo-caecale
8. côlon ascendant
9. côlon transverse
10. côlon descendant
11. rectum
12. foie
13. vésicule biliaire

<http://www.edoctoronline.com/medical-atlas.asp?c=4&id=22134>

D'un point de vue histologique, les parois des différents organes du tube digestif présentent des caractéristiques communes et se composent de quatre couches distinctes (Figure 2) :

- la muqueuse est la couche qui borde la lumière intestinale, formée d'un épithélium et d'une mince couche de tissu conjonctif, la *lamina propria*. La *lamina propria* est séparée de la sous-muqueuse par une fine couche de fibres musculaires lisses, la *muscularis mucosae*. La *lamina propria* contient des follicules lymphoïdes, des glandes exocrines et des vaisseaux sanguins et lymphatiques.
- la sous-muqueuse est une couche de tissu conjonctif lâche contenant les plexus sous-muqueux (plexus de Meissner) ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques.
- la musculeuse est constituée de fibres musculaires lisses disposées en deux couches : une couche de muscles circulaires interne et d'une couche de muscles longitudinaux externe. Le plexus myentérique (plexus d'Auerbach) se situe entre ces deux couches musculaires. Dans le pharynx, le tiers supérieur de l'œsophage et le sphincter anal externe, les fibres musculaires sont striées.
- la tunique externe est, aux extrémités du tube digestif, constituée de tissu conjonctif lâche et est appelée adventice. Entre les deux extrémités, elle est composée de tissu conjonctif tapissé par un épithélium simple et est appelée séreuse.



**Figure 2. Représentation schématique de la paroi du tube digestif.**

La paroi du tube digestif est composée de quatre couches distinctes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculature et la tunique externe. D'après (Marieb, 1993).

Malgré cette organisation commune, chaque organe du tube digestif présente des particularités histologiques, détaillées ci-dessous.

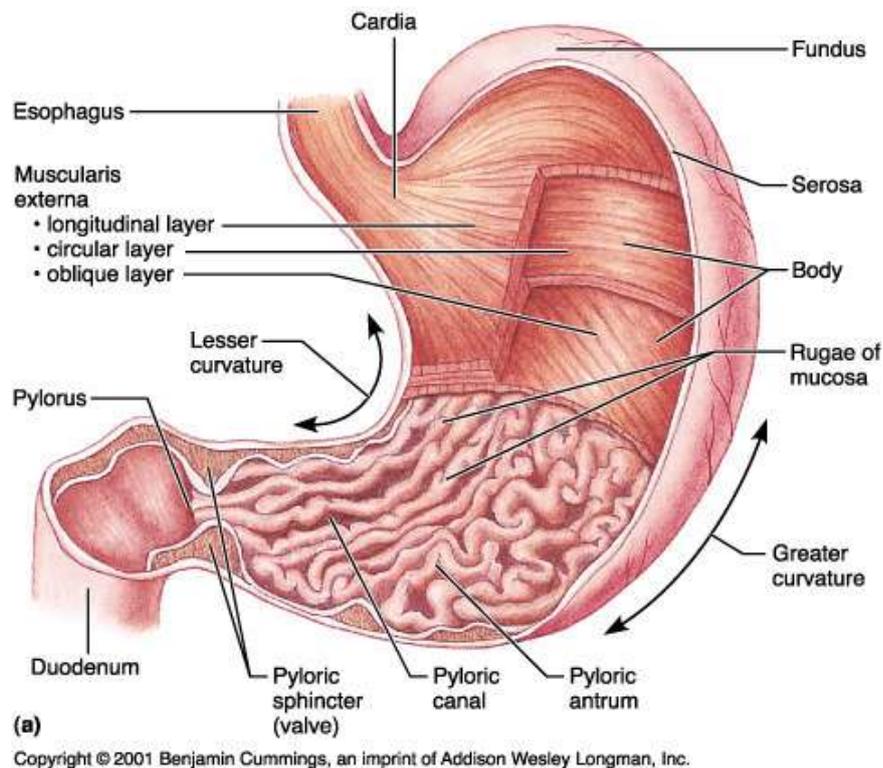
### 1.1.2. L'œsophage

L'œsophage est un conduit d'environ 25 cm de long chez l'homme qui permet d'acheminer la nourriture de la bouche à l'estomac par l'intermédiaire du sphincter inférieur de l'œsophage (cardia). Les muscles squelettiques de la partie supérieure de sa paroi sont progressivement remplacés par les muscles lisses. La muqueuse de l'œsophage est constituée d'un épithélium pavimenteux stratifié, aussi appelé épithélium malpighien non kératinisé, assurant une fonction de protection contre la friction du bol alimentaire sur la paroi œsophagienne. Associé à la *lamina propria*, cet épithélium forme une muqueuse qui présente de profonds replis au repos, permettant une distension importante de la paroi lors du passage des aliments.

### 1.1.3. L'estomac

#### 1.1.3.1. Les différentes régions de l'estomac

L'estomac se compose du cardia, du fundus (partie supérieure), du corps (partie moyenne située entre les deux courbures), de l'antré (partie inférieure) et du sphincter pylorique débouchant dans le duodénum (Figure 3). L'estomac proximal, constitué du fundus et du corps, assure des fonctions de réservoir pour les aliments ingérés. L'estomac distal, constitué de l'antré, est le site principal du brassage gastrique et il intervient dans la vidange du bol alimentaire dans l'intestin. La paroi de l'estomac se distingue du reste du tube digestif du fait des particularités histologiques de la musculature et de la muqueuse gastriques.



**Figure 3. Représentation schématique de l'estomac.**

Les différentes régions de l'estomac sont le cardia, le fundus, le corps, l'antré et le pylore. D'après (Marieb, 1993).

#### 1.1.3.2. Particularités de la musculature gastrique

La musculature gastrique comprend trois couches de muscles : une couche externe longitudinale, une couche moyenne circulaire et une couche interne de fibres obliques

(Figure 3), dont la distribution diffère selon la région de l'estomac. La couche musculaire longitudinale est en continuité avec la couche longitudinale œsophagienne. Elle se divise en deux bandes au niveau du cardia. La bande la plus épaisse et la moins large s'étend sur la petite courbure. Sur les deux faces de l'estomac, elle envoie des prolongements qui s'unissent aux fibres circulaires. Les faces dorsale et ventrale de l'estomac sont donc dépourvues de fibres longitudinales. La seconde bande, moins épaisse, parcourt la grande courbure. Au niveau du pylore, ces deux bandes s'unissent pour former un manchon continu qui franchit le pylore et se prolonge dans le duodénum. La couche musculaire circulaire est complète, mince dans l'estomac proximal et plus épaisse dans la région antro-pylorique. Enfin, la couche musculaire oblique est surtout développée dans la région du fundus. Le pylore présente une individualité anatomique. Il est surtout formé de fibres circulaires dont l'épaisseur facilite la fermeture du canal pylorique. Ces particularités anatomiques musculaires confèrent à l'estomac des propriétés motrices permettant le brassage des aliments.

#### **1.1.3.3. Particularités de la muqueuse gastrique**

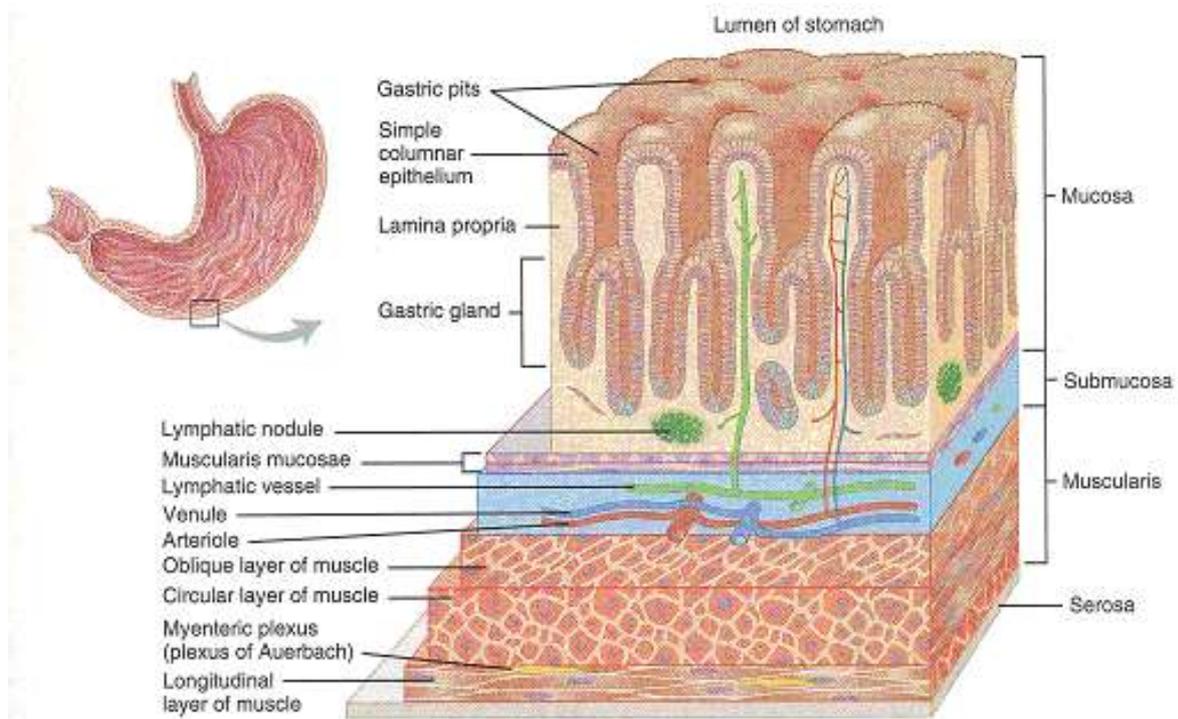
Au niveau de l'estomac, la muqueuse forme de nombreux replis longitudinaux permettant une grande distension pendant les repas. Elle est composée d'un épithélium unistratifié constitué de cellules muqueuses juxtaposées, les cellules mucipares (ou cellules à mucus). Le mucus, qu'elles sécrètent par exocytose, forme un film protecteur contre l'acidité gastrique. En surface, l'épithélium dessine des cryptes en s'invaginant profondément dans la *lamina propria* (Figure 4). Par l'intermédiaire de la zone du collet, où s'effectue le renouvellement des cellules épithéliales, les cryptes débouchent sur les glandes gastriques (Figure 4).

Deux types cellulaires caractéristiques sont présents au niveau des glandes fundiques :

- les cellules pariétales, volumineuses et arrondies, situées sur le mur latéral de la glande, sécrètent l'acide chlorhydrique et le facteur intrinsèque servant à l'absorption de la vitamine B12.
- les cellules principales, sécrétant des enzymes comme le pepsinogène, sont abondantes dans le fond des glandes.

Des cellules endocrines diffuses sont également présentes.

Au niveau de l'antre, se situent de nombreuses cellules endocrines isolées et disséminées dans l'épithélium glandulaire. Elles libèrent différentes substances comme la gastrine, l'histamine, la sérotonine (5-HT), la cholécystokinine (CCK) et la somatostatine directement dans la *lamina propria*. La zone antro-pylorique est la zone du tube digestif où la densité en cellules endocrines est la plus forte. Les cellules à gastrine, appelées cellules G, sont les plus nombreuses. L'ensemble des sécrétions des glandes gastriques est appelé suc gastrique.



**Figure 4. Représentation schématique de la paroi de l'estomac.**

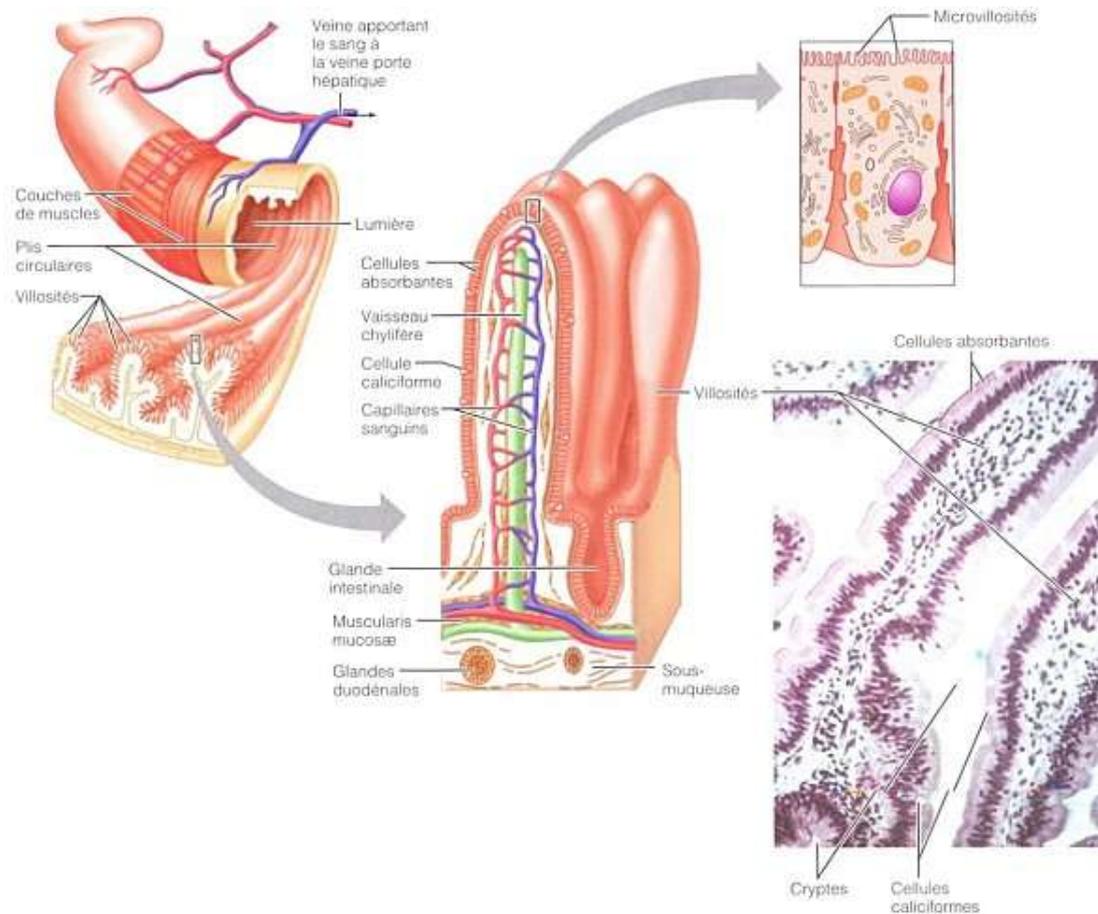
L'épithélium, constitué d'une monocouche de cellules mucipares, forme des cryptes conduisant aux glandes gastriques. <http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tube-digestif>

### **1.1.4. L'intestin grêle**

L'intestin grêle mesure environ 5 mètres de long chez l'homme et il comprend trois parties principales qui sont successivement le duodénum (environ 25 centimètres), le jéjunum (environ 2 mètres) et l'iléon (2-3 mètres).

#### **1.1.4.1. Organisation de la muqueuse intestinale**

Au niveau de l'intestin grêle, la muqueuse intestinale offre une surface d'échange très importante entre le milieu intérieur et la lumière intestinale grâce à trois niveaux d'organisation. Tout d'abord, la paroi intestinale forme des replis profonds de la muqueuse et de la sous-muqueuse appelés valvules conniventes, d'environ 1 cm de haut, qui multiplient la surface par 3 à 10 et qui sont particulièrement développés dans le duodénum et l'iléon (Figure 5). Ensuite, la muqueuse forme des villosités intestinales, d'environ 1 mm, qui multiplient par 20 la surface d'échange. Entre les villosités intestinales, se situent des cryptes formant les glandes de Lieberkühn (Figure 5). Enfin, les microvillosités (1  $\mu\text{m}$ ) sont des replis formés par la membrane plasmique des cellules épithéliales intestinales (CEI) bordant la lumière intestinale (Figure 5). Des artérioles, des réseaux de capillaires sanguins et des veinules se situent au centre des villosités intestinales. Ils récupèrent les nutriments hydrosolubles issus de l'absorption intestinale et les emmènent vers le foie via la veine porte hépatique. Les capillaires lymphatiques ou chylifères, présents à l'extrémité de la villosité, prennent en charge les lipides et les vitamines liposolubles.



**Figure 5. Représentation schématique de la paroi de l'intestin grêle.**

Les valvules conniventes (ou plis circulaires), les villosités intestinales et les microvillosités augmentent considérablement la surface d'échange entre la muqueuse intestinale et le milieu extérieur. D'après (Marieb, 1993).

La muqueuse intestinale est constituée de la *muscularis mucosae*, de la *lamina propria* et de l'épithélium intestinal que l'on nommera dans cette étude barrière épithéliale intestinale (BEI).

#### 1.1.4.2. La barrière épithéliale intestinale

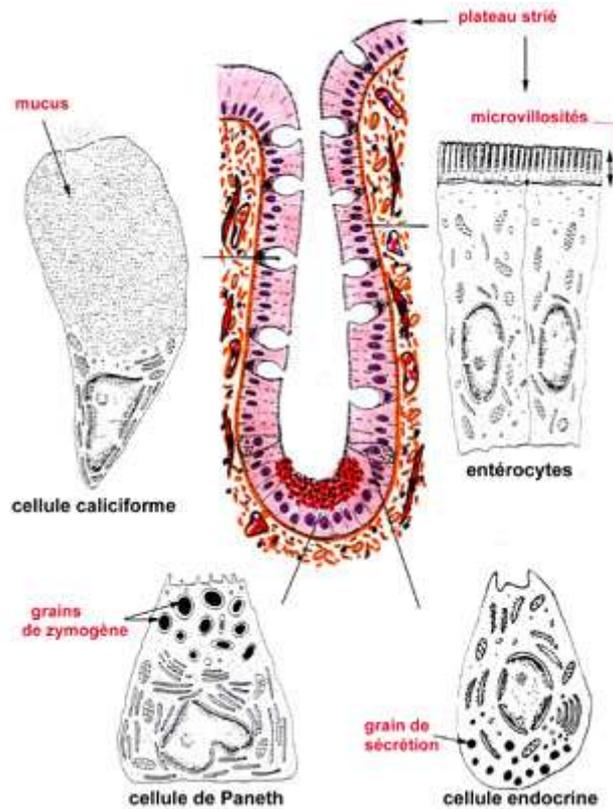
La BEI est constituée d'une monocouche de CEI polarisées reposant sur une lame basale. Quatre types de CEI composent la BEI (Figure 6) :

- les entérocytes ou cellules absorbantes représentent 80% des CEI. Leur fonction principale est d'assurer l'absorption des nutriments issus de la dégradation des aliments ingérés, de l'eau et des électrolytes. A leur pôle apical, les entérocytes présentent des microvillosités recouvertes du glycocalyx, l'ensemble formant la bordure en brosse (Figure 6). Le glycocalyx, couche amorphe riche en

glycoprotéines et glycolipides, joue un rôle de protection de la BEI et contient les enzymes importantes pour la digestion et le transport des nutriments (Patsos et Corfield, 2009).

- les cellules caliciformes sont rencontrées de façon croissante depuis le duodénum jusqu'au côlon distal. Elles représentent environ 15% des CEI, prédominent dans les cryptes et sont rares dans les villosités. Elles contiennent à leur pôle apical de nombreux granules de mucus, sécrétés et libérés dans la lumière par exocytose. Le mucus joue un rôle de lubrification, en limitant les forces de frottements induits par le passage du bol alimentaire, et de protection de la muqueuse envers les potentiels pathogènes et les molécules de grande taille (toxines, protéases) présents dans la lumière.
- les cellules entéroendocrines, moins nombreuses, sont localisées majoritairement dans les glandes ou à la base des villosités. Elles présentent à leur pôle basal des granules de sécrétion dont le contenu sera libéré au niveau de la *lamina propria*. Dans l'intestin, il existe plus de 10 types de cellules entéroendocrines, se distinguant par la nature des substances qu'elles libèrent. Le type de cellule entéroendocrine le plus représenté est la cellule entérochromaffine, présente tout au long de l'intestin, qui libère la sérotonine (5-HT). Les cellules entéroendocrines I, S, GIP, M et N sécrètent respectivement la cholécystokinine (CCK), la sécrétine, le GIP (gastric inhibitory peptide), la motiline et la neurotensine. Elles sont présentes uniquement dans l'intestin grêle. Les cellules L et D, sécrétant respectivement le PYY (Peptide Tyrosine Tyrosine) et la somatostatine ont été localisées dans toutes les parties de l'intestin (Rindi et al., 2004). Il existe également des cellules entéroendocrines intestinales capables de sécréter la gastrine, l'entéroglucagon, la substance P (SP) ou le VIP (vasoactive intestinal peptide).
- les cellules de Paneth, situées au fond des cryptes, sécrètent de nombreuses substances antimicrobiennes dans la lumière intestinale et jouent un rôle majeur dans l'immunité innée. Parmi les principales substances anti-microbiennes, la famille des  $\alpha$ -défensines comporte six membres chez l'homme, dont l'HD5 (human  $\alpha$ -défensin 5) semble être exprimée de façon prédominante par rapport

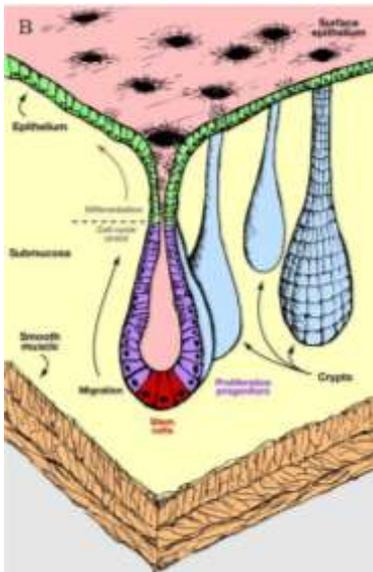
aux autres peptides. Les cellules de Paneth sécrètent également du lysozyme et la phospholipase-A2 (Wehkamp et Stange, 2006).



**Figure 6. Structure des cryptes intestinales et les quatre types de cellules épithéliales intestinales**  
La BEI est composée de quatre types de cellules spécialisées. D'après N.Vacheret (UCB Lyon).

### 1.1.5. Le côlon

Le côlon, d'environ 1,5 m de long, se compose du caecum, de l'appendice, du côlon ascendant, du côlon transverse, du côlon descendant, du côlon sigmoïde et se termine par le rectum. Les fibres musculaires longitudinales de la musculature forment trois bandes (*taeniae coli*) qui se séparent pour reformer une couche continue au niveau du rectum. La muqueuse colique est apparentée à celle de l'intestin grêle mais les villosités intestinales en sont absentes. La muqueuse colique est plane et ponctuée d'invaginations cryptiques (Figure 7). L'épithélium de la muqueuse du côlon est un mélange de cellules absorbantes et de cellules caliciformes. Les cellules entéroendocrines sont relativement peu nombreuses et dispersées et les cellules de Paneth y sont absentes en conditions physiologiques.



**Figure 7. Schéma simplifié de l'organisation de l'épithélium colique.**  
 La muqueuse colique est plane et ponctuée d'invaginations cryptiques. D'après Sancho et al, 2004.

## 1.2. Physiologie du tube digestif

La principale fonction du tube digestif est de transformer les aliments ingérés en nutriments utilisables par les cellules, tout en protégeant l'organisme contre les agents pathogènes et toxiques. Pour cela, le bol alimentaire doit subir deux étapes principales : la digestion (dégradation des aliments) et l'absorption (passage des nutriments dans la circulation). Les transformations des aliments font intervenir des processus mécaniques, impliquant une activité musculaire ainsi que des processus chimiques, impliquant des sécrétions exocrines.

### 1.2.1. Motricité gastro-intestinale

La motricité GI participe à la fois à la fragmentation des aliments, c'est-à-dire à la séparation de leurs différentes molécules constitutives, et au transport du bol alimentaire tout au long du tube digestif.

La fragmentation des aliments débute au niveau de la bouche grâce à la mastication et aux sécrétions salivaires. Ensuite, l'œsophage assure la propulsion du bol alimentaire de la bouche vers l'estomac. Au repos, l'œsophage est fermé par son sphincter supérieur ainsi que par son sphincter inférieur, qui empêche le reflux de liquide gastrique vers l'œsophage. Au moment de la déglutition, le sphincter pharyngo-œsophagien se relâche puis une onde de contraction péristaltique parcourt l'œsophage de haut en bas. Cette contraction permet

l'arrivée du bol alimentaire en bas de l'œsophage. Le sphincter inférieur se relâche alors quelques secondes pour permettre aux aliments d'entrer dans l'estomac.

### **1.2.1.1. Motricité gastrique**

#### 1.2.1.1.1. Fonction de réservoir

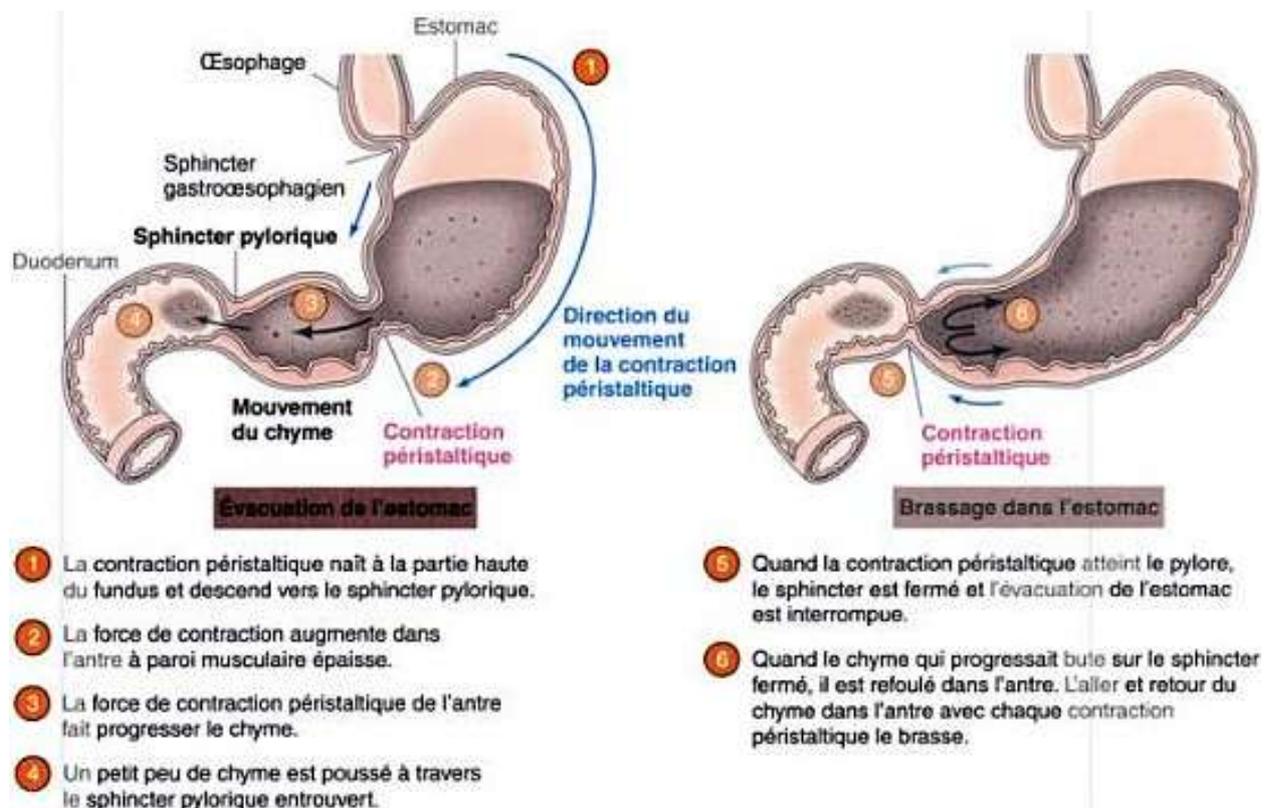
Le volume de l'estomac vide est de 50 mL, mais il peut atteindre jusqu'à 4 L au cours d'un repas (Marieb, 1993). L'estomac proximal (fundus et corps) constitue un réservoir capable de recevoir un repas volumineux sans augmentation notable de la pression intragastrique (Sherwood, 2006). Cette compliance élevée de l'estomac est permise par la relaxation des muscles lisses du fundus. En effet, le passage de la nourriture dans l'œsophage et la distension de la paroi gastrique initient des réflexes qui entraînent une relaxation des muscles lisses de l'estomac proximal. Ces réflexes sont respectivement appelés la relaxation réceptive gastrique, coordonnée par le nerf vague, et l'accommodation gastrique, résultant de réflexes locaux (Arakawa et al., 1997). L'estomac proximal va donc initialement stocker les aliments avant leur migration vers la région antrale.

#### 1.2.1.1.2. Activité contractile de l'estomac et vidange gastrique

Grâce à la contraction coordonnée de ses trois couches de muscle lisse, l'estomac distal présente une activité péristaltique importante qui permet le broyage et le mélange des aliments avec les sécrétions gastriques. Cette activité contractile permet la transformation des aliments en chyme, qui est progressivement évacué vers le duodénum par le phénomène de vidange gastrique.

Après un repas, les contractions péristaltiques apparaissent au niveau du corps de l'estomac. Une aire « pace-maker », constituée par les cellules interstitielles de Cajal (CIC), située dans la couche musculaire longitudinale de la grande courbure, présente une activité électrique spontanée à l'origine d'une onde de dépolarisation dont la fréquence est de 3 par minute (van Helden et al., 2010). Cette onde de dépolarisation est inférieure au seuil de d'excitation des cellules musculaires mais peut être amplifiée par des facteurs nerveux ou hormonaux. Une fois déclenchée, l'onde péristaltique se propage dans deux directions : vers la petite courbure et vers le pylore. La contraction du fundus et du corps, qui contiennent peu de muscle lisse, est faible. En se rapprochant de la région antro-pylorique, où la musculature

est plus forte, les contractions s'intensifient. Les fortes contractions péristaltiques de l'antrum poussent le chyme vers le sphincter pylorique. Celui-ci s'ouvre et se ferme en phase avec les contractions antrales. Il est ouvert lorsque l'onde péristaltique démarre au niveau de la partie moyenne du corps et se ferme lorsqu'elle approche la région pylorique. La partie pylorique peut contenir environ 30 mL de chyme et agit comme un filtre dynamique en ne laissant passer que les liquides et les petites particules (< 2 mm) par le pylore entrouvert (Marieb, 1993). Chaque onde péristaltique qui atteint la musculature du pylore éjecte environ 3 mL de chyme puis la contraction ferme le sphincter pylorique (Marieb, 1993). La plus grande partie du chyme (environ 27 mL) bute donc sur le pylore fermé et reflue dans l'estomac jusqu'à la contraction péristaltique suivante (Figure 8). A chaque contraction, la rétropropulsion du contenu gastrique permet un brassage et un malaxage vigoureux du chyme. Les aliments sont ainsi soumis à broyage progressif en particules de petite taille avant leur évacuation vers le duodénum.



**Figure 8. Contractions péristaltiques dans l'estomac : brassage et évacuation.**

D'après (Sherwood, 2006).

### 1.2.1.1.3. Régulation de la vidange gastrique

L'estomac commence à se vider quelques minutes après la fin du repas et la vidange se termine généralement en moins de 4 heures (Marieb, 1993). La vidange gastrique est contrôlée pour délivrer progressivement à l'intestin grêle un chyme prêt à subir les étapes suivantes de la digestion.

- Influence des caractéristiques physico-chimiques du repas

La cinétique de vidange gastrique dépend du volume et de la composition des aliments présents dans l'estomac (Hunt et Stubbs, 1975). La phase liquide (eau, liquide nutritif...) est rapidement évacuée dans le duodénum. La vidange gastrique des liquides a pour origine le gradient de pression généré par les contractions de l'estomac proximal. Elle s'effectue de manière exponentielle avec un temps de demi-vidange de l'ordre de 30 minutes. Les repas solides sont vidangés beaucoup plus lentement, après une période initiale de non-vidange (lag phase) (Hunt et Spurrell, 1951). Chez l'homme, le temps de vidange gastrique varie entre 2 et 3 heures (Hunt et Spurrell, 1951). Cependant, la durée de vidange est variable selon la composition du repas. En effet, la vitesse de vidange gastrique est différente pour chaque classe de nutriment. Ainsi, les glucides quittent l'estomac le plus rapidement, les protéines mettent plus de temps et l'évacuation des lipides est la plus tardive (Hunt et Stubbs, 1975). Les grosses particules non digestibles comme les fibres alimentaires ne quittent l'estomac que lors du retour de la motricité interdigestive.

- Arrivée des lipides dans le duodénum et l'iléon

Le taux de vidange gastrique est fortement régulé par le réflexe gastro-duodéal. En effet, les récepteurs de la paroi duodénale réagissent aux signaux chimiques (acidité du chyme, présence d'acides gras, ...) et à l'étirement et déclenchent un rétrocontrôle négatif de la vidange gastrique (Raybould et Hölzer, 1993; Hölzer et al., 1994). Ce mécanisme de régulation tend à réduire le débit de passage du contenu gastrique vers le duodénum de manière à ce que le chyme ne soit plus déversé lorsque l'intestin proximal est déjà rempli. Il permet notamment de réguler l'arrivée des acides gras dans le duodénum à un débit compatible avec leur émulsification par les sels biliaires. Un second mécanisme de rétrocontrôle négatif de la vidange gastrique, appelé frein iléal, est déclenché lorsque les

lipides arrivent dans l'iléon terminal (Welch et al., 1988). Ces phénomènes de régulation font intervenir différentes hormones GI, sécrétées en réponse à la présence de lipides, qui ralentissent la vidange gastrique via leur action sur le nerf vague.

#### 1.2.1.1.4. Activité contractile de l'estomac en période interdigestive

Lors du jeûne, le complexe myoélectrique migrant (CMM) assure une vidange régulière de l'estomac (toutes les 90 à 120 minutes) (Code et Marlett, 1975). Le CMM résulte de contractions prenant source au niveau du fundus. Le CMM se décline en trois phases successives. La phase I est sans activité motrice et dure 45 min à 1 h. La phase II correspond à une activité motrice irrégulière non propagée d'intensité croissante et dure 30 à 45 minutes. Enfin, la phase III est caractérisée par des contractions intenses et régulières qui se propagent dans l'estomac et durent 5 à 15 minutes. Le pylore se ferme lorsque les contractions antrales de la phase II lui proviennent mais s'ouvrent largement durant la phase III et peut laisser passer de volumineuses particules vers l'intestin grêle. Le CMM permet ainsi de vider l'estomac des résidus alimentaires afin d'éviter toute stase et prolifération bactérienne.

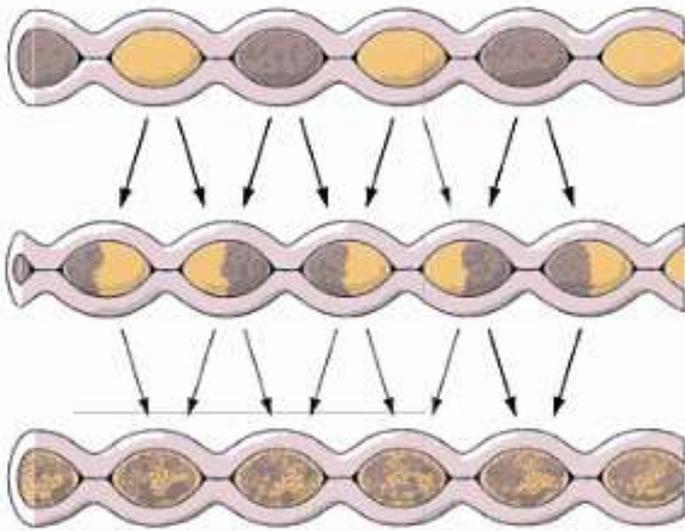
#### 1.2.1.2. Motricité de l'intestin grêle

Dans l'intestin grêle, les mouvements moteurs les plus importants sont la segmentation et le péristaltisme. Ils permettent la progression du chyme vers le côlon, qui parcourt toute la longueur de l'intestin grêle en 3 à 5 heures.

##### 1.2.1.2.1. Segmentation

La segmentation permet le mélange du chyme avec les enzymes digestives présentes dans l'intestin grêle et facilite l'absorption des produits de digestion. Elle consiste en des contractions annulaires, oscillantes du muscle lisse circulaire tout le long de l'intestin grêle (Gwynne et Bornstein, 2007) (Figure 9). Les régions relâchées, situées entre les anneaux de contraction, contiennent peu de chyme. Les anneaux de contraction, distants de quelques centimètres, ne progressent pas le long de l'intestin. Les segments contractés se relâchent au bout de peu de temps (5-6 secondes) et les segments antérieurement relâchés se contractent (Gwynne et Bornstein, 2007) (Figure 9). Le chyme contenu dans les segments initialement au repos est poussé vers les zones nouvellement au repos. L'alternance de contraction et de relâchement permet une fragmentation et un malaxage du chyme. Ce brassage mélange le

chyme aux sécrétions intestinales et le met en contact étroit avec la muqueuse absorbante. De plus, la fréquence de la segmentation est plus élevée dans le duodénum (12 contractions / min) que dans l'iléon (8 contractions / min), ce qui entraîne une progression lente du chyme vers le côlon (Gwynne et Bornstein, 2007).



**Figure 9. Segmentation de l'intestin grêle.**

La segmentation consiste en la formation d'anneaux de contraction le long de l'intestin grêle. En quelques secondes, les zones contractées se relâchent et les régions relâchées se contractent. Ces contractions cycliques homogénéisent le chyme dans la lumière intestinale. D'après (Sherwood, 2006)

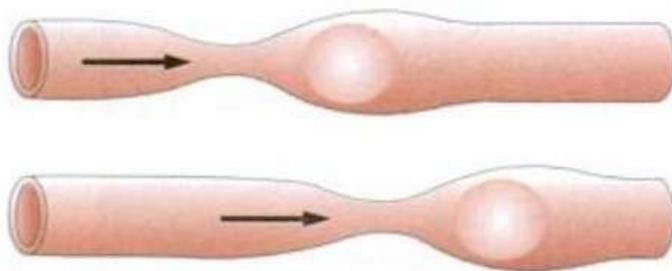
Les contractions segmentaires sont causées par l'activité des CIC, cellules « pacemaker », situées dans la seconde partie du duodénum, qui produisent un rythme électrique de base analogue à celui qui est à l'origine des contractions de l'estomac. Dans le duodénum, la segmentation est initiée par l'arrivée du chyme alors que dans l'iléon, elle est initiée par le réflexe gastro-iléal, induit par la sécrétion de gastrine dans l'estomac. Ce phénomène moteur est commandé par le système nerveux entérique (SNE) mais l'innervation extrinsèque est capable de modifier la force des contractions segmentaires (Cannon, 1912). Ainsi, une stimulation parasympathique renforce la segmentation alors qu'une stimulation sympathique s'y oppose.

#### 1.2.1.2.2. Péristaltisme

Contrairement à la segmentation, ne faisant intervenir que les muscles circulaires, les contractions péristaltiques sont permises par la double couche musculaire circulaire et longitudinale de la paroi du tube digestif. La distension de la paroi intestinale par le bol alimentaire entraîne la contraction des muscles circulaires, ce qui diminue le diamètre du tube

digestif derrière les aliments et empêche leur reflux. Simultanément, la contraction des muscles longitudinaux les propulse vers l'avant, où le tube digestif est élargi par une onde de relaxation. Cette alternance de relaxations-contractions pousse le bol alimentaire le long du tube digestif (Figure 10).

Les contractions péristaltiques se propagent dans l'intestin grêle à une vitesse de 0,5-2 cm/seconde. Chaque contraction parcourt une distance variable mais relativement courte et disparaît. La contraction suivante est initiée dans une zone légèrement plus distale que la zone d'initiation de la contraction précédente. Des vagues péristaltiques continues sont engendrées simultanément dans l'intestin. L'initiation de l'activité péristaltique, provoquée par la distension de la paroi intestinale par le bol alimentaire, est médiée par le SNE mais l'amplitude des contractions peut être influencée par les nerfs extrinsèques et par diverses hormones GI. La stimulation parasympathique augmente l'excitabilité du muscle lisse et la stimulation sympathique la diminue. Les contractions et relaxations des muscles lisses entraînent des mouvements des villosités (raccourcissement et élongation), qui facilitent l'absorption des nutriments.



**Figure 10. Contractions péristaltiques intestinales.**

Les contractions péristaltiques permettent l'avancée du bol alimentaire le long du tube digestif. D'après (Khurana, 2006).

#### 1.2.1.2.3. Activité contractile de l'intestin grêle en période interdigestive

Pendant les périodes de jeûne, le CMM détermine une activité rythmique caractéristique des muscles lisses de l'intestin. Il s'agit d'une activité cyclique et propagée, décrite pour la première fois chez le chien comme « une bande de potentiels d'action de grande amplitude partant du duodénum et traversant l'intestin grêle » (Szurszewski, 1969). La majorité des contractions débute au niveau du duodénum ou du jéjunum proximal et s'arrête souvent à l'iléon (Kellow et al., 1986). Cependant, certaines contractions débutent dans l'estomac proximal ou même dans l'œsophage (Janssens et al., 1990), avant de se propager

jusqu'à l'iléon terminal. La durée totale d'un CMM est d'environ 2 heures chez l'homme et il peut être décomposé en trois phases d'activité motrice. La phase I est une période de repos mécanique, sans activité électrique rapide. La phase II correspond à une activité mécanique irrégulière. Enfin, la phase III est la période la plus courte, durant laquelle chaque onde lente s'accompagne de contractions de forte amplitude et de fréquence importante (Code et Marlett, 1975). Un des rôles physiologiques de la phase III serait d'assurer la propagation des résidus alimentaires du repas et des sécrétions en période interdigestive (Vantrappen et al., 1977).

### **1.2.1.3. Motricité du côlon**

#### 1.2.1.3.1. Mouvements segmentaires

Dans le côlon, les mouvements segmentaires sont, comme dans l'intestin grêle, des contractions anulaires rythmiques qui provoquent le mélange du bol alimentaire avec les enzymes bactériennes et favorisent les échanges hydro-électrolytiques.

#### 1.2.1.3.2. Mouvements de masse

Les mouvements de masse désignent les contractions péristaltiques spécifiques du côlon. L'onde péristaltique est plus puissante et intervient 3 à 4 fois par jour, généralement après les repas. Chaque contraction dure environ 3 minutes. Un mouvement de masse se caractérise par l'apparition d'un anneau de constriction suivie d'une contraction simultanée des muscles longitudinaux sur une large zone distale par rapport à la zone de constriction (Hardcastle et Mann, 1968). Selon les différentes régions du côlon, les mouvements propulsifs sont de deux types. Dans le côlon droit et transverse, ils s'effectuent sur des petits segments de 3 à 4 cm. Dans le côlon gauche et sigmoïde, le mouvement est plus étendu et plus puissant, assurant le remplissage du rectum une à deux fois par jour. Ces contractions propulsent le contenu colique vers le rectum très lentement (5 cm/h).

Un mouvement de masse peut être initié par la distension d'un segment de côlon ou par les réflexes gastro-colique et duodéno-colique faisant intervenir à la fois l'innervation extrinsèque et intrinsèque. Le réflexe gastro-colique fait référence à la contraction du côlon induite par l'entrée d'aliments dans l'estomac. Il consiste en deux phases : la phase rapide (10 min après le repas), initiée par la distension de l'estomac et la phase lente médiée par les hormones GI.

## **1.2.2. Activité sécrétoire du tractus gastro-intestinal**

La digestion est permise par la coordination de la motricité GI et de la sécrétion d'enzymes digestives permettant la dégradation des aliments en nutriments absorbables. De plus, les hormones GI produites par la muqueuse régulent les phénomènes de sécrétion et de motricité digestive.

### **1.2.2.1. Sécrétions enzymatiques**

#### 1.2.2.1.1. Sécrétions gastriques

Dans l'estomac, la digestion des protéines est initiée grâce à la libération de pepsinogène par les cellules principales. Le milieu gastrique acide, stérilisant le bol alimentaire, permet la conversion du pepsinogène en pepsine, sa forme active, qui entame la dégradation des protéines alimentaires. Dans l'estomac, la digestion des glucides est minime. La lipase gastrique initie la digestion des lipides. Le facteur extrinsèque, petite glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales, est indispensable à l'absorption de la vitamine B12 (Tableau 1).

#### 1.2.2.1.2. Sécrétions intestinales, pancréatiques et biliaires

La digestion se poursuit dans l'intestin grêle grâce aux enzymes pancréatiques, à la bile hépatique et aux enzymes de la bordure en brosse (Tableau 1).

Les glucides sont rapidement dégradés en monosaccharides au niveau du duodénum et du jéjunum. La digestion de l'amidon nécessite une première étape intraluminale assurée majoritairement par l'amylase pancréatique qui le transforme en disaccharides. Les celluloses ne sont pas digérées dans l'intestin grêle et parviennent intactes dans le côlon. Les disaccharides et oligosaccharides sont ensuite hydrolysés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. La maltase permet la dégradation du maltose en deux molécules de glucose. La lactase hydrolyse le galactose en glucose et lactose. Enfin, la sucrase dégrade le sucrose en glucose et fructose.

La digestion des protéines, initiée dans l'estomac grâce à la pepsine, se poursuit dans le duodénum grâce aux protéases pancréatiques. La trypsine et la chymotrypsine pancréatiques

clivent les protéines en acides aminés et oligopeptides. Ensuite, les peptides sont transformés en acides aminés grâce aux peptidases et aminopeptidases entérocytaires.

Enfin, la digestion des lipides débute dans l'estomac grâce à la lipase gastrique et se poursuit dans l'intestin grêle grâce aux lipases pancréatiques. Pour que la lipase pancréatique soit efficace, une émulsification préalable des triglycérides par les sels biliaires ainsi que la présence de la colipase sont nécessaires (van Tilbeurgh et al., 1992). Les triglycérides sont ainsi transformés en acides gras et monoglycérides. La carboxyl ester lipase hydrolyse les esters du cholestérol et la phospholipase A2 hydrolyse les phospholipides.

SITE DE LA SÉCRÉTION	QUANTITÉ QUOTIDIENNE (ml)	SÉCRÉTION/ENZYME	ACTION
Glandes salivaires	1 000-1 500	Amylase salivaire (ptyaline)	Amorce de la digestion de l'amidon
Estomac	2 500	Pepsinogène	Digestion des protéines
		HCl	Activation du pepsinogène en pepsine
		Lipase	Digestion des graisses
		Facteur intrinsèque	Essentiel pour l'absorption de la cobalamine dans l'iléum
Intestin grêle	300	Entérokinase	Activation du trypsinogène en trypsine
		Amylase	Digestion des glucides
		Peptidase	Digestion des protéines
		Aminopeptidase	Digestion des protéines
		Maltase	Dégradation du maltose en deux molécules de glucose
		Sucrase	Dégradation du sucrose en glucose et fructose
		Lactase	Dégradation du lactose en glucose et galactose
		Lipase	Digestion des graisses
Pancréas	700	Trypsinogène	Digestion des protéines
		Chymotrypsine	Digestion des protéines
		Amylase	Dégradation de l'amidon en disaccharides
		Lipase	Digestion des graisses
Foie et vésicule biliaire	100	Bile	Émulsification des graisses, favorisant l'absorption des acides gras et des vitamines liposolubles (A, D, E, K)

**Tableau 1 : Sécrétions enzymatiques du système digestif.**

### 1.2.2.2. Peptides gastro-intestinaux

Quand les aliments arrivent dans l'estomac et l'intestin grêle, les cellules endocrines de la muqueuse GI libèrent des peptides dans la circulation sanguine. Les sites de production ainsi que les stimuli à l'origine de la sécrétion des différents peptides sont résumés dans le tableau 2.

La gastrine est sécrétée par les cellules G de l'estomac et du duodénum après stimulation nerveuse et humorale. La voie nerveuse extrinsèque est médiée par les terminaisons gastriques du nerf vague (Debas et Carvajal, 1994) et est déclenchée à la vue ou au contact des aliments alors que la distension de l'estomac stimule la voie nerveuse intrinsèque. L'activation des récepteurs des cellules G par les acides aminés et les polypeptides entraîne également la sécrétion de gastrine (DelValle et Yamada, 1990).

La cholécystokinine (CCK) est une hormone anorexigène sécrétée par les cellules I du duodénum et du jéjunum en réponse à l'arrivée d'acides gras et d'acides aminés dans l'intestin grêle (Lieverse et al., 1994). La stimulation du nerf vague entraîne également la libération de cette hormone.

La sécrétine est sécrétée par les cellules S du duodénum et du jéjunum en réponse à l'arrivée du chyme acide de l'estomac, lorsque le pH descend en dessous de 4 (Li et al., 1990). La libération de sécrétine est également induite par la CCK et la stimulation du nerf vague.

Le peptide inhibiteur gastrique ou polypeptide insulino-trope gluco-dépendant (GIP) est produit par les cellules K du duodénum et du jéjunum, en réponse à l'ingestion d'un repas, en particulier aux lipides ou au glucose (Cataland et al., 1974; Falko et al., 1975).

Le GLP-1 et le GLP-2 (Glucagon-like peptides) sont sécrétés par l'iléon et le côlon suite à la prise alimentaire, en particulier en réponse aux lipides et glucides (Brubaker, 2006; Xiao et al., 1999). Le GLP-1, aux effets anorexigènes constitue avec le GIP les hormones incrétines, qui augmentent la réponse insulinique au glucose pendant l'hyperglycémie postprandiale (Drucker, 2007).

La somatostatine est sécrétée par les cellules D du fundus, de l'intestin grêle et par le pancréas en réponse à un pH acide (Orloff et al., 1992). Elle exerce un contrôle inhibiteur sur la sécrétion de toutes les autres hormones GI.

La leptine gastrique est produite par les cellules endocrines du fundus (Bado et al., 1998). Sa sécrétion est contrôlée par des facteurs nerveux et hormonaux activés par l'ingestion du repas (Sobhani et al., 2000, 2002). La leptine gastrique agit dans l'estomac en activant les afférences vagues pour produire des signaux de satiété. La leptine gastrique amplifierait l'action de la CCK, en activant sa sécrétion (Guilmeau et al., 2003). Elle est également impliquée dans le contrôle de l'absorption des protéines (Guilmeau et al., 2003).

Le PYY, de la famille des polypeptides pancréatiques, à l'effet anorexigène, est produit par les cellules entéroendocrines de l'iléon et du côlon en réponse aux lipides (Adrian et al., 1985). La sécrétion de PYY peut aussi être stimulée par des signaux neurohumoraux originaire de l'intestin proximal, dont la CCK (Castiglione et al., 2002).

La ghréline est un polypeptide orexigène produit par le fundus. Les concentrations circulantes de ghréline augmentent en période interdigestive mais sont faibles après les repas (Cummings et al., 2001; Tschöp et al., 2001).

Enfin, la motiline est sécrétée de manière cyclique par les cellules endocrines M de l'intestin grêle en période interdigestive. Après ingestion d'un repas, les protéines et les lipides augmentent la sécrétion plasmatique de motiline alors que le glucose l'inhibe (Saito et al., 1980). Un pH acide dans le duodénum pourrait également stimuler sa sécrétion.

PEPTIDE	Source	Stimuli activateurs
Gastrine	Antre et duodénum	Distension de l'estomac, peptides et acides aminés
Cholécystokinine CCK	Duodénum et jéjunum	Acides gras et acides aminés dans l'intestin grêle
Sécrétine	Duodénum et jéjunum	Acidité du chyme dans l'intestin grêle, acides aminés, glucose, gastrine
Peptide inhibiteur gastrique GIP	Duodénum et jéjunum	Acides gras, lipides et glucose dans l'intestin grêle
Glucagon-like peptides GLP-1, GLP-2	Iléon et côlon	Lipides et glucides dans l'intestin proximal
Somatostatine	Estomac et intestin grêle	Distension mécanique, acidité du chyme
Leptine	Fundus	Ingestion du repas, CCK, sécrétine
Peptide tyrosine tyrosine PYY	Iléon et côlon	Acides gras
Ghréline	Fundus	Sécrétée en période interdigestive, inhibée par l'ingestion d'aliments
Motiline	Intestin grêle	Sécrétion en période interdigestive

**Tableau 2 : Sites de production et stimuli activateurs de la sécrétion des principaux peptides GI.**

Ces peptides jouent un rôle fondamental dans la régulation de la sécrétion et de la motricité digestive.

#### 1.2.2.2.1. Régulation des sécrétions gastro-intestinales

Tout d'abord, les peptides GI interviennent dans la régulation des sécrétions gastriques. La gastrine et la CCK stimulent la sécrétion d'acide et de pepsinogène par les cellules gastriques alors que la sécrétine, le GIP, le GLP-1, la somatostatine et le PYY l'inhibent (Schubert et Peura, 2008). La somatostatine exerce son effet inhibiteur sur la production d'acide gastrique en bloquant la sécrétion de gastrine (Colturi et al., 1984).

Les sécrétions pancréatiques et biliaires sont également sous l'influence des hormones GI. La CCK entraîne une contraction de la vésicule biliaire et une relaxation du sphincter d'Oddi, ce qui permet à la bile de s'écouler dans le duodénum (Byrnes et al., 1981). Elle stimule également la sécrétion d'enzymes pancréatiques (Li et Owyang, 1993). La sécrétine stimule la sécrétion d'eau et de bicarbonates par le pancréas, ce qui permet la neutralisation du chyme acide dans l'intestin (Chey et Chang, 2003). Elle stimule également la libération de la bile. En revanche, la somatostatine inhibe les sécrétions pancréatiques et biliaires.

#### 1.2.2.2. Régulation des fonctions motrices gastro-intestinales

Les peptides GI jouent un rôle physiologique important dans la régulation de l'activité motrice GI. Ils peuvent avoir une action indirecte (médiée par le système nerveux) ou directe sur les cellules musculaires. Les différents peptides peuvent stimuler ou inhiber l'activité motrice selon les régions du tractus digestif.

Les hormones GI interviennent notamment dans les mécanismes de rétrocontrôle négatif de la vidange gastrique comme le réflexe gastro-duodéal ou le frein iléal. En effet, la CCK et la gastrine, libérées par le duodénum en réponse à l'arrivée du chyme, ralentissent la vidange gastrique (Debas et al., 1975; Chey et al., 1970). Elles augmentent la capacité d'accommodation de l'estomac proximal et stimulent les contractions antrales et pyloriques (Yamagishi et Debas, 1978; Mearadji et al., 1999; Misiewicz et al., 1969). La sécrétine ralentit également la vidange gastrique, en inhibant la contraction de l'antra et la constriction du sphincter pylorique (Kleibeuker et al., 1988). Le GIP est, lui aussi, capable d'inhiber les contractions de l'estomac proximal, ce qui ralentit la vidange gastrique (Valenzuela, 1976). D'autre part, en réponse à la présence de lipides dans l'iléon, le GLP-1, le GLP-2 et le PYY sont sécrétés et inhibent la vidange gastrique (Nauck et al., 1997; Pappas et al., 1986).

Au niveau de l'intestin grêle, la CCK, la gastrine et la motiline stimulent l'activité contractile alors que la sécrétine, le GLP-1 et la somatostatine l'inhibent (Thomas et al., 1979).

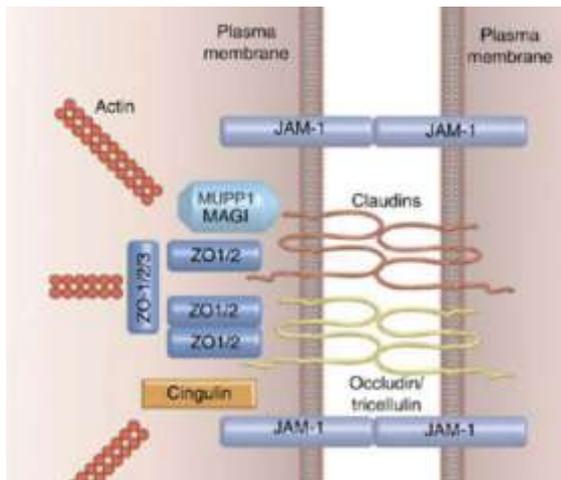
Enfin, en période interdigestive, la ghréline stimule les contractions gastriques de la phase III du CMM et stimule la vidange gastrique (Levin et al., 2006). La motiline stimule les contractions intestinales de la phase III du CMM (Thomas et al., 1979).

### 1.2.3. Fonction de barrière sélective

La BEI doit assurer des rôles complémentaires de perméabilité pour les nutriments et les électrolytes et de barrière défensive efficace contre la pénétration de substances toxiques et d'agents pathogènes. En effet, la muqueuse intestinale agit comme un filtre sélectif pour favoriser le passage des nutriments jusqu'à la circulation générale, tout en contrôlant l'entrée des éléments néfastes (bactéries, antigènes, toxines, virus ...) contenus dans la lumière intestinale.



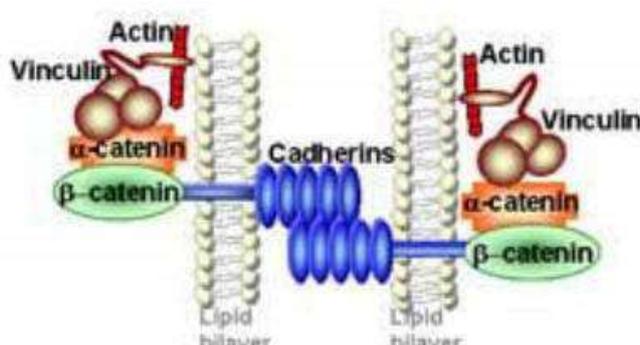
Molécule) (Figure 12). Elles sont reliées au cytosquelette d'actine via les protéines Zonula Occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) et la cinguline (Förster, 2008) (Figure 12). La perméabilité paracellulaire, passage des molécules entre les CEI, est déterminée par la taille et la sélectivité des pores formés par les jonctions serrées ainsi que par leur composition moléculaire (Tsukita et al., 2001).



**Figure 12. Schéma simplifié de l'organisation moléculaire des jonctions serrées.**

Les jonctions serrées relient les cellules épithéliales intestinales entre elles via les protéines transmembranaires claudines, occludine et JAM (Junction Adhesion Molecule) qui sont reliées au cytosquelette d'actine via les protéines ZO (Zonula Adherens). D'après (Niessen, 2007).

Les jonctions adhérentes ou zonula adherens relient les CEI entre elles via des interactions  $Ca^{2+}$ -dépendantes réalisées par la protéine transmembranaire E-cadhérine (Figure 13). La E-cadhérine est reliée par son domaine cytoplasmique aux protéines  $\gamma$ - (ou plakoglobine) ou  $\beta$ -caténine. Le complexe E-cadhérine/plakoglobine ou E-cadhérine/ $\beta$ -caténine est relié au cytosquelette d'actine via les protéines cytoplasmiques  $\alpha$ -caténine,  $\alpha$ -actinine et vinculine (Ebnet, 2008).



**Figure 13. Schéma simplifié de l'organisation moléculaire d'une jonction adhérente**

Les jonctions adhérentes relient les cellules épithéliales intestinales entre elles via la protéine transmembranaire E-cadhérine reliée au cytosquelette d'actine via les protéines  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\beta$ -caténines,  $\alpha$ -caténine,  $\alpha$ -actinine et vinculine. D'après DeMali, KA; University of Iowa.

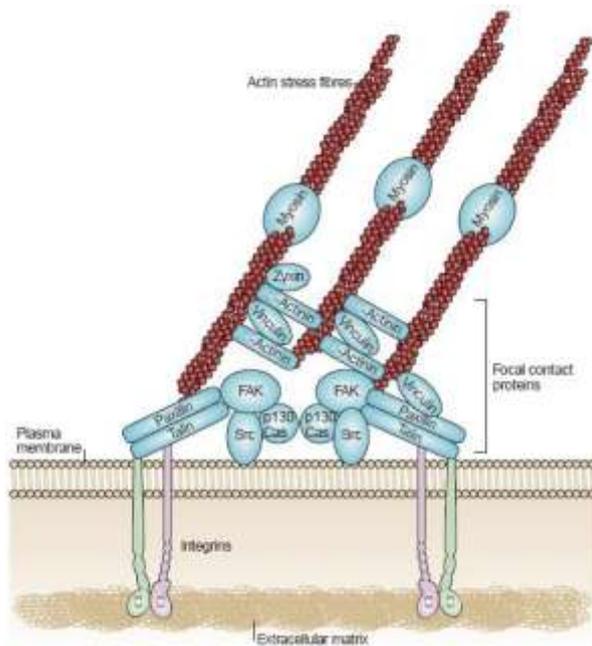
Les desmosomes relient les CEI par leur cytosquelette de filaments intermédiaires composés de cytokératines. Ils permettent à la BEI de résister aux forces de pression et de tiraillement (Garrod et al., 2002).

Enfin, les jonctions communicantes ou gap junctions permettent aux CEI de communiquer entre elles par des signaux chimiques ou électriques. Ces jonctions forment des canaux entre les deux membranes cellulaires de CEI voisines qui peuvent être ouverts ou fermés selon l'état de phosphorylation des connexines, protéines transmembranaires qui les constituent (Prochnow et Dermietzel, 2008).

- Interactions cellule-matrice

Au niveau de leur pôle basolatéral, les CEI adhèrent et établissent des interactions fonctionnelles avec la matrice extracellulaire, constituées par un enchevêtrement complexe de macromolécules dont des polysaccharides et des protéines.

Une des composantes protéiques de la matrice extracellulaire est la fibronectine qui contribue à la fois à organiser la matrice et à favoriser l'adhérence des CEI. Constituée de deux sous-unités, elle forme un réseau fibrillaire et présente des sites d'interactions spécifiques avec les intégrines des CEI (Kaspar et al., 2006). La laminine, complexe protéique constitué de trois chaînes polypeptidiques, présente également plusieurs sites d'interaction avec les intégrines des CEI (Tzu et Marinkovich, 2008). Les structures d'adhésion de la CEI avec sa matrice sont appelées adhésions focales (Figure 14). Les intégrines, liées par leur domaine extracellulaire à la matrice, y sont regroupées en amas. Elles recrutent plusieurs types de protéines (paxilline, taline, vinculine, FAK focal adhesion protein,  $\alpha$ -actinine) qui servent d'intermédiaires de liaison avec le cytosquelette d'actine. Les adhésions focales sont donc formées par un groupe dynamique de protéines de régulation et de structure qui transduisent des signaux entre la matrice extracellulaire et l'intérieur de la cellule via l'activation des intégrines à la surface des cellules. Les héli-desmosomes sont d'autres structures où les intégrines sont impliquées dans l'adhérence des CEI avec leur lame basale.



**Figure 14. Architecture moléculaire d'une adhésion focale**

Au niveau des adhésions focales, le cytosquelette d'actine des cellules épithéliales intestinales est lié à la matrice extracellulaire via les protéines transmembranaires, intégrines et de nombreuses protéines cytoplasmiques. D'après (Mitra et al., 2005).

#### 1.2.3.1.2. Barrière biologique

Les sécrétions des CEI constituent une barrière biologique entre la lumière intestinale et le milieu intracellulaire. Par sa texture visqueuse, la couche de mucus recouvrant l'épithélium constitue une barrière bio-mécanique qui s'oppose à la pénétration de microorganismes, de leurs toxines et des autres substances toxiques présentes dans la lumière intestinale (Katayama et al., 1997). De plus, le mucus empêche l'adhérence des pathogènes à la surface des CEI (Hasnain et al., 2010).

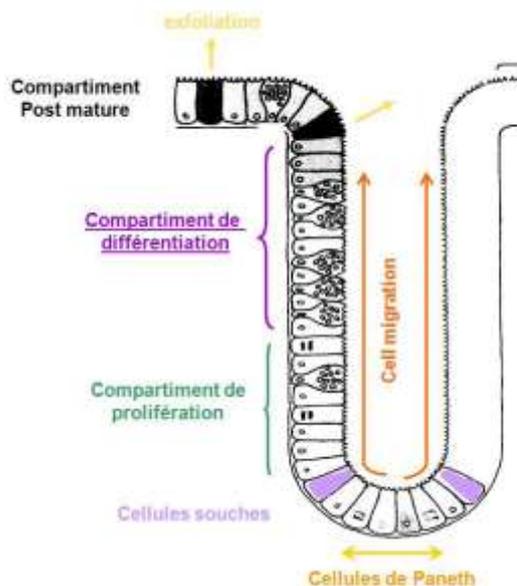
D'autre part, les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens qui limitent la croissance de la flore commensale et des bactéries pathogènes. Les défensines sont une classe de peptides antimicrobiens dont la sécrétion est stimulée par le lipopolysaccharide (LPS) en provenance de la lumière intestinale (Ouellette et Bevins, 2001).

Enfin, un autre mécanisme de protection de la BEI est la sécrétion vectorielle d'eau et d'électrolytes par les entérocytes. En effet, elle permet un flux d'ions et d'eau vers la lumière épithéliale, empêchant ainsi l'adhérence des microorganismes aux CEI (Strohmeier et al., 1997; Resnick et al., 1993).

### 1.2.3.1.3. Homéostasie de la barrière

Le maintien global de la BEI est assuré par un équilibre entre la prolifération et l'exfoliation des CEI ainsi que la capacité réparatrice de la BEI.

L'épithélium est remplacé intégralement tous les 4-5 jours chez l'homme. Ce renouvellement résulte d'une régulation coordonnée de la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration le long des cryptes et enfin de la mort cellulaire résultant en une exfoliation de l'épithélium (Figure 15) (Potten, 1997, 1998). Les différents types de CEI sont issus de la différenciation des cellules souches intestinales présentes au fond des cryptes. Au cours de leur différenciation, les cellules de Paneth migrent vers le fond des cryptes alors que les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines migrent vers le haut des cryptes.



**Figure 15. Schéma simplifié des différents compartiments d'une crypte intestinale.**

La dynamique de renouvellement de la BEI est contrôlée par un équilibre entre les différents compartiments de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire programmée aboutissant à l'exfoliation des CEI. D'après (Potten, 1997).

Le renouvellement cellulaire épithélial rapide, couplé aux mouvements péristaltiques intestinaux, renforce le rôle de protection de la BEI. En effet, ils préviennent la prolifération des bactéries dans l'intestin ainsi que leur absorption à travers la muqueuse intestinale (Nieuwenhuijs et al., 1998).

D'autre part, la BEI est en permanence soumise à des agressions telles que le passage du bol alimentaire pouvant conduire à la formation de lésions (Chaturvedi et al., 2007). Lors

de conditions pathologiques, comme l'invasion par des pathogènes ou lors d'états inflammatoires chroniques, d'importantes desquamations de l'épithélium peuvent se produire. D'importants processus de réparation de la BEI sont alors nécessaires pour assurer un retour à l'homéostasie. Les processus de réparation de la BEI s'effectuent en trois étapes (Sturm et Dignass, 2008). Tout d'abord, la restitution épithéliale consiste en la migration et l'étalement des cellules viables entourant la zone lésée afin de rétablir la continuité de la BEI. Cette restitution épithéliale résulte directement de la motilité de la CEI, indépendamment de la prolifération cellulaire (Mammen et Matthews, 2003). Ensuite les deux étapes de prolifération et de différenciation des CEI aboutiront à une régénération de la continuité et des fonctions de la BEI.

### **1.2.3.2. Perméabilité de la barrière épithéliale intestinale**

Le contrôle des flux à travers la BEI utilise deux voies principales :

- une voie paracellulaire contrôlée par les jonctions serrées
- une voie transcellulaire faisant intervenir des pompes et des canaux spécialisés de la membrane plasmique.

#### **1.2.3.2.1. Perméabilité paracellulaire**

Les jonctions serrées contrôlent la perméabilité paracellulaire, c'est-à-dire le passage d'électrolytes et de petites molécules à travers l'épithélium via les pores qu'elles forment entre les CEI (0,3 nm de diamètre). Les protéines des jonctions serrées, en modulant la taille des pores, régulent le passage paracellulaire d'électrolytes et de molécules selon leur taille mais aussi leur charge (Colegio et al., 2002; Tang et Goodenough, 2003). L'ouverture des jonctions serrées peut être due à des modifications de l'expression et/ou de la localisation des protéines qui les constituent mais aussi à la contraction de l'anneau périjonctionnel d'actine-myosine. De plus, certaines molécules associées aux jonctions serrées, notamment la protéine ZO-1, seraient impliquées dans les phénomènes de prolifération et différenciation des CEI (Balda et al., 2003).

La perméabilité paracellulaire intestinale est modulée par différents facteurs comme des facteurs de croissance, des protéases, des cytokines, des agents pathogènes et des nutriments (Daugherty et Mrsny, 1999). L'absorption de certains nutriments, comme le glucose ou certains acides aminés, résulte en une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Turner

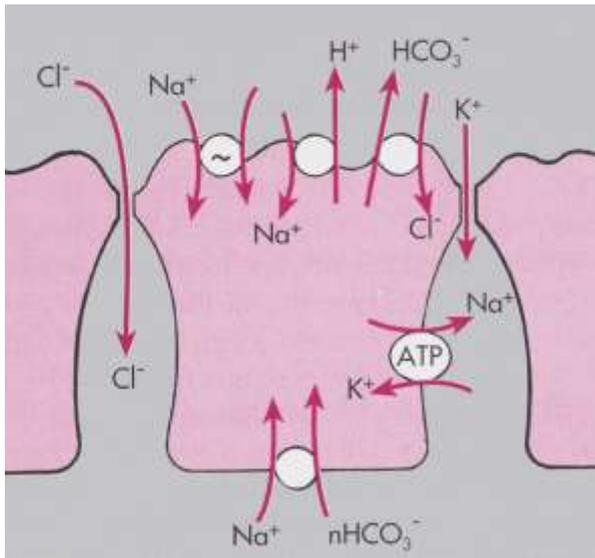
et Madara, 1995). En effet, au sein de l'entérocyte, le transport intracellulaire des nutriments s'accompagne d'une entrée d'eau et d'une augmentation de la concentration intracellulaire en  $\text{Na}^+$ , qui entraîne une activation de la Myosine Light Chain Kinase (MLCK). La MLCK phosphoryle ensuite la myosine et entraîne une contraction de l'anneau périfonctionnel des jonctions serrées, ce qui permet leur ouverture (Daugherty et Mrsny, 1999). D'autre part, les agents pathogènes et leurs toxines peuvent entraîner des altérations des propriétés de la BEI, résultant en une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Par exemple, une infection à *E. Coli* ou un traitement avec du  $\text{TNF-}\alpha$  entraîne un changement de localisation des protéines ZO-1, occludine et claudine, témoignant d'une destruction des jonctions serrées et d'une perte de l'intégrité de la muqueuse (Li et al., 2008; Muza-Moons et al., 2004).

#### 1.2.3.2.2. Perméabilité transcellulaire

La perméabilité transcellulaire permet le passage des nutriments, de l'eau et des électrolytes à travers les entérocytes, vers la circulation sanguine. Selon leurs propriétés, les molécules peuvent traverser l'épithélium de manière passive ou active, par diffusion ou par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques.

- Absorption de l'eau et des électrolytes

L'absorption active des électrolytes et de l'eau par les CEI s'effectue par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, le  $\text{Na}^+$  pénètre au pôle apical des entérocytes grâce au cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose ou  $\text{Na}^+$ /acide aminé et grâce à l'antiport  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$ , selon un gradient de concentration maintenu par la pompe ATPase  $\text{Na}^+$ / $\text{K}^+$  située dans la membrane basolatérale (Figure 16). Cette absorption entraîne une légère électronégativité luminale et une absorption d'eau qui concentre les ions dans la lumière intestinale. Il en résulte une absorption d'anions  $\text{Cl}^-$  par des voies paracellulaire et transcellulaire (Figure 16). La voie transcellulaire est permise par un transporteur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  au niveau de la membrane apicale des entérocytes, qui fait apparaître une sécrétion d'ions  $\text{HCO}_3^-$  en échange de l'absorption de  $\text{Cl}^-$ . Cette absorption de  $\text{NaCl}$  résulte également en une absorption d'eau qui concentre les ions  $\text{K}^+$  dans la lumière intestinale et favorise leur passage par la voie paracellulaire.



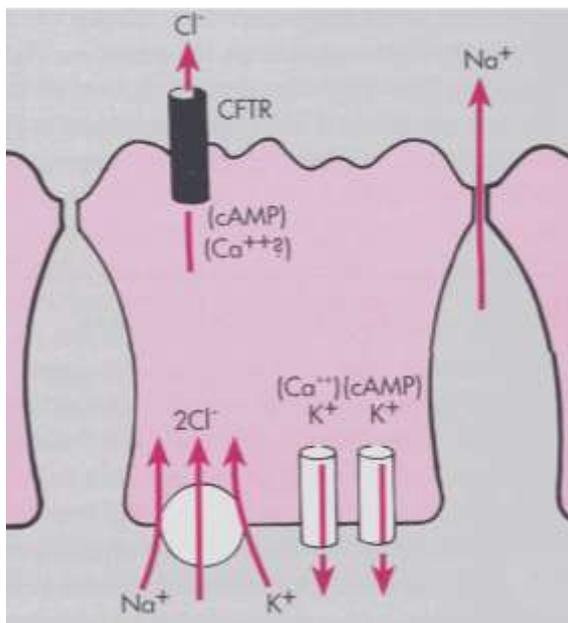
**Figure 16. Absorption des électrolytes dans les entérocytes.**

Une absorption nette de Na<sup>+</sup> et de Cl<sup>-</sup> s'effectue dans l'intestin grêle. Une sécrétion de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> apparaît en échange de l'absorption des ions Cl<sup>-</sup>. Les ions K<sup>+</sup> traversent la BEI par voie paracellulaire.

[http://www.chusa.upmc.fr/pedagogie/dcem1/eia\\_hge/DCEM1\\_Physiologie\\_digestive\\_2.pdf](http://www.chusa.upmc.fr/pedagogie/dcem1/eia_hge/DCEM1_Physiologie_digestive_2.pdf)

- Sécrétion de l'eau et des électrolytes

Au niveau des cryptes, les ions Cl<sup>-</sup> pénètrent au pôle basolatéral des CEI grâce au cotransport triple Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2 Cl<sup>-</sup> (Figure 17). Ils sont ensuite sécrétés au pôle apical par des canaux CFTR. Les ions K<sup>+</sup> sont évacués au pôle basolatéral à travers les canaux K<sup>+</sup>. La sécrétion de Cl<sup>-</sup> entraîne la sécrétion de Na<sup>+</sup> par voie paracellulaire et la sécrétion d'eau (Figure 17). Dans la cellule au repos, les canaux Cl<sup>-</sup> sont fermés mais leur ouverture peut être induite par une hormone ou un neurotransmetteur.



**Figure 17. Sécrétion des électrolytes par les entérocytes.**

Les ions Cl<sup>-</sup> sont sécrétés au pôle apical à travers les canaux CFTR. La sécrétion de Cl<sup>-</sup> entraîne la sécrétion de Na<sup>+</sup> par voie paracellulaire.

[http://www.chusa.upmc.fr/pedagogie/dcem1/eia\\_hge/DCEM1\\_Physiologie\\_digestive\\_2.pdf](http://www.chusa.upmc.fr/pedagogie/dcem1/eia_hge/DCEM1_Physiologie_digestive_2.pdf)

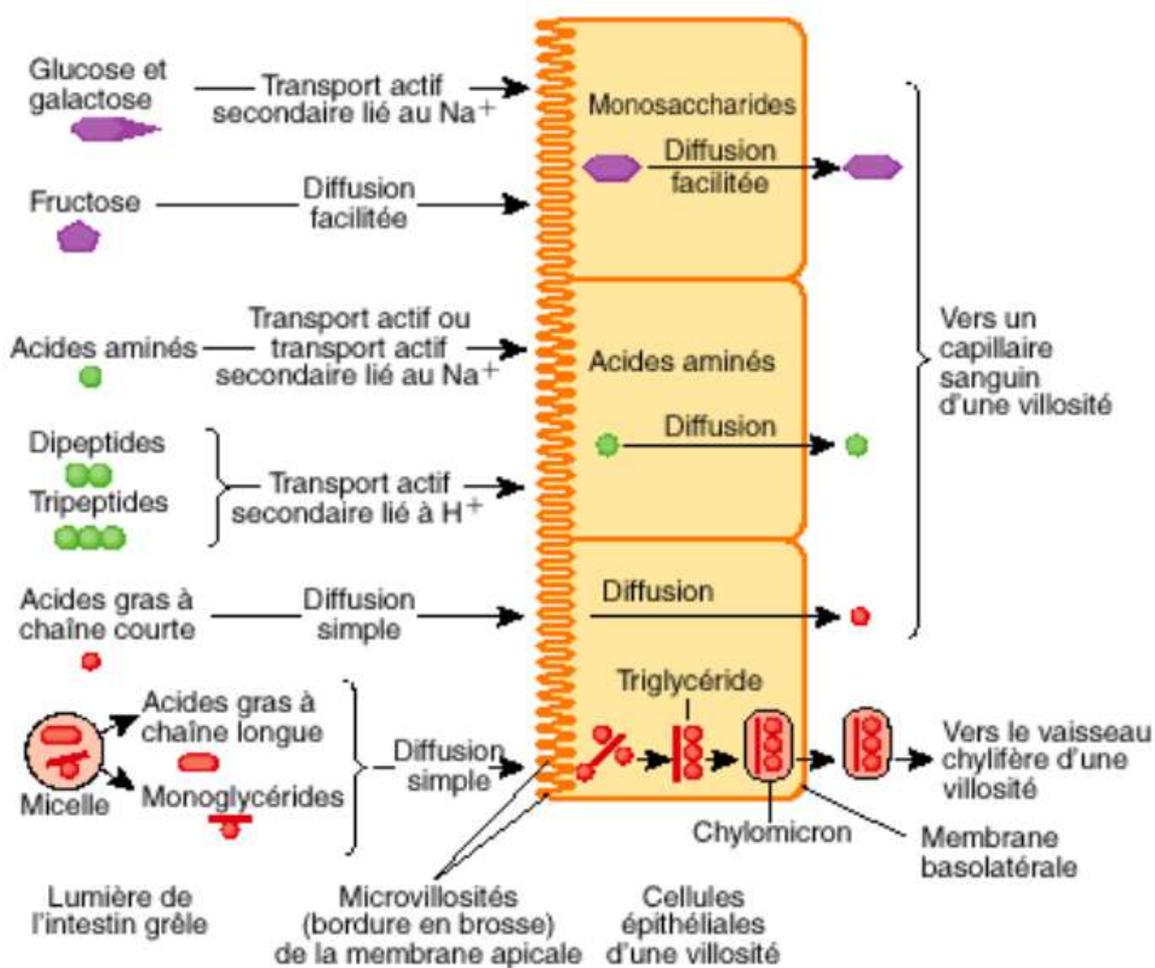
- Absorption des nutriments

Les acides gras libres, les monoglycérides et le cholestérol, formés sous l'action des enzymes pancréatiques sont contenus dans les micelles, sphères chargées négativement formées par les acides biliaires. Ces micelles sont endocytées dans l'intestin grêle et les lipides entrent ainsi à l'intérieur des entérocytes (Figure 18). Les acides gras à longue chaîne sont aidés dans leur diffusion par une protéine de transport, la MVM-FABP (microvillous membrane fatty acid-binding protein), dont l'activité dépend du gradient de  $\text{Na}^+$  (Stremmel et al., 1985). A l'intérieur de l'entérocyte, les lipides sont transportés dans le cytosol grâce aux protéines de transport FABP (fatty acid binding protein) et SCP (sterol carrier protein). Les AG à moins de 11 carbones diffusent directement vers la veine porte alors que les AG à plus de 12 carbones subissent une réestérification dans le réticulum endoplasmique. Les triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol reformés sont empaquetés dans des chylomicrons, recouverts d'apolipoprotéines, et stockés dans l'appareil de Golgi avant d'être exocytés dans la lymphe (Caspary, 1992).

Les monosaccharides (glucose, fructose, galactose), même s'ils peuvent diffuser à travers la membrane plasmique, sont majoritairement transportés dans les entérocytes par des transporteurs spécifiques (Figure 18) (Caspary, 1992). Le fructose entre dans l'entérocyte grâce au transporteur GLUT5 présent au niveau du pôle apical et ressort vers la circulation sanguine grâce à GLUT2 au niveau basolatéral (Jones et al., 2011). Le transport du fructose ne consomme pas d'énergie et s'effectue selon un gradient de concentration. Au contraire, le glucose et le galactose entrent dans l'entérocyte grâce à un cotransporteur sodium dépendant, appelé SGLT qui couple leur passage avec celui d'ions  $\text{Na}^+$  (Hopfer et Groseclose, 1980). Ce transport actif nécessite de l'énergie et peut aller contre le gradient de concentration. En effet, ce sont les ions  $\text{Na}^+$ , qui passent passivement selon leur gradient électrochimique, qui fournissent l'énergie permettant au glucose de passer contre son gradient de concentration. Le maintien du gradient  $\text{Na}^+$  est assuré par les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrane basolatérale. Le glucose est ensuite transporté passivement à travers la membrane basolatérale vers le sang par des transporteurs GLUT2 (Cheeseman, 1993).

Un mécanisme dépendant du sodium, similaire à celui du glucose et du galactose, existe pour les acides aminés neutres (Figure 18). Le transport apical des di- et tripeptides serait assuré par un transport actif alimenté par un gradient électrochimique  $\text{H}^+$ , faisant intervenir le

transporteur PepT1 en particulier (Adibi, 1997). Le gradient de protons est maintenu par un antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  grâce à un gradient entrant des ions  $\text{Na}^+$ .



**Figure 18. Mécanismes par lesquels les nutriments traversent les CEI.**

<http://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-902-m.f/bio903/Digestif/absorption.htm>

- Absorption des macromolécules

De par leur taille, les macromolécules ou les structures cellulaires, telles que les bactéries ou les cellules apoptotiques, ne peuvent pas traverser la membrane plasmique des entérocytes par diffusion ou grâce à des transporteurs protéiques. Leur absorption est permise par des phénomènes d'endocytose. En particulier, les éléments solides, tels que les grosses particules, les bactéries ou les fragments cellulaires peuvent pénétrer à l'intérieur des entérocytes par phagocytose (Neal et al., 2006; Lu et Walker, 2001). La pinocytose permet, quant à elle, l'absorption des molécules en solution (Walker et Isselbacher, 1974). Par invagination de sa membrane plasmique, l'entérocyte absorbe des gouttelettes de liquide

extracellulaire, les redirige sous forme de vésicules dans le cytoplasme et les transfère dans la circulation générale par exocytose. Ainsi, chez le nouveau-né, les immunoglobulines sont absorbées par l'entérocyte et transférées vers la circulation lymphatique (Paupé et Meyer, 1969). La macromolécule HRP (Horseradish peroxidase, 40 kDa) traverse également la BEI par pinocytose (Walker et al., 1972).

## **2. LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE**

### **2.1. Caractéristiques générales du système nerveux entérique**

#### **2.1.1. Découverte du système nerveux entérique**

L'existence de neurones dans la paroi intestinale fut décrite pour la première fois dans les années 1860 par Meissner et Auerbach, qui identifièrent deux plexus nerveux distincts : le plexus de Meissner ou sous-muqueux et le plexus d'Auerbach ou myentérique (Auerbach, 1864; Olsson et Holmgren, 2001; Timmermans et al., 1997). En 1893, Cajal établit l'existence de plusieurs types de neurones entériques et en 1899, Dogiel réalisa une classification de ces différents types neuronaux selon leur morphologie (Dogiel, 1899).

Les premiers travaux sur les fonctions des neurones entériques furent initiés en 1899 par Bayliss et Starling chez le chien (Bayliss et Starling, 1899). Sur des anses intestinales isolées, ils observèrent que le mouvement du contenu luminal s'accompagnait d'une contraction dans le sens oral et d'une relaxation dans le sens anal. Ils montrèrent que ces contractions polarisées résultaient de réflexes coordonnés induits par une stimulation mécanique de l'intestin et conduits par un système nerveux intrinsèque. Ils définirent alors la « loi de l'intestin » et identifièrent le plexus d'Auerbach comme responsable du contrôle de ce réflexe (Bayliss et Starling, 1899, 1900). Leurs travaux furent complétés par Langley qui montra que les contractions intestinales persistaient après dégénérescence des afférences nerveuses, prouvant le caractère intrinsèque de ce réflexe (Langley et Magnus, 1905). En 1921, le système nerveux entérique (SNE) fut défini comme la troisième division du système nerveux autonome.

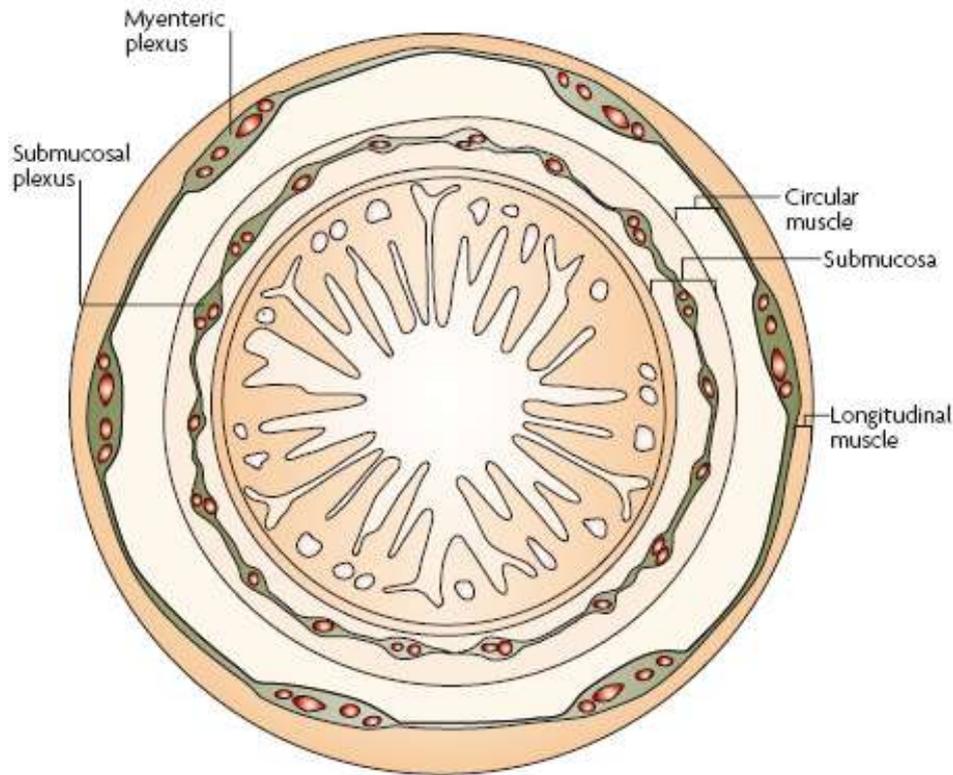
Cependant, le SNE a longtemps été considéré comme un simple relais post-ganglionnaire du système nerveux parasympathique. Ce n'est qu'à partir des années 1970 que les travaux de Gershon, Costa, Furness, Wood et North ont permis un essor de la caractérisation du SNE et de ses fonctions grâce au développement, d'une part, des techniques d'immunohistochimie et de traçage neuronal et, d'autre part, des techniques d'électrophysiologie et de neuropharmacologie.

### **2.1.2. Organisation du système nerveux entérique**

Le SNE est un système nerveux intégratif qui innerve l'ensemble du tractus GI. Il se compose de deux plexus principaux : le plexus sous-muqueux et le plexus myentérique. Ces plexus sont organisés en ganglions reliés entre eux par des fibres interganglionnaires. Les ganglions contiennent à la fois les corps cellulaires des neurones et les cellules gliales entériques (CGE). Ainsi, chez l'homme, le SNE est composé de plus de 100 millions de neurones et plus de 400 millions de cellules gliales (Rühl et al., 2004; Goyal et Hirano, 1996).

Le plexus sous-muqueux (ou plexus de Meissner), localisé sous la muqueuse (Figure 19), est présent du duodénum au rectum. Il n'existe pas dans l'estomac, où seuls quelques neurones sous-muqueux indissociables peuvent être observés (Anlauf et al., 2003). Le plexus sous-muqueux contrôle principalement les fonctions de la muqueuse intestinale.

Le plexus myentérique (ou plexus d'Auerbach), localisé entre la couche musculaire longitudinale externe et la couche musculaire circulaire interne (Figure 19), est présent de l'œsophage au rectum. Le plexus myentérique régule principalement les fonctions de motricité.



**Figure 19. Représentation schématique d'une coupe transversale de l'intestin.**

Le SNE est organisé en deux plexus principaux : le plexus myentérique situé entre la couche musculaire circulaire et la couche musculaire longitudinale ; et le plexus sous-muqueux situé à proximité de la muqueuse. D'après (Heanue et Pachnis, 2007).

Le plexus sous-muqueux et le plexus myentérique diffèrent par leur topographie, leur morphologie et le phénotype neurochimique des neurones qui les composent. En particulier, le plexus myentérique présente une densité de neurones plus importante que le plexus sous-muqueux (Timmermans et al., 1997; Wedel et al., 1999; Furness, 2000). Deux autres plexus, le plexus de la *muscularis mucosae* et le plexus muqueux ne présentent pas de structures ganglionnaires (Wedel et al., 1999). D'autre part, le nombre et l'organisation des plexus du SNE varient selon les espèces, suggérant une adaptation du SNE au cours de l'évolution. Chez le cobaye, seul un plexus sous-muqueux est présent alors que chez le porc, il en existe deux : le plexus de Meissner localisé dans la sous-muqueuse et le plexus de Schabadasch reposant sur la couche musculaire circulaire (Balemba et al., 2002). Chez l'homme, un troisième plexus sous-muqueux, plexus intermédiaire de Henlé, est localisé entre le plexus de Meissner et le plexus de Schabadasch (Timmermans et al., 1997; Wedel et al., 1999). Des communications étroites existent entre les différents plexus, permettant de coordonner les

fonctions de sécrétion et de motricité (Cooke et al., 1993). Le SNE forme également des projections vers les ganglions coeliaques et mésentériques (Szurszewski et al., 2002) ainsi que vers le pancréas (Anglade et al., 1987; Kirchgessner et Gershon, 1988) et la vésicule biliaire (Mawe et Gershon, 1989).

### **2.1.3. Composants cellulaires du système nerveux entérique**

#### **2.1.3.1. Les neurones entériques**

Les neurones composant le SNE ont été classés selon différents critères comme leur morphologie, leurs propriétés électrophysiologiques ou leur codage neurochimique. Ces classifications historiques sont aujourd'hui moins utilisées et sont remplacées par des classifications fonctionnelles.

##### 2.1.3.1.1. Caractéristiques morphologiques

La plus ancienne classification des neurones entériques, initiée il y a plus d'un siècle par Dogiel, est basée sur leurs caractéristiques morphologiques. En effet, Dogiel a réalisé une étude descriptive des différentes formes de neurones myentériques et sous-muqueux chez l'homme, le cobaye, le lapin, le rat, le chien et le chat (Dogiel, 1899). Trois principaux types neuronaux ont pu se distinguer et ont été appelés Dogiel I, II et III (Dogiel, 1899). Des études plus récentes ont élargi cette classification de I à VII en ajoutant quatre autres types neuronaux (Timmermans et al., 1997; Furness et al., 1988) mais la plupart des neurones entériques sont de type I, II ou III (Hansen, 2003).

##### 2.1.3.1.2. Propriétés électrophysiologiques

La deuxième classification des neurones entériques est basée sur leurs caractéristiques électrophysiologiques (Lomax et Furness, 2000). Les premiers enregistrements intracellulaires permettant de décrire les propriétés électriques des neurones datent des années 1970 (Nishi et North, 1973; Wood et Mayer, 1978; Hirst et al., 1974). Trois types de neurones entériques avaient alors pu être mis en évidence. Cependant, le troisième type, non excitable, correspondait aux CGE. Dans l'intestin de cobaye, les neurones entériques ont donc été classés en deux catégories : les neurones de type S (synaptic) et les neurones de type AH (after hyperpolarisation) (Hirst et al., 1974).

Les neurones de type S présentent des potentiels d'action (PA) brefs suivis d'un potentiel d'hyperpolarisation de courte durée (20 à 200 ms). Les PA des neurones S sont bloqués par la tétrodotoxine (TTX). Ils présentent un potentiel excitateur post-synaptique (PPSE) rapide et la composante PPSE est assez élevée pour générer un PA. Les neurones de type S présentent majoritairement une morphologie de type Dogiel I ou III (Furness et al., 2004).

Les neurones de type AH se caractérisent par des PA assez larges (amplitude de 75 à 110 mV), d'une durée supérieure à celle des PA des neurones S et suivis par un large potentiel d'hyperpolarisation. Leurs PA sont insensibles à la TTX. Les neurones AH présentent une inflexion caractéristique dans la phase descendante de repolarisation, normalement suivie de deux phases séparées d'hyperpolarisation (Hirst et al., 1974). Les neurones AH ne présentent pas de PPSE marqué. Les neurones de type AH sont de morphologie Dogiel II (Furness et al., 2004).

#### 2.1.3.1.3. Le phénotype neurochimique

Les neurones entériques produisent et libèrent des substances chimiques variées, appelées neuromédiateurs, qui leur permettent de communiquer entre eux et avec les cellules cibles effectrices (McConalogue et Furness, 1994). Plus d'une trentaine de neuromédiateurs ont été répertoriés dans le SNE et jusqu'à onze molécules différentes ont pu être détectées au sein d'un même neurone entérique (Schemann et Neunlist, 2004). Les neurones entériques expriment en général une combinaison de plusieurs de ces neuromédiateurs définissant leur codage neurochimique (ou phénotype neurochimique). Les neuromédiateurs peuvent être classés selon leur action excitatrice ou inhibitrice sur les cellules cibles (Tableau 3). Ces substances sont de petites molécules telles que la sérotonine (5-HT), l'acétylcholine (ACh) ou l'adénosine triphosphate (ATP), des peptides comme le vasointestinal peptide (VIP) ou encore des gaz tels que le monoxyde d'azote (NO).

Stimulation	Inhibition
Ach, ATP, 5-HT, Histamine, Neurokinine A, SP, CCK, GRP, Motiline, Bombésine, Opioides, TRH, PGE2	NO, VIP, Somatostatine, GABA, CGRP, NPY, Galanine, Glucagon, Neurotensine, PACAP, PHI, PYY, Sérotonine, Dopamine

**Tableau 3. Principaux neurotransmetteurs et substances neurohumorales.**

Ach, acétylcholine ; ATP, adénosine triphosphate ; 5-HT, sérotonine ; SP, substance P ; CCK, cholécystokinine ; GRP, gastrin releasing polypeptide ; TRH, thyrotropin-releasing hormone ; PGE2, prostaglandine E2 ; NO, nitric oxide ; VIP, vasoactive intestinal polypeptide ; GABA, gamma butyric acid ; CGRP, calcitonin gene-regulated peptide ; NPY, neuropeptide Y ; PACAP, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide ; PHI, peptide histidine isoleucine ; PYY, peptide YY. D'après (Hansen, 2003).

#### 2.1.3.1.4. Caractéristiques fonctionnelles des neurones

Différents types fonctionnels de neurones ont pu être identifiés dans l'intestin grêle (Furness, 2000), le côlon (Lomax et Furness, 2000) et l'estomac (Schemann et al., 1995; Reiche et al., 1998) de cobaye (Figure 20). En effet, les neurones du SNE forment un réseau intégratif organisé en neurones sensitifs, interneurones et neurones moteurs.

- Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPANs)

Les IPANs, qui représentent environ 20% des neurones entériques, possèdent leurs corps cellulaires, leurs prolongements et leurs synapses dans le tube digestif contrairement aux neurones afférents extrinsèques, dont les corps cellulaires sont situés dans les ganglions jugulaires et nodaux (afférents vagues) ou dans les ganglions de la racine dorsale (afférents spinaux) (Furness et al., 1998). Les IPANs correspondent à des neurones AH avec une morphologie Dogiel II (Furness et al., 1998) (Figure 20). Leur principale fonction consiste à traduire et codifier les informations concernant l'environnement chimique et l'état physique du tube digestif. Ils expriment les neuromédiateurs Ach, calbindine, SP et le CGRP (Furness, 2000) (Tableau 4). Néanmoins, des données récentes suggèrent que certains interneurones et neurones moteurs possèdent également des propriétés de neurones sensitifs en répondant directement à une stimulation mécanique (Mazzuoli et Schemann, 2009).

- Les interneurones

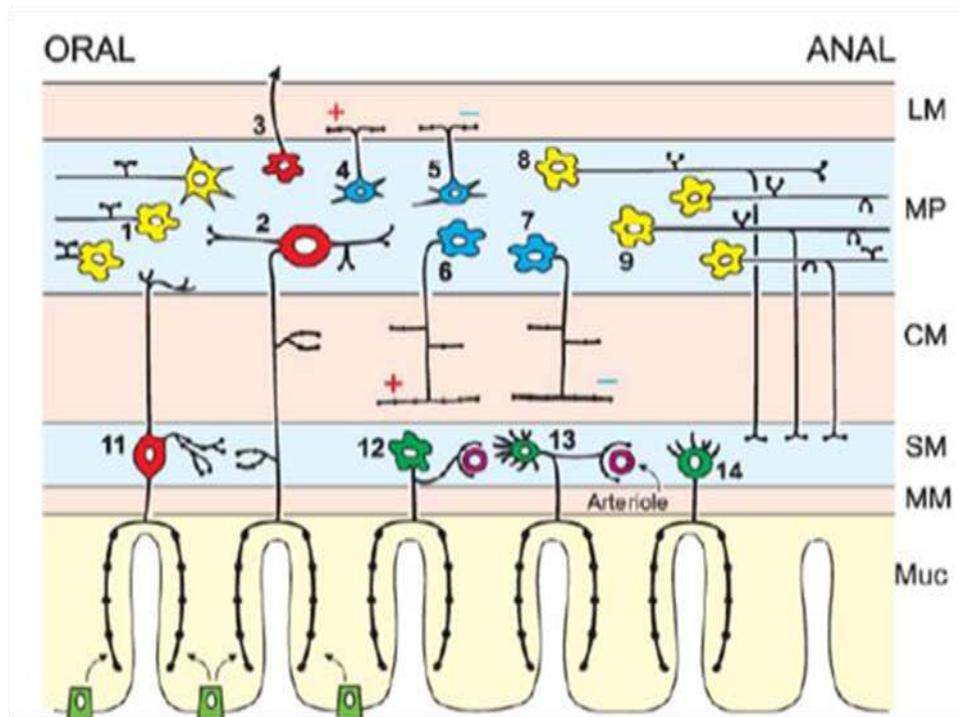
Les interneurones, qui constituent la majorité des neurones entériques, forment des chaînes qui s'étendent dans le sens anal ou oral dans le plexus myentérique (Pompolo et Furness, 1993) (Figure 20). Leur rôle est d'intégrer et de transmettre l'information sensorielle aux neurones moteurs. Dans l'intestin de cobaye, un seul type d'interneurones ascendants et trois types d'interneurones descendants ont été identifiés (Figure 20). Les interneurones ascendants, dont l'axone projette dans la direction orale, expriment l'Ach, la SP et la calrétinine (Brookes et al., 1997) (Tableau 4). Les interneurones ascendants communiquent entre eux via l'Ach. Les interneurones descendants, dont l'axone projette dans la direction anale, sont de trois types :

- les interneurones Ach/NO/VIP
- les interneurones Ach/5-HT
- les interneurones Ach/SOM (Tableau 4).

- Les neurones moteurs

Les neurones moteurs présentent majoritairement un comportement électrophysiologique de type S (Brehmer et al., 1999). Ils transmettent l'information provenant des interneurones vers les cellules effectrices. Il existe cinq types de neurones moteurs chez le cobaye :

- les neurones moteurs excitateurs du muscle, qui sont majoritairement cholinergiques chez l'homme alors que chez le cobaye, ils expriment également la ChAT mais aussi des tachykinines, l'enképhaline et la calrétinine (Furness, 2000) (Tableau 4),
- les neurones moteurs inhibiteurs du muscle, qui expriment la NOS dans la plupart des espèces mais qui peuvent aussi exprimer l'ATP, le VIP, le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) et le CO (monoxyde de carbone) (Furness, 2000) (Tableau 4),
- les neurones sécrétomoteurs/vasodilatateurs, qui sont soit non cholinergiques exprimant le VIP, soit cholinergiques co-exprimant la calrétinine (Tableau 4),
- les sécrétomoteurs/non vasodilatateurs, cholinergiques co-exprimant le neuropeptide Y (NPY) (Tableau 4),
- les neurones innervant les cellules endocrines de l'estomac qui ne seront pas abordés ici (Furness, 2000) (Figure 20).



**Figure 20. Classement des neurones entériques selon leurs propriétés fonctionnelles.**

Schéma représentant les différents types de neurones dans l'intestin grêle de cobaye, classés selon leurs fonctions, leur morphologie et leur codage neurochimique. Les neurones primaires afférents intrinsèques (IPAN) myentériques (2) et sous-muqueux (11) sont en rouge, de même qu'un neurone afférent intestinofuge (3). Les interneurones ascendants (1) et descendants (8 et 9) sont en jaune. Les motoneurones inhibiteurs (5 et 7) et excitateurs (4 et 6) en bleu. Les neurones sécrétomoteurs/vasodilatateurs non cholinergiques (12) et cholinergiques (13) et les neurones sécrétomoteurs non vasodilatateurs (14) sont en vert.

LM : muscle longitudinal ; MP : plexus myentérique ; CM : muscle circulaire ; SM : plexus sous-muqueux ; MM : Musculeuse muqueuse ; Muc : Muqueuse. D'après (Furness, 2000).

Fonction	codage neurochimique
IPAN	ChAT, Calb, CGRP, SP
Interneurones ascendants	ChAT, Calret, ENK, SP
Interneurones descendants	5-HT, ChAT, DYN, GRP, NOS, somatostatine, VIP
Neurones moteurs excitateurs	ChAT, Calret, ENK, SP
Neurones moteurs inhibiteurs	DYN, ENK, GRP, NOS, VIP
Neurones sécrétomoteurs	ChAT, CCK, CGRP, DYN, NPY, somatostatine, VIP

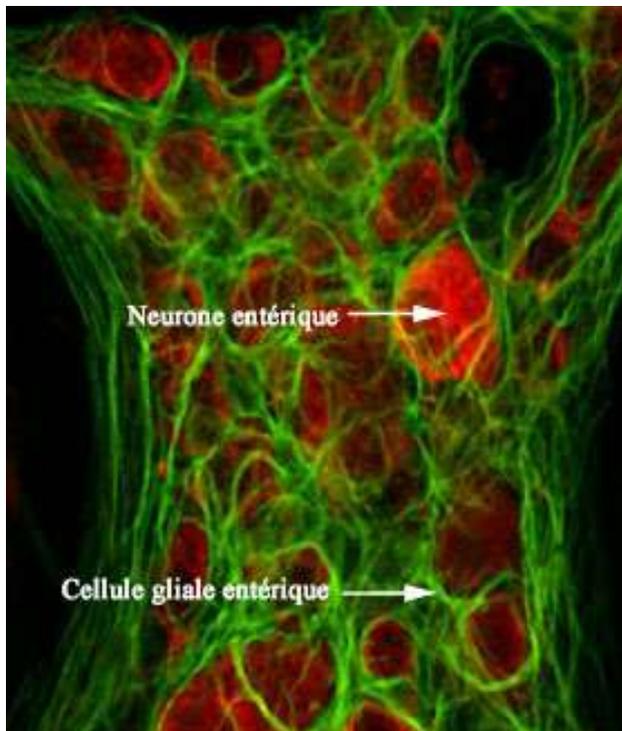
**Tableau 4. Codage neurochimique des neurones entériques selon leur type fonctionnel.**

IPAN : intrinsic primary afferent neurons ; ChAT : choline acétyltransférase ; Calb : calbindine ; CGRP : calcitonin gene-related peptide ; SP : substance P ; Calret : calrétinine ; ENK : enképhalines ; 5-HT : sérotonine ; DYN : dynorphine ; GRP : gastrin releasing peptide ; NOS : nitric oxide synthase ; VIP : vasoactive intestinal peptide ; NPY : neuropeptide Y. D'après (Hansen, 2003).

### 2.1.3.2. Les cellules gliales entériques

#### 2.1.3.2.1. Morphologie et marqueurs spécifiques des cellules gliales entériques

Du fait de leurs propriétés, les cellules gliales entériques (CGE) présentent de nombreuses similitudes avec les astrocytes du système nerveux central (Cabarrocas et al., 2003). Ce sont de petites cellules étoilées entourant les corps cellulaires des neurones au sein des ganglions et les fibres interganglionnaires des plexus myentérique et sous-muqueux (Figure 21). Au sein des ganglions, les CGE présentent des extensions courtes et sont empaquetées autour des neurones alors qu'au niveau des fibres interganglionnaires, elles présentent des extensions très longues qui entourent les axones de plusieurs neurones.

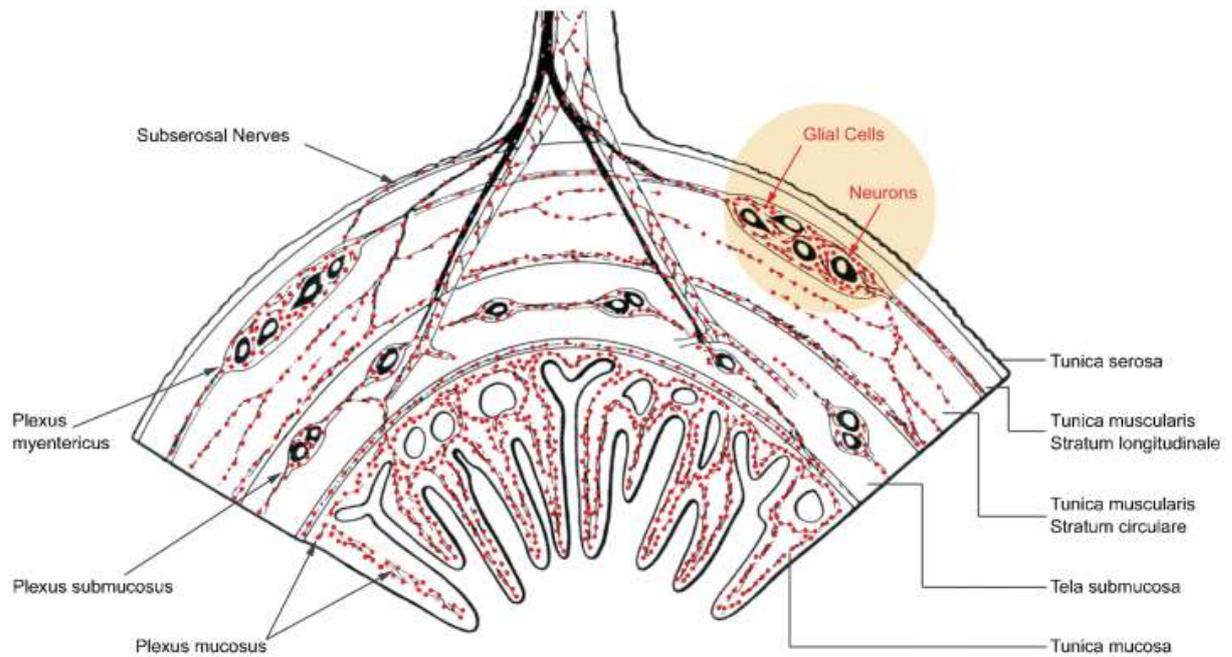


**Figure 21. Cellules gliales entériques au sein d'un ganglion.**

Photographie d'immunohisto-fluorescence.

Les neurones sont visualisés avec un anticorps dirigé contre la protéine Hu (en rouge) et les CGE sont visualisées avec un anticorps dirigé contre la GFAP (en vert).

Les CGE forment ainsi un réseau dense tout au long du tube digestif (Rühl, 2005) (Figure 22). Elles sont également présentes à proximité de la barrière épithéliale intestinale où elles entourent les villosités et les vaisseaux sanguins (Figure 22) (Gershon et Bursztajn, 1978; Neunlist et al., 2007). Le réseau glial représente un véritable syncytium fonctionnel car les CGE communiquent entre elles via des jonctions communicantes (gap junctions) de façon similaire aux astrocytes (Maudlej et Hanani, 1992).



**Figure 22. Localisation des cellules gliales entérique dans le tube digestif.**

Schéma d'une coupe transversale de la paroi digestive présentant les plexus formant le système nerveux entérique et les cellules gliales entériques ou CGE (glial cells) présentées sous forme de pointillés rouges. Les CGE forment un réseau cellulaire très dense associé aux neurones au sein des plexus myentérique et sous-muqueux mais aussi dans les plexus aganglionnaires où elles seraient associées aux fibres nerveuses. D'après (Rühl, 2005).

La densité de CGE varie en fonction de l'espèce et du plexus (Gabella et Trigg, 1984). Ainsi, chez le cobaye, le ratio nombre de CGE/nombre de neurones est d'environ 0,9 dans le plexus sous-muqueux et de 1,7 dans le plexus myentérique (Hoff et al., 2008). Chez l'homme, il est en moyenne de 1,6 dans le plexus sous-muqueux et de 6,5 dans le plexus myentérique (Hoff et al., 2008).

D'un point de vue cytologique, le noyau des CGE, très différent du noyau des neurones, se caractérise par la présence de blocs de chromatine situés à la proximité de la membrane nucléaire, elle-même caractérisée par la présence d'invaginations profondes. D'autre part, les CGE contiennent des gliofilaments caractéristiques formant des faisceaux qui traversent leur corps cellulaire et se projettent dans l'axe des extensions gliales, leur permettant d'adhérer aux surfaces ganglionnaires (Gabella, 1981). La composante majeure de ces gliofilaments est la GFAP (glial fibrillary acid protein), spécifique des CGE (Jessen et Mirsky, 1980). Néanmoins, la GFAP n'est pas exprimée dans la totalité des CGE (von Boyen et al., 2004). D'autre part, les CGE expriment la vimentine, protéine des filaments intermédiaires,

également exprimée dans les myofibroblastes sous-épithéliaux (Jessen et Mirsky, 1980). La totalité des CGE exprime la protéine S100 $\beta$  (calcium binding protein), protéine cytoplasmique jouant un rôle dans la régulation du cytosquelette ainsi que dans l'homéostasie calcique (Heizmann et al., 2002). Sox-10, facteur de transcription impliqué dans la différenciation des CGE, est aussi considéré comme un marqueur général des CGE (Hoff et al., 2008). Enfin, les CGE expriment spécifiquement certaines enzymes comme la glutamine synthétase ou encore l'antigène de surface Ran-2 (Jessen et Mirsky, 1980).

#### 2.1.3.2.2. Fonctions physiologiques des cellules gliales entériques

- Interactions glie-neurones

Parmi les fonctions des CGE initialement décrites, figure leur rôle de soutien mécanique des neurones entériques. En effet, les CGE favorisent la mise en place et la structuration spatiale des ganglions entériques grâce à la présence des gliofilaments permettant leur ancrage à la surface ganglionnaire (Gabella, 1990).

Les CGE jouent également le rôle de support nutritionnel et de protection pour les neurones. Ce rôle est illustré principalement par la production de facteurs neurotrophiques comme le GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) et la neurotrophin-3 (Bär et al., 1997; Hoehner et al., 1996). Le GDNF joue un rôle important dans la prolifération, la survie, la migration et la maturation des précurseurs du SNE au cours du développement embryonnaire (Worley et al., 2000) mais aussi dans la survie des neurones entériques à l'âge adulte (Anitha et al., 2006). De plus, dans un contexte de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), l'augmentation de la production de GDNF par les CGE aurait un effet anti-apoptotique sur les entérocytes (von Boyen et al., 2011, 2006). D'autre part, les CGE sont capables de synthétiser du glutathion réduit (GSH) dont l'activité anti-oxydante est en partie responsable des effets neuro-protecteurs des CGE (Abdo et al., 2010).

D'autre part, de nombreuses études ont montré que les CGE étaient impliquées dans la synthèse et l'élimination des neurotransmetteurs mais aussi dans le processus de neurotransmission proprement dit. Par des méthodes immunohistochimiques, il a été montré que la glutamine synthétase était uniquement exprimée par les CGE (Jessen et Mirsky, 1980). Cette enzyme, responsable de la conversion du glutamate en glutamine, intervient à la fois

dans la détoxification du milieu extracellulaire (le glutamate peut être excitotoxique à forte concentration) et dans l'approvisionnement des neurones en molécules de glutamine (nécessaire à la synthèse de glutamate ou d'acide  $\gamma$ -amino-butyrique (GABA)). De plus, le transporteur GAT2 (GABA transporter) est préférentiellement exprimé par les CGE, suggérant leur implication dans l'élimination des molécules de GABA de l'espace extracellulaire (Fletcher et al., 2002). Par ailleurs, le transporteur peptidique PepT2 est exprimé de façon majoritaire par les CGE, ce qui leur permet de récupérer et d'éliminer les neuropeptides dans le SNE (Rühl et al., 2001). Les CGE sont également impliquées dans la transmission nitrergique puisqu'elles sont la principale source de L-arginine, précurseur du NO (Nagahama et al., 2001). De plus, l'implication des CGE dans la transmission nitrergique a été suggérée *in vivo* dans un modèle d'ablation partielle des CGE dans lequel étaient observés une diminution du niveau d'expression du NO, un ralentissement de la vidange gastrique et du transit intestinal et une réduction de la composante nitrergique de la transmission neuromusculaire dans le jéjunum (Aubé et al., 2006). Les CGE semblent aussi jouer un rôle dans la transmission purinergique. L'expression de l'ecto-nucléotidase NTPDase-2 localisée à la surface des CGE mais absente dans les neurones suggère que les CGE contrôlent la disponibilité des bases purinergiques ATP et ADP (Braun et al., 2004). Enfin, les CGE expriment les canaux potassiques voltage-dépendants, ce qui leur permet de réguler la concentration extracellulaire d'ion  $K^+$ , dont l'accumulation peut affecter l'activité neuronale (Hanani et al., 2000).

- Interactions glie-barrière épithéliale intestinale

Les CGE sont également capables d'interagir avec les CEI. Dans des modèles murins transgéniques d'ablation massive des CGE, une rupture de l'intégrité de la BEI a été observée, associée à une réponse inflammatoire (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). Cependant, l'augmentation de la perméabilité paracellulaire précède la réponse inflammatoire, ce qui suggère un rôle direct des CGE dans le contrôle de la BEI (Aubé et al., 2006; Savidge et al., 2007). Les effets des CGE ont été confirmés *in vitro* dans des modèles de cocultures CGE/CEI. En effet, les CGE induisent une augmentation de la résistance transépithéliale des CEI et augmentent l'expression de ZO-1. Ces effets seraient médiés en partie par le S-Nitroglutathion (GSNO), molécule dérivée du GSH, sécrétée par les CGE (Savidge et al., 2007).

Par ailleurs, une analyse transcriptomique a permis de montrer que les CEI modulaient les fonctions impliquées dans la motilité, la morphologie, l'adhésion et la prolifération des CEI (Van Landeghem et al., 2009). Ainsi, les CGE inhibent la prolifération des CEI via la libération de médiateurs tels que le TGF $\beta$ 1 et la 15dPGJ2 (Bach-Ngohou et al., 2010; Neunlist et al., 2007). De plus, les CGE augmentent l'adhésion des CEI sur la matrice extracellulaire (Van Landeghem et al., 2011). Enfin, les CGE favorisent la réparation de la BEI à la fois *in vivo* et *ex vivo*, en augmentant l'étalement des CEI via la sécrétion de proEGF (Epidermal Growth Factor). Ces effets réparateurs sont médiés par l'augmentation de l'expression et de l'activité de la protéine FAK (focal adhesion kinase) dans les CEI (Van Landeghem et al., 2011). De plus, les CGE jouent également un rôle de protection de la BEI contre l'agression par des pathogènes comme *Shigella Flexneri* via la libération de GSNO (Flamant et al., 2011).

## **2.1.4. Evolution du système nerveux entérique au cours de la vie**

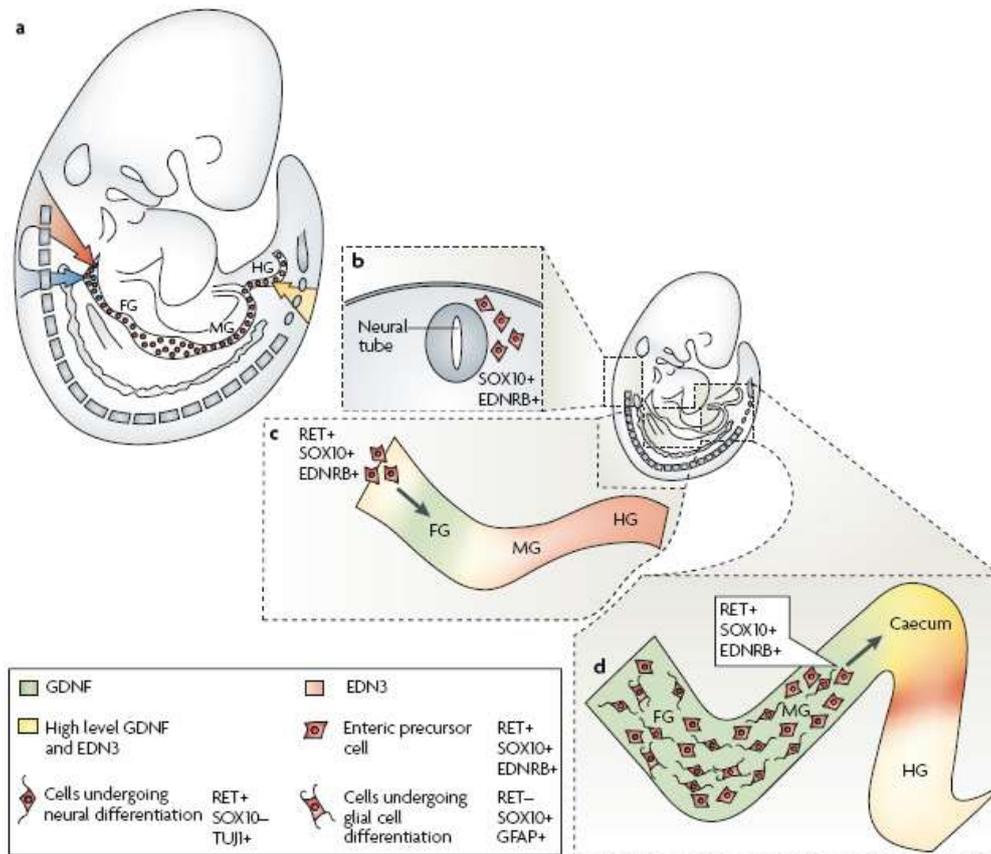
### **2.1.4.1. Développement embryonnaire du système nerveux entérique**

Les différents composants du SNE dérivent des cellules du segment vagal, sacré et rostro-troncal de la crête neurale (Gershon, 1997; Heanue et Pachnis, 2007). Les cellules du segment vagal pénètrent dans la partie antérieure du tube digestif au 9<sup>ème</sup> jour embryonnaire chez la souris et à la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme. Elles vont ensuite coloniser les différentes régions de tube digestif dans le sens rostro-caudal (Figure 23). Les cellules du segment sacré vont coloniser uniquement la partie post-ombilicale du tube digestif et les cellules du segment rostro-troncal vont coloniser la partie antérieure du tube digestif (œsophage et estomac supérieur). La fin de la colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale a lieu au 15<sup>ème</sup> jour de gestation chez la souris et à la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme (Heanue et Pachnis, 2007; Burns et al., 2004).

Au cours du développement, l'intervention séquentielle de différents facteurs et de leurs récepteurs influencent la migration, la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices du SNE. Tout d'abord, le GDNF et ses récepteurs GFR $\alpha$ 1 et Ret sont des acteurs majeurs dans la survie et la prolifération des précurseurs ainsi que dans leur différenciation. Des animaux transgéniques mutés pour les gènes codant pour GDNF, Ret ou GFR $\alpha$ 1 présentent une aganglionose entérique à partir de l'estomac (Pichel et al., 1996; Moore et al., 1996; Schuchardt et al., 1994; Cacalano et al., 1998). Au cours du développement, le GDNF

est sécrété par les cellules du mésenchyme de l'intestin selon un gradient de concentration rostro-caudal, en amont du front de migration des cellules de la crête neurale (Natarajan et al., 2002; Young et al., 2001) (Figure 23). Le GDNF pourrait ainsi jouer un rôle chémoattractif, permettant de guider les cellules précurseurs du SNE lors de leur migration. D'autre part, l'endothelin-3 (EDN-3), son récepteur EDNR (Endothelin receptor) et l'enzyme ECE-1 (Endothelin-Converting Enzyme-1), responsable de l'activation de l'EDN-3, jouent également un rôle central dans le développement du SNE. En effet, une mutation ciblée du gène codant pour l'EDNR conduit à l'absence de ganglions entériques au niveau du côlon distal (Sidebotham et al., 2002). L'EDN-3 est produite par les cellules du mésenchyme de l'intestin et serait impliquée dans le contrôle de la migration des cellules de la crête neurale (Figure 23). De plus, le nombre de cellules de la crête neurale est diminué chez les souris mutées pour le gène codant pour l'EDN-3 et leur différenciation est inhibée par la présence de l'EDN-3 (Wu et al., 1999; Bondurand et al., 2006), suggérant que la voie EDN-3 intervient également dans le maintien du pouvoir mitogène des cellules de la crête neurale en inhibant leur différenciation.

La différenciation des cellules de la crête neurale en neurones ou en cellules gliales entériques (CGE) commence dès le début de leur migration (Figure 23). Pendant leur différenciation, les cellules précurseurs continuent de proliférer et expriment des marqueurs pan-neuronaux (Hu, PGP 9.5,  $\beta$ 3 tubuline) ou gliaux (S100 $\beta$ ) (Young et al., 2005). Plusieurs facteurs de transcription comme Mash-1 ou Sox-10 contrôlent la différenciation des cellules précurseurs du SNE. En particulier, Mash-1 est impliqué dans le développement des neurones sérotoninergiques, et Sox-10 est essentiel à la différenciation des CGE (Blaugrund et al., 1996; Kelsh, 2006). Les différents types de neurones sont générés de manière séquentielle, les neurones nitrergiques et sérotoninergiques se développant de manière précoce par opposition avec les neurones cholinergiques ou exprimant le CGRP (calcitonin gene-related peptide) (Hao et Young, 2009). De la même manière, les CGE expriment de façon précoce le marqueur glial S100 $\beta$  et plus tardivement le GFAP (Glial Fibrillary Acidic protein) (Rothman et al., 1986).



**Figure 23. Ontogenèse du système nerveux entérique : colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale, migration et contrôle génétique.**

(a) Au stade E8.5 - 9 chez l'embryon de souris, les cellules de la crête neurale (NCC) du segment vagal (flèche rouge) pénètrent dans la partie supérieure du tube digestif (TD) et migrent dans le sens rostro-caudal afin de coloniser de façon séquentielle la partie antérieure (FG), la partie médiane (MG) et la partie postérieure (HG) (pointillés rouges). Les NCC de la partie la plus caudale du segment vagal proviennent d'une région qui se superpose avec les NCC de la partie du segment rostro-troncal la plus antérieure (flèche bleue). Ces cellules participent à la colonisation de l'œsophage et de la partie supérieure de l'estomac. Les NCC du segment sacré (flèche jaune) commencent leur migration plus tardivement (E13,5) dans le sens caudo-rostral pour coloniser le côlon.

(b) Les NCC d'origine vagale expriment Sox-10 et EDNRB lorsqu'elles émigrent du tube neural.

(c) Vers le 9e jour, les cellules dérivées des NCC expriment le récepteur RET. Dans le mésenchyme intestinal, son ligand GDNF est fortement exprimé dans l'estomac (vert) et le ligand de l'EDNRB EDN3 est exprimé dans les parties médiane et postérieure du TD (rose).

(d) Au stade E11, les cellules dérivées des NCC rencontrent de hauts niveaux d'expression de GDNF et d'EDN3 dans le caecum (high level GDNF and EDN3) (jaune). Les cellules en aval du front de migration commencent progressivement à se différencier (cells undergoing neural/ glial cell differentiation). GDNF et EDN3 sont ensuite exprimés dans la partie distale du TD postérieur (E 11.5, non illustrée). D'après (Heanue et Pachnis, 2007).

#### **2.1.4.2. Maturation postnatale du système nerveux entérique**

Le développement des plexus entériques n'est pas terminé à la naissance et il se poursuit en période postnatale. Tout d'abord, le nombre total de neurones myentériques peut augmenter après la naissance chez le raton (Gabella, 1971). De plus, l'organisation du plexus myentérique en ganglions s'effectue entre les stades P7 (postnatal day 7) et P36 dans le côlon de raton (de Vries et al., 2010). L'aire des neurones augmente de P21 à P36 et la densité neuronale diminue entre P1 et P7 (de Vries et al., 2010). Chez l'homme, la densité de cellules par ganglion dans le plexus myentérique du côlon distal diminue significativement pendant les 3 à 4 premières années de vie (Wester et al., 1999).

D'autre part, la différenciation neurochimique du SNE se poursuit pendant le premier mois de vie chez le raton (Matini et al., 1997). En effet, une augmentation du nombre de neurones nitrergiques a lieu entre les stades E18 (embryonic day 18) et P90 dans le côlon de raton (Matini et al., 1997). De plus, une immunoréactivité pour VIP et PACAP ne peut être détectée dans l'intestin grêle qu'à partir de P30 (Matini et al., 1997). Dans l'intestin grêle de porcelet, la proportion de neurones sous-muqueux VIP-Immunoréactifs (IR) est de 12% à la naissance, atteint 23% à P3 et 50% à l'âge de 6 semaines (van Haver et al., 2008; Hens et al., 2000). Une étude plus récente a également montré que la proportion de neurones myentériques cholinergiques augmente de 2 à 13% dans le côlon de raton entre les stades P15 et P36, et est probablement responsable du développement de la motricité colique (de Vries et al., 2010). Cette augmentation de la composante excitatrice cholinergique a également été observée chez la souris nouveau-né et a été associée à la mise en place de la motricité colique (Roberts et al., 2007). En revanche, la proportion de neurones nitrergiques augmente uniquement entre les stades P1 et P5 (de Vries et al., 2010).

#### **2.1.4.3. Modifications du phénotype du système nerveux entérique avec l'âge**

##### **2.1.4.3.1. Perte de neurones myentériques au cours du vieillissement**

Au cours du vieillissement, une diminution du nombre de neurones entériques a été largement décrite chez l'homme et le rongeur mais les résultats restent souvent contradictoires.

Chez le cobaye, la densité de neurones myentériques par unité de surface et le nombre total de neurones myentériques diminuaient significativement (-50%) dans l'intestin grêle entre les âges de 3-4 mois et 26-30 mois (Gabella, 1989). Une perte de neurones sous-muqueux d'environ 18% a également été observée dans le côlon distal de cobaye entre 5 et 20 mois alors que la perte des neurones myentériques (-40%) n'était observée qu'à partir de 27 mois (Wade, 2002). Chez le rat, une perte des neurones myentériques a été observée à la fois dans l'intestin grêle (-40%) et dans le côlon (-60%) entre 6 et 24 mois (Santer et Baker, 1988). Une autre étude réalisée chez le rat entre 3 et 27 mois a mis en évidence une perte des neurones myentériques dans le duodénum (20-30%), le jéjunum et l'iléon (15-20%) et le côlon (30-40%) (Phillips et Powley, 2001). Cette perte neuronale débutait dès l'âge de 12 mois et continuait de manière linéaire avec l'âge (Phillips et Powley, 2001). Le nombre de neurones myentériques dans le corps et l'antrum gastriques n'était pas modifié entre 3 et 24 mois mais il était diminué de 38% dans l'estomac proximal entre 24 et 27 mois (Phillips et Powley, 2001). Enfin, Cowen *et al.* ont décrit une perte de 50% des neurones myentériques dans l'iléon de rats entre 6 et 24 mois, qui n'était pas observée chez des animaux soumis à une restriction calorique (Cowen et al., 2000). Chez la souris, le nombre de neurones myentériques (et sous-muqueux) par ganglion diminuait de 30% dans l'antrum et de 50-60% dans le duodénum et le côlon distal entre 3 et 12 mois (El-Salhy et al., 1999). Les populations neuronales restaient ensuite stables entre 12 et 24 mois (El-Salhy et al., 1999).

Chez l'homme, une perte des neurones myentériques de 22-67% a été décrite dans l'œsophage des patients âgés de plus de 70 ans par rapport aux patients âgés de 20 à 40 ans (Meciano Filho et al., 1995; Eckardt et LeCompte, 1978). Dans l'intestin grêle, le nombre de neurones myentériques par ganglion est diminué de 34% chez des patients âgés de 69-76 ans par rapport à des patients de 20-40 ans (de Souza et al., 1993). Enfin, le nombre de neurones myentériques par ganglion décroît avec l'âge dans le côlon (Bernard et al., 2009), et il est diminué d'environ 37% chez des patients âgés de 65 ans par rapport à des patients de 20-35 ans (Gomes et al., 1997).

#### 2.1.4.3.2. Populations neuronales affectées par la perte induite par le vieillissement

Plusieurs études ont cherché à déterminer les caractéristiques des neurones qui disparaissaient avec l'âge.

Tout d'abord, Gabella *et al.* ont montré que les neurones myentériques les plus larges étaient spécifiquement perdus avec l'âge dans l'intestin grêle de cobaye (Gabella, 1989). Cependant, Santer et Baker ont observé que les neurones perdus avec l'âge chez le rat étaient de toutes les tailles et de toutes les formes (Santer et Baker, 1988). Ensuite, il est apparu que les pertes de neurones myentériques associées à l'âge étaient sélectives, les neurones cholinergiques étant plus vulnérables que les neurones nitrergiques (Wade et Cowen, 2004). En effet, le nombre de neurones cholinergiques diminuait spécifiquement dans l'iléon de rats entre 6 et 24 mois (Cowen *et al.*, 2000). Il a également été montré, chez l'homme, que le nombre de neurones myentériques cholinergiques déclinait avec l'âge dans le côlon alors que le nombre de neurones nitrergiques n'était pas modifié (Bernard *et al.*, 2009). De plus, la perte des neurones myentériques nitrergiques dans l'intestin grêle de rat entre 4 et 24 mois n'était que de 15 % alors que la perte de la population neuronale myentérique totale atteignait 40% (Santer, 1994). Ainsi, la proportion de neurones nitrergiques est plus élevée dans le côlon proximal de rats âgés de 26 mois par rapport aux rats de 6 mois mais elle est inchangée dans l'iléon (Belai *et al.*, 1995). De même, la proportion de neurones nitrergiques était plus élevée dans l'intestin grêle de patients âgés de 80 ans par rapport aux patients de 50 ans (Belai et Burnstock, 1999). L'étude de Takahashi fait exception en décrivant une perte de plus de 50% des neurones myentériques nNOS-IR par ganglion dans le côlon de rat entre 4 et 28 mois (Takahashi *et al.*, 2000).

D'autres études se sont intéressées aux populations neuronales exprimant des protéines de liaison au calcium. La proportion des neurones myentériques calrétinine-IR était augmentée dans l'intestin grêle de patients âgés (Belai et Burnstock, 1999) alors qu'elle n'était pas modifiée dans l'intestin grêle de rats entre 6 et 17 mois (Thrasivoulou *et al.*, 2006). Une diminution du nombre de neurones neurocalcine-IR a été observée dans l'intestin grêle et le côlon de rats âgés de plus de 24 mois par rapport aux rats de 3 mois (Corns *et al.*, 2002). Enfin, la perte des neurones calbindin-IR dans le plexus sous-muqueux de côlon distal de cobaye (Wade, 2002) et dans le plexus myentérique d'intestin de rats âgés de 17 mois (Thrasivoulou *et al.*, 2006) suggérait que ces neurones étaient spécifiquement vulnérables au cours du vieillissement. Par ailleurs, une diminution de la densité des fibres immunoréactives pour la SP, le VIP et la somatostatine a été observée avec l'âge dans l'intestin grêle de rat, en particulier à un âge avancé (24-36 mois) (Fehér et Péntzes, 1987).

#### 2.1.4.3.3. Mécanismes à l'origine du vieillissement du système nerveux entérique

Bien que la perte de neurones entériques associée à l'âge soit maintenant bien décrite, les mécanismes impliqués dans ce phénomène de vieillissement du SNE restent inconnus.

Tout d'abord, les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) pourraient être impliqués dans la perte des neurones myentériques car celle-ci n'a pas lieu au cours d'une restriction calorique (Cowen et al., 2000). En effet, la génération de ROS dans les neurones entériques augmente avec l'âge et est supérieure chez les animaux nourris *ad libitum* que chez les animaux soumis à une restriction calorique (Thrasivoulou et al., 2006).

Une autre hypothèse pouvant expliquer la vulnérabilité des neurones entériques serait une diminution du support des facteurs neurotrophiques avec l'âge. En effet, en plus d'intervenir dans le développement du SNE, les facteurs neurotrophiques, comme le GDNF et la neurotrophine-3, participent également au maintien et à la survie des neurones entériques chez l'adulte (Rodrigues et al., 2011; Anitha et al., 2006) (Thrasivoulou et al., 2006). Ces facteurs neurotrophiques réduisent significativement les niveaux de ROS présents dans les neurones myentériques de rats âgés de 6 mois (Thrasivoulou et al., 2006).

## **2.2. Contrôle des fonctions gastro-intestinales par le système nerveux entérique**

### **2.2.1. Contrôle de la motricité gastro-intestinale par le système nerveux entérique**

#### **2.2.1.1. Contrôle de la motricité gastrique**

La motricité gastrique est fortement régulée par le système nerveux extrinsèque (parasymphatique et sympathique) qui agit via les neurones myentériques. Ainsi, une vagotomie induit une augmentation du tonus fundique et une diminution de la motricité de l'antré (Li et Owyang, 2003). Cependant, un estomac isolé peut induire des réponses motrices inhibitrices et excitatrices en l'absence de connexion avec le système nerveux extrinsèque (Hennig et al., 1997; Paton et Vane, 1963).

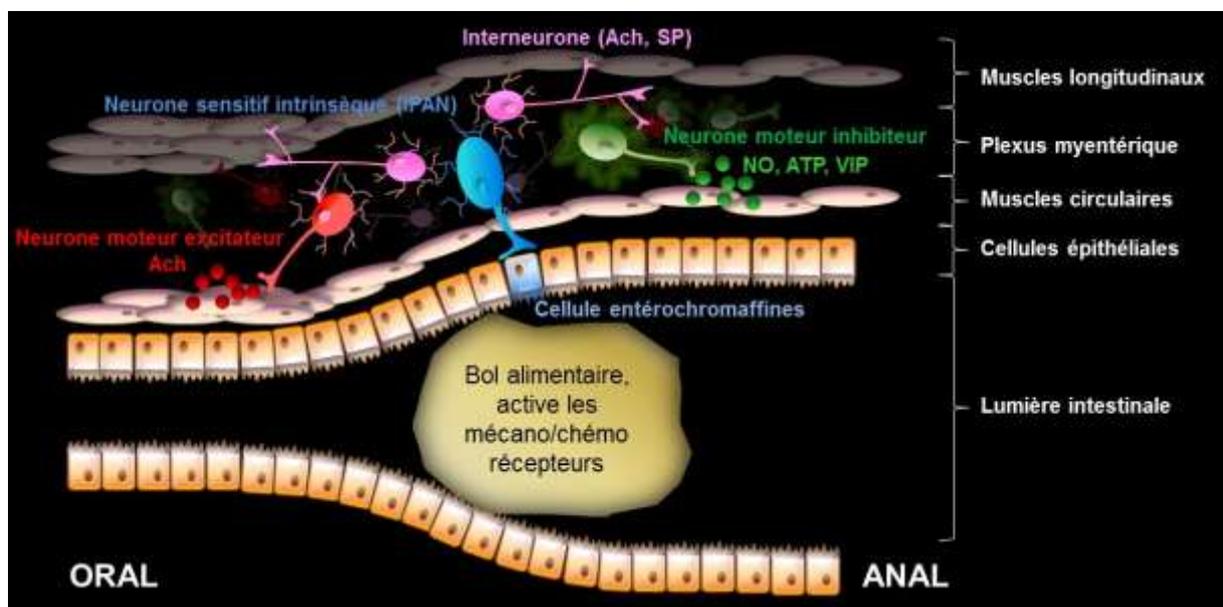
La relaxation réceptive gastrique met en jeu un réflexe vago-vagal (Travagli et al., 2006). Le passage de la nourriture dans l'œsophage stimule les voies afférentes vagues sensorielles connectées aux neurones du noyau du tractus solitaire, d'où repartent des projections efférentes vagues vers le plexus myentérique gastrique (Travagli et al., 2006). Le neurone moteur final de la voie efférente est inhibiteur, libérant du NO et/ou du VIP, ce qui entraîne une relaxation des muscles lisses. Cet effet est renforcé par un réflexe simultané qui inhibe les voies motrices cholinergiques intestinales. L'accommodation gastrique, induite par la distension de la paroi est permise par des réflexes à la fois centraux et locaux (entériques) faisant intervenir le NO comme transmetteur final inhibiteur et entraînant une relaxation des muscles lisses (Tack et Janssen, 2010).

Après une relaxation initiale, l'estomac distendu commence une série de contractions phasiques. Le péristaltisme de l'estomac résulte de vagues lentes générées dans le muscle. Elles naissent dans l'estomac proximal au niveau du corps et se propagent vers l'estomac distal. L'intensité des contractions gastriques est déterminée par l'action du nerf vague, qui forme des connections avec les neurones dans les ganglions myentériques. La composante excitatrice vagale agit sur les neurones myentériques cholinergiques qui stimulent les contractions phasiques des muscles lisses. La composante inhibitrice vagale est médiée par les neurones myentériques qui libèrent le NO, le VIP ou l'ATP et entraînent une relaxation des muscles lisses. Les voies vagues excitatrice et inhibitrice régulent également les contractions du sphincter pylorique. Le NO joue un rôle clé dans la régulation de la vidange gastrique. En effet, un ralentissement de la vidange gastrique est observé chez les souris KO nNOS et suite à l'administration d'inhibiteurs de la biosynthèse du NO (Mashimo et al., 2000; Orihata et Sarna, 1994).

### **2.2.1.2. Contrôle du péristaltisme**

Le réflexe péristaltique peut être initié par un stimulus mécanique (distension) ou chimique (présence d'acides gras, de glucides ou diminution du pH) au niveau de la muqueuse intestinale. Ces stimuli activent les cellules entérochromaffines de la BEI, qui libèrent de la sérotonine, responsable de l'activation des terminaisons nerveuses des IPANs situées dans la muqueuse intestinale (Figure 24) (Furness, 2000). En effet, grâce à l'utilisation d'électrodes intracellulaires et de marqueurs de l'activité neuronale, il a été montré que les IPANs myentériques étaient activés par la distension de l'intestin ou par un stimulus chimique

appliqué au niveau de la muqueuse (Kirchgessner et al., 1996; Bertrand et al., 1997). Les IPANs représentent donc les premiers neurones intervenant dans les voies réflexes intestinales intrinsèques (Kirchgessner et Gershon, 1988). De plus, les IPANs sont connectés entre eux sur toute la circonférence et la longueur du tube digestif afin de coordonner l'activité motrice de l'intestin (Furness et al., 1998). Suite à leur stimulation, les IPANs libèrent l'Ach et la SP qui activent les interneurones ascendants et descendants, projetant respectivement vers le côté oral et anal du tube digestif (Figure 24). Les interneurones ascendants, via la libération d'Ach et de SP, activent les neurones moteurs excitateurs qui libèrent eux-mêmes de l'Ach et de la SP entraînant une dépolarisation et une contraction du muscle (Figure 25). Par ailleurs, parmi les trois types d'interneurones descendants, le groupe d'interneurones ChAT/NOS/VIP est impliqué dans le réflexe péristaltique alors que le groupe ChAT/SOM est impliqué dans la propagation des CMM intestinaux (Furness, 2000). Les interneurones descendant libèrent donc de l'Ach, du NO, du VIP et de l'ATP, activant les neurones moteurs inhibiteurs qui provoquent une hyperpolarisation et une relaxation du muscle via le NO, le VIP et l'ATP (Figure 24). Les neurones moteurs ascendants et descendants représentent donc les derniers acteurs du circuit neuronal contrôlant le péristaltisme (Figure 24).



**Figure 24. Schéma représentant le réflexe péristaltique dans l'intestin**

Suite à une stimulation au niveau de la muqueuse, les cellules entérochromaffines libèrent la sérotonine et activent les IPANs. Les IPANs libèrent alors l'Ach, la SP et la CGRP qui activent les interneurones ascendants et descendants. Les interneurones ascendants, via la libération de l'Ach et de SP, activent les neurones excitateurs qui libèrent eux-mêmes de l'Ach et de la SP qui provoquent la contraction des muscles. Par ailleurs, les interneurones descendants, via la libération de l'Ach, du NO, du VIP et de l'ATP, activent les neurones moteurs inhibiteurs qui en libérant du NO, du VIP et de l'ATP, provoquent une relaxation musculaire. Les CIC ne sont pas représentées ici.

Les CIC jouent un rôle déterminant dans le contrôle neuronal de la contraction musculaire. Localisées entre le muscle circulaire et le muscle longitudinal, les CIC jouent le rôle de « pacemaker » en générant spontanément et en propageant des ondes lentes tout au long de l'intestin (Ward et al., 2006). Ces cellules sont innervées par les neurones moteurs entériques et sont capables de répondre à différents neurotransmetteurs (Ward et al., 2006). En effet, elles expriment des récepteurs muscariniques, des récepteurs aux neurokinines et au VIP, ce qui suggère qu'elles participent directement à la transmission du signal neuronal vers les cellules musculaires (Ward et al., 2006). Cette hypothèse est renforcée par l'observation que la stimulation des neurones moteurs entériques induit une augmentation de GMP cyclique dans les CIC (Shuttleworth et al., 1993). D'autre part, dans des modèles transgéniques déficients en CIC, la stimulation des neurones cholinergiques n'entraîne pas de réponse contractile alors que la sensibilité du muscle à l'Ach n'est pas modifiée (Ward et al., 2006).

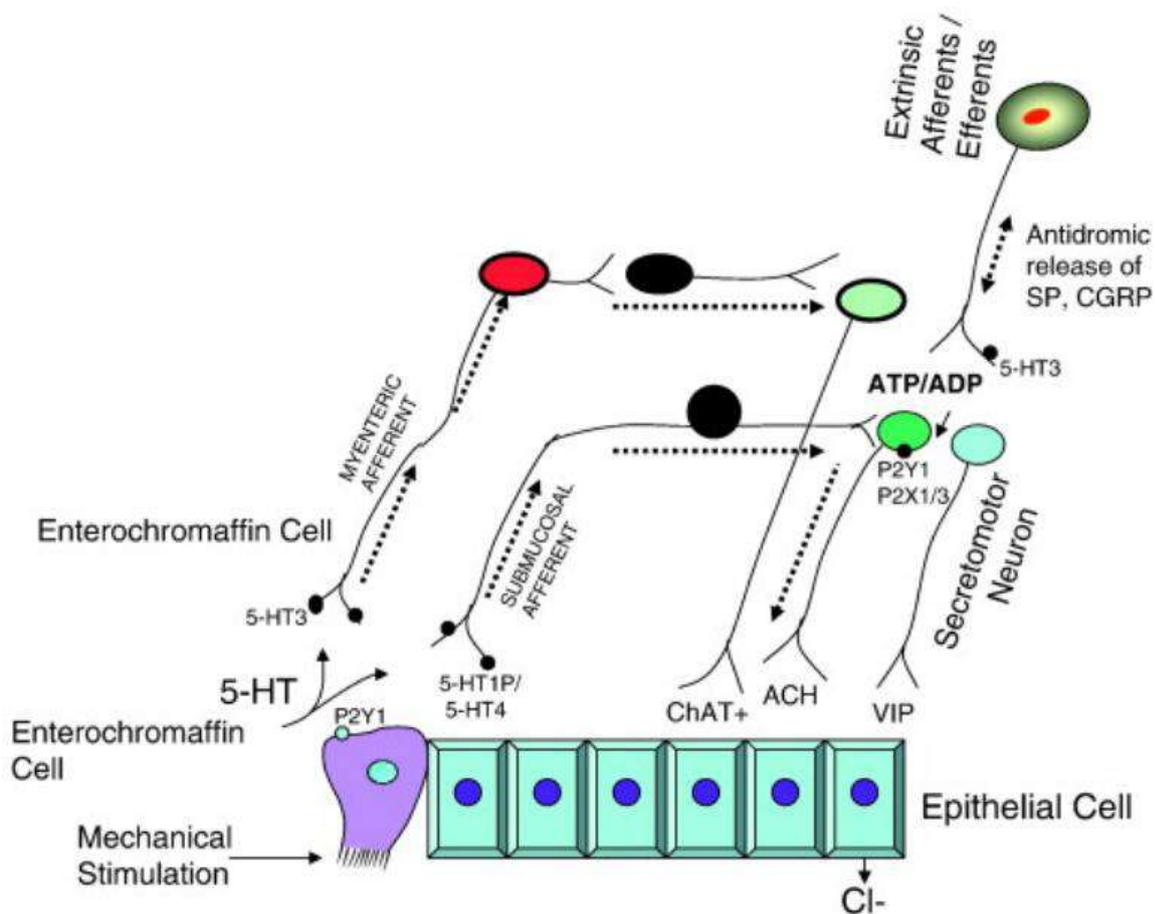
## **2.2.2. Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par le système nerveux entérique**

### **2.2.2.1. Contrôle du transport vectoriel d'électrolytes et de mucus**

Parallèlement à l'induction d'un réflexe péristaltique, les différents stimuli appliqués au niveau de la muqueuse induisent également la sécrétion d'électrolytes par les cellules de la BEI via l'activation d'un réflexe nerveux médié par le plexus sous-muqueux. Les cellules entérochromaffines jouent un rôle majeur dans l'initiation de cet arc réflexe en amorçant la réponse sécrétrice, via la libération de 5-HT (Kim et al., 2001a, 2001b). L'ATP semble également jouer un rôle majeur dans l'initiation du réflexe neurosécréteur. En effet, suite à un stimulus mécanique, les cellules entérochromaffines libèrent de l'ATP (Cooke et al., 2003) qui va stimuler directement la sécrétion d'ions chlore par les CEI ou amplifier la sécrétion de 5-HT par les cellules entérochromaffines (Guo et al., 1997; Xue et al., 2007).

Dans le cas d'un frottement mécanique appliqué sur la muqueuse, le réflexe est initié par la libération de 5-HT et seuls les IPANs du sous-muqueux projetant vers la muqueuse interviennent (Figure 25) (Cooke et al., 2003). En revanche, lors d'une distension de la muqueuse, les voies afférentes extrinsèques sont impliquées et l'initiation du réflexe sécrétomoteur ne fait pas intervenir la 5-HT (Figure 25). L'arc réflexe ainsi initié va ensuite se poursuivre par l'activation d'interneurones qui vont stimuler les neurones sécrétomoteurs

sous-muqueux (Figure 25). Chez le cobaye, les neurones sécrétomoteurs ascendants sont cholinergiques alors que les neurones sécrétomoteurs descendants sont VIPergiques (Neunlist et Schemann, 1998). L'activation des neurones sécrétomoteurs va donc entraîner la libération de VIP et/ou d'Ach qui vont se lier aux récepteurs des CEI et provoquer la libération d'ions chlore (Anderson et al., 2003; Hirota et McKay, 2006). Le réflexe sécrétomoteur est réalisé majoritairement par les neurones du plexus sous-muqueux. Cependant, il existe des neurones sécrétomoteurs cholinergiques et VIPergiques dans le plexus myentérique, qui projettent vers la muqueuse. Des connexions nerveuses présentes entre les deux plexus suggèrent une coordination entre les réflexes péristaltique et sécrétomoteur.



**Figure 25. Schéma simplifié du réflexe sécrétomoteur.**

Suite à une stimulation mécanique au niveau de la muqueuse, les cellules entérochromaffines libèrent de la 5-HT activant l'arc réflexe sécrétomoteur. Lors d'un frottement mécanique appliqué sur la muqueuse, seuls les IPANs du plexus sous-muqueux sont impliqués par opposition à une distension de la muqueuse qui fait intervenir les voies afférentes extrinsèques. Les neurones sécrétomoteurs ascendants sont cholinergiques tandis que les neurones sécrétomoteurs descendants sont VIPergiques. La libération du VIP et de l'Ach par les neurones sécrétomoteurs entraîne la libération d'ions chlore par les cellules épithéliales intestinales. D'après (Xue et al., 2007).

Enfin, les neurones entériques modulent également la sécrétion de mucus (Phillips et al., 1984). Chez le rat, le VIP stimule la libération de mucines par la muqueuse colique de manière tétrodotoxine (TTX)-dépendante (Plaisancié et al., 1998).

#### **2.2.2.2. Contrôle de l'absorption intestinale**

Parallèlement au contrôle du flux d'ions chlore à travers la BEI, les neurones du plexus sous-muqueux régulent l'absorption d'ions sodium. En effet, une stimulation électrique des neurones du plexus sous-muqueux entraîne une diminution de l'absorption d'ions sodium (Hayashi et al., 2003).

D'autre part, le SNE régule l'absorption d'acides aminés par la BEI. En particulier, la CGRP diminue l'absorption d'alanine, de proline et de taurine au niveau de la muqueuse jéjunale (Barada et al., 2000).

#### **2.2.2.3. Contrôle de la prolifération cellulaire de l'épithélium**

Le SNE est également capable de contrôler la prolifération et la différenciation des CEI. Il a été montré que les effets trophiques du GLP-2, impliqué dans les processus de croissance et de réparation de la BEI, sont probablement médiés en partie par le SNE. En effet, l'administration de GLP-2 entraîne une activation des neurones entériques, qui expriment les récepteurs au GLP-2. De plus, l'activation des entérocytes induite par GLP-2 est inhibée par la TTX (Bjerknes et Cheng, 2001).

D'autre part, le SNE est capable de contrôler directement la prolifération des CEI. Dans un modèle de co-culture sous-muqueuse humaine/CEI, l'activation électrique des neurones entériques diminue la prolifération des CEI par une voie VIPergique (Toumi et al., 2003). L'effet direct des neuromédiateurs sur la prolifération des CEI a également été étudié. Ainsi, le VIP et le PACAP diminuent la prolifération dans différentes lignées épithéliales coliques (Lelièvre et al., 1998). L'implication de la somatostatine a également été suggérée car ses antagonistes inhibent la prolifération des CEI *in vivo* (Castell et al., 2001). Enfin, l'ADP et l'ATP inhibent la prolifération des CEI de rats *in vitro* (Dignass et al., 1998).

#### **2.2.2.4. Contrôle de la perméabilité paracellulaire**

Plusieurs études ont suggéré l'implication de voies nerveuses dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire de la BEI. Ainsi, l'augmentation de la perméabilité observée chez

des rats allergiques à l'ovalbumine est inhibée par la TTX (Crowe et al., 1993). De même, chez le porcelet, l'augmentation de la perméabilité induite par le jeûne au niveau du jejunum est bloquée par la TTX et par des antagonistes des récepteurs cholinergiques (Hayden et Carey, 2000). Cette hypothèse du rôle direct du SNE dans le contrôle de la perméabilité a été confirmée par un modèle de co-culture de CEI et de sous muqueuse humaine. En effet, la stimulation électrique des neurones sous-muqueux diminuait la perméabilité de l'épithélium et augmentait l'expression de ZO-1 via l'activation des voies VIPergiques (Neunlist et al., 2003). De plus, un stress aigu active les voies cholinergiques induisant la sécrétion pancréatique de trypsine qui va altérer la perméabilité paracellulaire colique chez la souris (Demaude et al., 2009).

D'autre part, les neuromédiateurs peuvent avoir un effet direct sur la perméabilité de la BEI. Ainsi, sur des lignées épithéliales coliques humaines (Caco-2), le VIP diminue la perméabilité alors que l'Ach l'augmente (Blais et al., 1997). La neurokinine A augmente la perméabilité dans le duodénum de rat et son effet est inhibé par le VIP (Hällgren et al., 1998). Ces résultats mettent en évidence les effets protecteurs du VIP sur la BEI.

### **2.3. Impact des facteurs nutritionnels sur le système nerveux entérique**

Alors que le SNE est un régulateur clé des fonctions digestives impliquées dans la digestion et l'absorption des nutriments, seules quelques études se sont intéressées à l'impact des facteurs nutritionnels sur le SNE.

Il a tout d'abord été montré, chez le cobaye, que certains neurones du plexus myentérique étaient directement activés par des modifications de la concentration extracellulaire en glucose (Liu et al., 1999). De plus, une perfusion intrainestinale de glucose ou d'oléate induit l'expression de c-fos, marqueur d'activation neuronale, dans les neurones myentériques et sous-muqueux du duodénum et du jéjunum de rat, mais pas dans l'iléon (Sayegh et al., 2004). Seule la perfusion intrainestinale de glucose active également les neurones sous-muqueux dans l'iléon (Sayegh et al., 2004). Dans le plexus myentérique, les perfusions d'oléate et de glucose entraînent une augmentation de l'expression de c-fos dans les neurones nNOS-IR alors que dans le plexus sous-muqueux, la majorité des neurones

activés étaient immunoréactifs pour la calbindine ou la calrétinine (Sayegh et al., 2004). D'autre part, les acides gras à chaîne courte, produits par la fermentation bactérienne des glucides et protéines non digérés, diminuent la fréquence des contractions des muscles longitudinaux du côlon de rat via une action sur le SNE (Ono et al., 2004). De plus, une étude a mis en évidence une action directe du butyrate, acide gras à chaîne courte, sur les neurones entériques. De plus, des travaux ont montré que le butyrate augmentait l'excitabilité des IPANs du côlon de cobaye (Neunlist et al., 1999) et induisait une hyperpolarisation de la membrane de neurones myentériques de rat isolés (Hamodeh et al., 2004).

Certains facteurs nutritionnels sont donc capables de moduler de manière aiguë l'activité des neurones entériques. De plus, des travaux récents ont permis de montrer que les facteurs nutritionnels étaient également capables d'induire une plasticité du phénotype du SNE. En particulier, une étude récente a démontré que la consommation d'un régime butyrogène pendant 2 semaines entraînait chez le rat une augmentation de la proportion des neurones cholinergiques, responsable d'un transit colique accéléré (Soret et al., 2010). D'autre part, chez l'écureuil, un régime enrichi en cholestérol (1%) pendant 4 semaines résulte en la suppression de l'inhibition des contractions cholinergiques des muscles longitudinaux du jéjunum induite par le SNE chez les animaux contrôles (0.03%) (Mathison et Shaffer, 2006). Chez le porcelet, un régime maternel supplémenté en acide  $\alpha$ -linoléique (18:3n-3) entraîne une augmentation de la proportion de neurones sous-muqueux cholinergiques et une diminution de la proportion de neurones VIPergiques dans le jéjunum, associées à une augmentation de la perméabilité paracellulaire (de Quelen et al., 2011). De plus, l'acide eicosapentaénoïque (20:5n-3) augmente la proportion de neurones cholinergiques et diminue la proportion de neurones VIPergiques sur des cultures primaires de SNE de rat (de Quelen et al., 2011).

Cependant, l'impact à long terme d'un régime alimentaire spécifique, comme un régime hyperlipidique, sur le SNE ainsi que ses répercussions fonctionnelles restent inconnus.

### **3. IMPACT D'UN REGIME HYPERLIPIDIQUE SUR LES FONCTIONS DIGESTIVES ET LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE**

Les lipides alimentaires exercent des effets inhibiteurs sur la prise alimentaire, en modulant à la fois la motricité et les sécrétions GI. Cependant, l'impact d'une consommation chronique excessive de lipides sur les fonctions GI diffère des réponses normalement induites par l'ingestion de lipides.

#### **3.1. Réponses gastro-intestinales induites par les lipides alimentaires**

La présence de lipides alimentaires dans l'intestin stimule la libération d'hormones GI, telles que la CCK (Lieverse et al., 1994), le PYY (Feinle-Bisset et al., 2005; Pilichiewicz et al., 2006) et le GLP-1 (Herrmann et al., 1995) et inhibe la libération de ghréline (Feltrin et al., 2006). Ces modifications des sécrétions GI sont associées à un ralentissement de la vidange gastrique. En effet, chez l'homme, une perfusion intraduodénale de lipides induit une inhibition de la vidange gastrique (Valenzuela et Defilippi, 1981; Heddle et al., 1989). En effet, les lipides alimentaires favorisent la relaxation de l'estomac proximal (Feinle et al., 1996; Azpiroz et Malagelada, 1985), diminuent les contractions de l'antré et du duodénum (Heddle et al., 1988a) et augmentent les contractions pyloriques (Heddle et al., 1988b). D'autre part, une perfusion iléale de lipides diminue la vitesse de transit intestinal (de l'estomac au caecum) d'un repas solide à la fois chez l'homme (Read et al., 1984) et chez le rat (Brown et al., 1987, 1990). Les lipides, administrés en perfusion intragastrique, inhibent également la vidange gastrique chez l'homme (Hunt et Knox, 1968; Schwartz et al., 1993; Mogard et al., 1988).

La digestion préalable des lipides en acides gras (AG) est indispensable pour qu'ils exercent leurs effets sur les sécrétions GI et la vidange gastrique. En effet, la consommation de tétrahydrolipstatine, puissant inhibiteur de l'activité de la lipase dans le duodénum, atténue les effets d'une perfusion intraduodénale de triacylglycérol sur la sécrétion de CCK, GLP-1 et PYY et sur la suppression de la ghréline (Feinle-Bisset et al., 2005; Feinle et al., 2003, 2001).

De plus, la tétrahydrolipstatine accélère la vidange gastrique de la phase solide et lipidique d'un repas (Borovicka et al., 2000). Elle atténue fortement les effets d'une perfusion intraduodénale de triacylglycérol sur la relaxation de l'estomac proximal (Feinle et al., 2001) et sur la motricité antro-pyloro-duodénale (Feinle et al., 2003).

Enfin, les effets des AG sur les fonctions GI dépendent aussi de la longueur de leur chaîne acyl. Ainsi, la perfusion intraduodénale d'AG à plus de 12 carbones stimule la sécrétion de CCK de manière plus importante que les AG à moins de 10 carbones (Feltrin et al., 2004; McLaughlin et al., 1999). De plus, les AG à plus de 12 carbones stimulent la sécrétion de GLP-1 et PYY et inhibent celle de la ghréline alors que les AG à moins de 10 carbones n'ont pas d'effet sur ces hormones (Feltrin et al., 2006, 2004). De la même manière, les AG entraînent une inhibition de la vidange gastrique si leur chaîne acyl comporte plus de 12 atomes de carbone mais pas si elle en contient moins de 10 (Hunt et Knox, 1968). De plus, les AG à 12 carbones ou plus induisent une relaxation de l'estomac proximal, diminuent l'amplitude des contractions antrales et augmentent les contractions pyloriques d'une manière plus marquée que les AG à 10 carbones ou moins (Feltrin et al., 2004; McLaughlin et al., 1999). Les différences d'action des AG résultent probablement des différences de leurs voies d'absorption. En effet, les AG à moins de 11 carbones diffusent directement à travers les entérocytes vers la veine porte alors que les AG à plus de 12 carbones subissent une réestérification et sont empaquetés dans les chylomicrons, qui passent dans la circulation par l'intermédiaire de la lymphe.

## **3.2. Effets d'un régime hyperlipidique sur les fonctions gastro-intestinales**

### **3.2.1. Les différents types de régimes hyperlipidiques**

Plusieurs types de régimes hyperlipidiques sont rencontrés dans la littérature.

Tout d'abord, le régime hyperlipidique le plus décrit est le régime High-fat. Il se caractérise par un apport excessif en lipides uniquement. Les régimes High-fat contiennent généralement entre 10% et 40% de lipides en poids et fournissent donc entre 20 et 60% de l'apport énergétique total par les lipides. La plupart des régimes High-fat utilisés sont enrichis

en lipides saturés d'origine animale (lard, suif de bœuf...) ou végétale (huile d'olive, huile de noix de coco...) (Buettner et al., 2006).

Ensuite, le régime cafétéria offre aux animaux un choix de différents aliments palatables (fromage, chips, lard, chocolat, biscuit, ...), riches en lipides et glucides simples, en plus de leur régime standard. Cependant, chaque animal consomme des aliments différents et la composition du régime peut varier d'un animal et d'un jour à l'autre. De plus, les aliments cafétéria sont pauvres en vitamines et minéraux et peuvent entraîner chez l'animal des carences interférant avec les effets propres des lipides et glucides simples (Moore, 1987).

Enfin, le régime Western diet fournit un apport excessif en lipides mais aussi en glucides simples (majoritairement le sucrose). La composition en sucrose d'un régime Western diet varie de 10 à 30% et sa composition lipidique entre 20 et 40% des calories. Il mime ainsi, probablement de manière plus proche, la composition du régime alimentaire des sociétés occidentales, déséquilibré à la fois lipides saturés et en glucides simples.

Dans la suite de cette partie, la composition centésimale en lipides de chaque régime est précisée entre parenthèses.

### **3.2.2. Effets d'un régime hyperlipidique sur la motricité gastro-intestinale**

Plusieurs études réalisées chez l'animal suggèrent que l'inhibition du transit GI normalement induit par les lipides est atténuée après la consommation d'un régime hyperlipidique.

En effet, les effets inhibiteurs normalement induits par une injection IP de CCK ou une perfusion intraduodénale d'oléate sur la vidange gastrique sont significativement atténués chez le rat après deux semaines de régime High-fat (54%) par rapport à un régime isocalorique contrôle (5%) (Covasa et Ritter, 2000). De la même manière, une perfusion iléale chronique d'huile de palme (3h par jour, trois fois par semaine) atténue progressivement le ralentissement du transit intestinal normalement induit par les lipides, jusqu'à une disparition totale des effets inhibiteurs au bout de 4 semaines (Brown et al., 1994). Chez l'homme, des effets similaires d'un régime hyperlipidique sur les fonctions motrices GI ont été mis en évidence. Ainsi, la vidange gastrique et la vitesse de transit intestinal d'un repas test High-fat sont accélérées chez les patients ayant consommé pendant deux semaines un régime High-fat

(49%) par rapport à un régime contrôle (2%) (Cunningham et al., 1991). Cependant, ces effets ne sont pas observés après seulement 4 jours de régime High-fat (Cunningham et al., 1991). De même, une seconde étude a démontré que la consommation d'un régime hyperlipidique (35%) pendant deux semaines augmente, chez les patients, le taux de vidange gastrique d'un repas test hyperlipidique par rapport à leur taux de vidange gastrique avant consommation de ce régime (Castiglione et al., 2002). En revanche, la consommation du régime High-fat ne modifie pas le taux de vidange gastrique d'un repas test hyperglucidique (Castiglione et al., 2002). D'autre part, l'effet d'une perfusion intraduodénale de lipides sur la motricité antro-pyloro-duodénale est atténué après la consommation pendant 2 semaines d'un régime High-fat (23%) par rapport à un régime contrôle (5%) (Boyd et al., 2003).

Par conséquent, la consommation d'un régime hyperlipidique pendant 2 à 4 semaines semble donc induire une modification des mécanismes par lesquels les lipides régulent le transit GI et résulte en une accélération de la vidange gastrique.

### **3.2.3. Effets d'un régime hyperlipidique sur les sécrétions gastro-intestinales**

#### **3.2.3.1. Effets d'un régime hyperlipidique sur les sécrétions enzymatiques**

Chez le rat, la réponse sécrétoire pancréatique ainsi que l'activité lipolytique dans l'intestin grêle sont plus élevées après 2 semaines de régime High-fat (20%) qu'après un régime contrôle (5%) (Spannagel et al., 1996). De même, une autre étude a mis en évidence que l'activité de la lipase pancréatique était significativement augmentée chez le rat après 1 semaine de régime High-fat par rapport à un régime contrôle (Sabb et al., 1986). D'autre part, la consommation d'un régime cafétéria pendant 90 jours entraînait une augmentation des activités de la phosphatase alcaline, de la lipase et de la sucrase dans le jéjunum de rat (Scoaris et al., 2010). Enfin, une dernière étude a, au contraire, mis en évidence une diminution de l'activité de la phosphatase alcaline, impliquée dans la détoxification du LPS, dans le duodénum après la consommation d'un régime High-fat pendant 8 semaines (de La Serre et al., 2010).

### **3.2.3.2. Effets d'un régime hyperlipidique sur les peptides gastro-intestinaux**

#### 3.2.3.2.1. Cholécystokinine

Il a été montré que la sécrétion de CCK normalement induite par une perfusion intraduodénale de lipides est significativement augmentée chez des rats nourris pendant 2 semaines avec un régime High-fat (20%) par rapport aux animaux contrôles (5%) (Spannagel et al., 1996). Chez l'homme, une augmentation de la concentration plasmatique postprandiale en CCK a également été rapportée après la consommation d'un régime High-fat (38%) pendant 2 semaines par rapport aux conditions précédant la consommation du régime (French et al., 1995). De plus, la concentration plasmatique en CCK à jeun est également plus élevée chez des patients ayant reçu un régime High-fat (44%) pendant 3 semaines que chez des patients ayant reçu un régime isocalorique contrôle (9%) (Little et al., 2008). En revanche, une autre étude a démontré que la sécrétion plasmatique en CCK induite par une perfusion intraduodénale de lipides est similaire chez les patients ayant reçu un régime High-fat (23%) ou un régime contrôle (5%) pendant 2 semaines (Boyd et al., 2003).

D'autre part, chez les rats nourris avec un régime hyperlipidique, l'amplitude de la réponse induite par la CCK semble atténuée. En effet, les effets inhibiteurs induits par une injection IP de CCK sur la vidange gastrique (Covasa et Ritter, 2000) et le transit intestinal (Covasa et Ritter, 1998) sont atténués après la consommation d'un régime High-fat pendant deux semaines par rapport à un régime isocalorique pauvre en lipides. Cependant, les mécanismes par lesquels le régime High-fat diminue la réponse induite par la CCK n'ont pas été identifiés.

#### 3.2.3.2.2. GLP-1 et GLP-2

Une étude réalisée chez le chien a mis en évidence que la concentration plasmatique en GLP-1, que ce soit à jeun ou en période postprandiale, était significativement plus élevée chez les animaux ayant reçu un régime High-fat (21%) pendant 12 semaines par rapport aux animaux ayant reçu un régime contrôle (15%) (van Citters et al., 2002). De plus, l'expression du récepteur au GLP-1 est significativement augmentée dans le pancréas des animaux nourris avec le régime High-fat par rapport au régime contrôle (van Citters et al., 2002). En revanche, une étude réalisée chez la souris a montré que la concentration plasmatique en GLP-1 et la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose étaient diminuées après 8 semaines de régime

High-fat (27%) par rapport à un régime contrôle (5%) (Barrachina et al., 1997). Enfin, la sécrétion de GLP-1 induite par une perfusion intraduodénale de lipides est similaire chez les patients ayant reçu un régime High-fat (23%) pendant 2 semaines ou un régime contrôle (5%) (Boyd et al., 2003).

D'autre part, l'expression des récepteurs au GLP-2 dans la région du fundus est augmentée après 2 semaines de régime High-fat (34%) chez la souris, ce qui résulte en une augmentation de la relaxation gastrique induite par le GLP-2 (3%) (Rotondo et al., 2011).

#### 3.2.3.2.3. GIP

Chez le rat, la sécrétion de GIP induite par un gavage avec une solution de triglycérides est significativement augmentée chez les animaux ayant préalablement reçu des gavages de solution de triglycérides pendant 4 jours par rapport aux animaux non gavés (Hampton et al., 1983). Chez des souris obèses *ob/ob*, déficientes pour la leptine, un régime cafétéria pendant 8 semaines entraîne une augmentation des concentrations plasmatique et intestinale en GIP, associée à une augmentation de la densité des cellules K (productrices de GIP) dans le jéjunum des souris nourries avec le régime cafétéria par rapport au régime contrôle (Bailey et al., 1986). Enfin, chez le porc, la sécrétion de GIP en réponse à un repas riche en lipides est plus importante chez les animaux ayant reçu un régime High-fat (29%) par rapport aux animaux ayant reçu un régime contrôle (2%) pendant 11 semaines (Ponter et al., 1991).

#### 3.2.3.2.4. Leptine

Plusieurs études ont mis en évidence que la concentration plasmatique en leptine était plus élevée après la consommation d'un régime High-fat (Ahrén, 1999; Lin et al., 2000) ou d'un régime Western diet (Frederich et al., 1995) qu'après un régime contrôle. La concentration plasmatique en leptine est corrélée au degré d'adiposité (Ahrén et Larsson, 1997). A long terme, un régime High-fat entraîne une résistance à la leptine, qui n'exerce plus ses effets régulateurs sur la prise alimentaire et le gain de poids (Lin et al., 2000; Barrachina et al., 1997).

#### 3.2.3.2.5. Ghréline

La concentration plasmatique en ghréline est significativement diminuée chez le rat après 14 semaines de régime High-fat (49%) par rapport à un régime contrôle (16%) (Beck et

al., 2002). De plus, la consommation d'un régime High-fat (29%) pendant 4 semaines chez le rat entraîne une diminution des niveaux d'expression de l'ARNm de la ghréline dans l'estomac, associée à une diminution de la concentration plasmatique en ghréline par rapport au régime contrôle (Lee et al., 2002). Enfin, chez la souris, après 10 semaines de régime High-fat (39%), le nombre de cellules exprimant la ghréline et le niveau d'expression de l'ARNm de la ghréline dans l'estomac sont significativement diminués par rapport à un régime contrôle (5%) (Moesgaard et al., 2004). Chez l'homme, il a été montré que les concentrations plasmatiques en ghréline à jeun n'étaient pas modifiées après un régime cafétéria pendant 16 semaines par rapport à un régime hyperprotéique ou hyperglucidique (Paul et al., 2005). En revanche, une autre étude a démontré que chez des patients ayant reçu un régime enrichi en lipides par rapport à leur régime alimentaire initial pendant 3 semaines, la suppression de la ghréline plasmatique induite par un repas gras était plus importante (Robertson et al., 2004).

#### 3.2.3.2.6. Autres hormones GI et neuromédiateurs

Un régime enrichi en huile de maïs (20%) augmente significativement les concentrations en SP et somatostatine dans l'intestin proximal et distal par rapport à un régime isocalorique contrôle (3,5%) (Sagher et al., 1991). De plus, un régime enrichi en huile d'olive (20%) augmente significativement les concentrations en SP et somatostatine uniquement dans l'intestin distal (Sagher et al., 1991). En revanche, ces régimes ne modifient pas les concentrations intestinales en entéroglucagon, motiline et VIP. Enfin, un régime enrichi en beurre (20%) ne modifie aucune des concentrations des 6 peptides par rapport à un régime contrôle (Sagher et al., 1991). D'autre part, chez le rat, la consommation d'un régime Western diet pendant 16 à 20 semaines entraîne une augmentation des niveaux de 5-HT dans l'iléon, associée à une uprégulation de l'expression de l'ARNm TPH-1, enzyme de synthèse de la 5-HT, à une diminution de l'expression de l'ARNm SERT, protéine de recapture de la 5-HT et à une augmentation de nombre de cellules entérochromaffines par rapport au régime contrôle (Bertrand et al., 2011).

### **3.2.4. Effets d'un régime hyperlipidique sur la barrière épithéliale intestinale**

#### **3.2.4.1. Morphologie de la barrière épithéliale intestinale**

Plusieurs études suggèrent qu'un régime hyperlipidique pourrait entraîner des altérations de la morphologie de la BEI.

Tout d'abord, chez le rat, un régime enrichi en huile de maïs ou huile d'olive (20%) augmente la taille des villosités dans le jéjunum et l'iléon par rapport à un régime isocalorique contrôle (3,5%) (Sagher et al., 1991). De plus, le régime enrichi en huile d'olive diminue la profondeur des cryptes dans le jéjunum et l'iléon (Sagher et al., 1991). En revanche, un régime enrichi en beurre (20%) diminue la taille des villosités ainsi que la profondeur des cryptes dans le jéjunum et l'iléon (Sagher et al., 1991). D'autre part, la consommation d'un régime cafétéria pendant 90 jours entraîne une augmentation de la longueur de l'intestin grêle, de la hauteur des villosités, de la profondeur des cryptes et de l'épaisseur de la paroi intestinale dans le jéjunum de rat (Scoaris et al., 2010). Enfin, un régime High-fat (40%) augmente la prolifération des CEI dans le jéjunum, ce qui résulte en une augmentation de la taille des villosités et donc de l'aire d'absorption, par rapport à un régime contrôle (Petit et al., 2007).

Un régime hyperlipidique entraîne donc des modifications de la morphologie de la BEI, qui sont variables selon la source lipidique mais qui tendent à augmenter la surface d'absorption intestinale.

#### **3.2.5. Absorption intestinale**

La consommation d'un régime hyperlipidique pourrait moduler l'absorption intestinale, à la fois passive et active, des nutriments.

Tout d'abord, une étude a démontré que le taux d'absorption de l'acide oléique était significativement augmenté dans le jéjunum de rats soumis à un régime supplémenté en lipides (+20%) pendant 4 semaines par rapport à un régime contrôle (Singh et al., 1972). Cette augmentation de l'absorption était associée à une concentration plus importante en une enzyme de ré-estérification des lipides (Singh et al., 1972). Une deuxième étude a confirmé

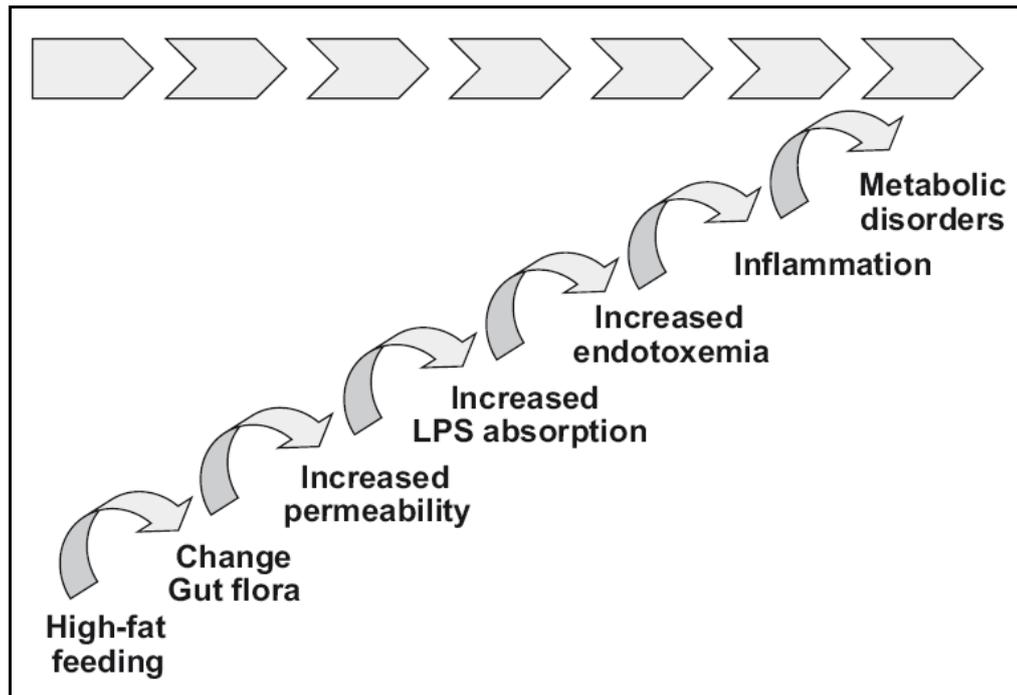
cette augmentation de l'absorption de l'acide oléique dans l'iléon chez le rat soumis à un régime High-fat (45%) pendant 4 semaines par rapport à un régime contrôle (4%) (Balint et al., 1980). De la même manière, chez la souris, la consommation d'un régime High-fat (40%) pendant 3 semaines augmente la capacité intestinale d'absorption de l'acide linoléique par rapport au régime contrôle (3%) en affectant l'expression de gènes clés de l'absorption des lipides (Petit et al., 2007).

D'autre part, chez le rat, un régime High-fat (20%) pendant 2 à 3 semaines améliore le taux d'absorption jéjunale de différents acides gras à chaîne moyenne ou longue (palmitique, linoléique, stéarique,...) et diminue l'absorption jéjunale de glucose et de décanol par rapport à un régime contrôle (Thomson et al., 1986). De plus, il améliore l'absorption iléale d'acide gras à chaîne moyenne et de leucine et diminue l'absorption iléale de décanol (Thomson et al., 1986).

### **3.2.5.1. Perméabilité intestinale**

Des modifications de la perméabilité paracellulaire intestinale ont été observées chez des animaux nourris avec un régime hyperlipidique.

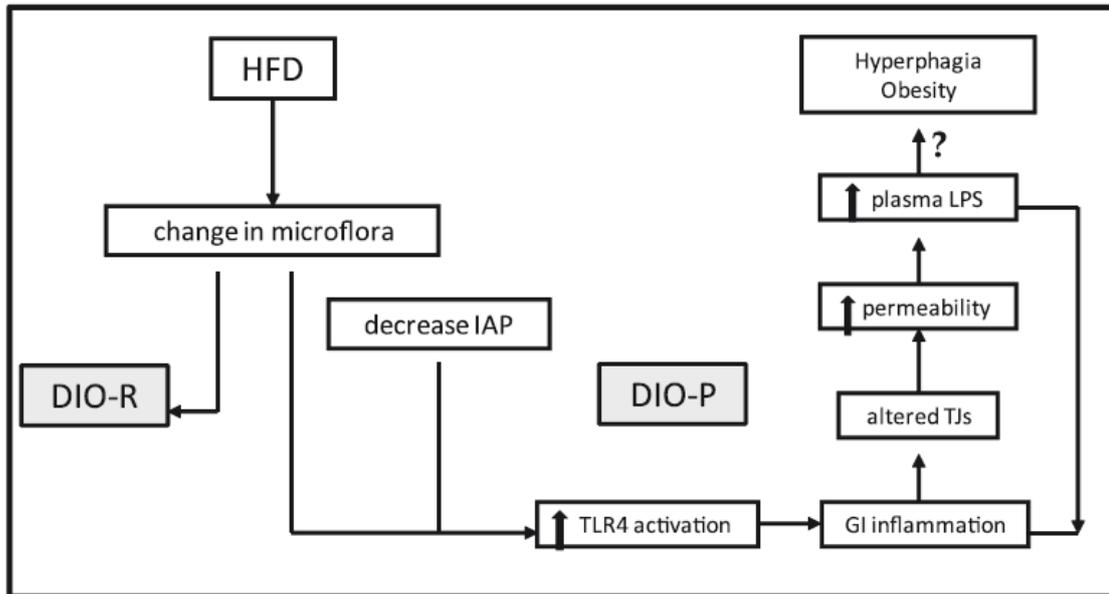
Tout d'abord, chez la souris, une étude a démontré que la consommation d'un régime High-fat (53%) pendant 4 semaines induisait une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées, notamment ZO-1 et occludine, résultant en une augmentation de la perméabilité intestinale (Cani et al., 2008). Des modifications du microbiote intestinal induites par le régime High-fat seraient à l'origine des ces altérations de la BEI, qui entraîneraient une augmentation de l'endotoxémie et une inflammation intestinale (Figure 26) (Cani et al., 2008).



**Figure 26. Hypothèse de l'origine des modifications induites par un régime High-fat proposée par Cani et al. (2008).**

La consommation d'un régime HFD induit des modifications du microbiote intestinal responsables d'une augmentation de la perméabilité. L'endotoxémie qui en résulte provoque une inflammation et l'apparition de désordres métaboliques. D'après (Cani et al., 2008).

Une seconde étude a mis en évidence qu'un régime High-fat (27%) pendant 8 à 10 semaines entraînait une altération des protéines de jonctions serrées, notamment une translocation de l'occludine dans le cytoplasme des CEI, et une augmentation de la perméabilité paracellulaire (de La Serre et al., 2010). Ces altérations de la BEI, dues à des modifications du microbiote, seraient à l'origine de l'inflammation intestinale observée chez les rats nourris avec le régime High-fat (Figure 27) (de La Serre et al., 2010).



**Figure 27. Hypothèse de l'origine des modifications induites par un régime hyperlipidique proposé par de La Serre et al. (2010).**

La consommation du régime High-fat (HFD) entraîne des modifications du microbiote intestinal qui diminuent l'activité de la phosphatase alcaline intestinale, enzyme de la bordure en brosse capable de détoxifier le LPS, et augmente l'activation du TLR-4 (Toll-like receptor-4), récepteur au LPS, dans les cellules épithéliales. Il en résulte une inflammation gastro-intestinale responsable d'une altération des jonctions serrées, d'une augmentation de la perméabilité intestinale et une augmentation du passage du LPS à travers la BEI. D'après (de La Serre et al., 2010).

Chez les rats OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty), modèle d'obésité génétique et du diabète de type 2, ou LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka), contrôles, la consommation d'un régime High-fat (30%) pendant 3, 9 ou 15 semaines augmentait significativement la perméabilité paracellulaire par rapport à un régime contrôle (7%) (Suzuki et Hara, 2010). Cette augmentation de la perméabilité était associée à une réduction de l'expression des protéines de jonctions serrées (occludine, claudin-1, claudin-3 et JAM-1) dans l'intestin grêle (Suzuki et Hara, 2010).

Il a également été montré que la consommation d'un régime High-fat (27%) pendant 10 mois entraînait une augmentation de la perméabilité paracellulaire au mannitol entre les âges de 12 à 22 mois chez le rat alors qu'elle restait constante au cours du temps avec un régime contrôle (5%) (Mullin et al., 2002). Cependant, des rats âgés de 2 mois nourris pendant 10 mois avec le régime High-fat avaient une perméabilité paracellulaire au mannitol plus faible que les rats du même âge ayant reçu le régime contrôle (Mullin et al., 2002).

Enfin, il a été montré, chez le rat, que l'administration entérale d'une solution hyperlipidique avant induction d'un choc hémorragique prévenait l'augmentation de la perméabilité transcellulaire iléale (à l'HRP) induite post-choc par rapport à une solution pauvre en lipide (Luyer et al., 2004). De plus, l'administration de la solution hyperlipidique empêche la perte d'organisation des protéines ZO-1 des jonctions serrées normalement induite par le choc hémorragique dans l'iléon (Luyer et al., 2004).

### **3.3. Effets d'un régime hyperlipidique sur le système nerveux entérique**

Les réponses GI induites par les lipides, en particulier l'inhibition de la vidange gastrique, et la modification des sécrétions GI, dépendent en partie des fibres afférentes vagues mais aussi du SNE. En effet, les neurones entériques sont impliqués dans les modifications de la motricité GI en réponse à divers stimuli. Ainsi, une perfusion artérielle de CCK modifie le comportement contractile propulsif du jéjunum en stimulant l'activité des neurones entériques intrinsèques (Weems et al., 1985). De plus, il a été montré que l'inhibition CCK-dépendante de la prise alimentaire, induite par une perfusion intrainestinale d'acide oléique, faisait intervenir les neurones entériques (Tamura et Ritter, 1994). Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'implication des neurones entériques dans les modifications des fonctions GI induites par un régime hyperlipidique.

Chez le rat, Covasa et al. (2000), ont montré que la consommation d'un régime High-fat (34%) pendant au moins 2 semaines s'accompagnait d'une diminution de l'activation des fibres vagues et des neurones entériques normalement induite par une perfusion intrainestinale d'oléate (Covasa et al., 2000). En effet, la perfusion intrainestinale d'oléate induit une activation des neurones entériques (marqués Fos) dans les plexus myentérique et sous-muqueux du jéjunum des animaux contrôles, qui était significativement moindre chez les animaux ayant reçu le régime High-fat (Covasa et al., 2000). En revanche, une perfusion intrainestinale de maltotriose, qui induit également une inhibition de la vidange gastrique, n'entraîne pas l'activation des neurones entériques ni chez les rats contrôles ni chez les rats ayant reçu le régime High-fat (Covasa et Ritter, 2000). Les neurones entériques répondent donc spécifiquement à l'oléate ou à certains facteurs, comme la CCK, libérés en réponse aux lipides (Covasa et Ritter, 2000).

Les effets d'un régime hyperlipidique sur le phénotype neurochimique du SNE restent inconnus. Une seule étude réalisée chez le rat s'est intéressée à l'impact d'un régime cafétéria pendant 90 jours sur le nombre de neurones myentériques dans le jéjunum et a mis en évidence que le nombre total de neurones myentériques et leur aire n'étaient pas modifiés par rapport à un régime contrôle (Scoaris et al., 2010).

L'ensemble des études décrites dans cette troisième partie suggère que la consommation d'un régime hyperlipidique, en particulier High-fat, entraîne des modifications des fonctions GI, à la fois de l'activité motrice de l'estomac, des sécrétions GI et des fonctions de la BEI. Or, l'ensemble de ces fonctions est contrôlée par le SNE mais les effets directs d'un régime hyperlipidique sur le SNE restent majoritairement inconnus.

# Objectifs de l'étude

---

Au regard du manque de données de la littérature concernant l'impact d'un régime High-fat sur les fonctions GI et le rôle joué par le SNE dans ces effets, l'objectif principal de cette thèse était de caractériser les effets modulateurs d'un régime Western diet (WD), plus représentatif du régime occidental, sur les fonctions GI ainsi que sur le phénotype et les fonctions du SNE.

Plus spécifiquement, il s'agissait de :

1. Décrire, chez la souris, les effets d'un régime WD sur les fonctions GI, en se focalisant sur les fonctions motrices de l'estomac et sur la perméabilité de la BEI.
2. Caractériser l'impact du régime WD sur le phénotype du SNE et le contrôle nerveux des fonctions GI.
3. Décrire les mécanismes mis en jeu et les médiateurs impliqués.

Ce travail de thèse est présenté sous la forme de deux articles (un soumis et un en cours de soumission). Ce travail a chronologiquement été initié par l'étude de l'impact de la consommation chronique d'un régime WD sur le phénotype du SNE et ses répercussions fonctionnelles au niveau de l'estomac. Il a, en outre, permis d'identifier des facteurs et mécanismes responsables des effets du régime WD sur le phénotype du SNE (article 1). Dans une deuxième partie, nous avons caractérisé les effets du régime WD sur les fonctions de la BEI, en particulier la perméabilité paracellulaire, dans le jéjunum. Nous avons également identifié des molécules et mécanismes potentiellement impliqués dans ces effets (article 2).

Ces articles, présentés successivement, seront introduits par un résumé en français. Une discussion générale permettra de commenter l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail.

# Résultats

---

## Article 1

*Effets protecteurs d'un régime Western diet sur le système nerveux entérique gastrique chez la souris : implication de la leptine et du GDNF.*

## Résumé de l'article 1

Le système nerveux entérique (SNE) joue un rôle central dans la régulation des fonctions digestives. Plus particulièrement, les neurones sous-muqueux sont des régulateurs clés des fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI) alors que les neurones myentériques sont impliqués dans le contrôle de la motricité gastro-intestinale (GI). En particulier, les neurones excitateurs cholinergiques et les neurones inhibiteurs nitrergiques permettent, respectivement, une contraction et une relaxation des muscles lisses GI. La coordination de leur activité est responsable du péristaltisme.

Des modifications de l'expression des neuromédiateurs ont lieu dans le SNE, au cours de processus physiologiques tels que la croissance ou le vieillissement. Ainsi, une augmentation du nombre de neurones, associée à une maturation du phénotype neurochimique se produit au cours de la période postnatale (pour revue (Burns et al., 2009). En revanche, une perte des neurones myentériques a été rapportée dans l'intestin grêle et le côlon chez l'homme ou l'animal âgé (Camilleri et al., 2008) mais peu d'études se sont intéressées aux modifications du phénotype du SNE dans l'estomac. Parmi les mécanismes pouvant influencer les modifications du SNE, figurent des facteurs environnementaux, d'origine endogène ou exogène. En particulier, certains facteurs nutritionnels comme le glucose, l'oléate ou le butyrate sont capables d'activer les neurones entériques (Hamodeh et al., 2004; Sayegh et al., 2004). De façon intéressante, il a récemment été montré que certains facteurs nutritionnels pouvaient également induire, à long-terme, des modifications plus profondes du phénotype du SNE. Ainsi, un régime butyrogène (ou le butyrate) entraîne une augmentation de la proportion de neurones myentériques cholinergiques dans le côlon. Ces effets sont associés à une modification des fonctions digestives, caractérisée par une accélération du transit colique (Soret et al., 2010). Cependant, l'effet sur le SNE d'une exposition à long terme à un régime lipidique, semblable à celui incriminé dans le développement de l'obésité, reste actuellement peu documenté.

Le régime alimentaire occidental, ou « Western diet (WD) », se caractérise par des apports excessifs en acides gras saturés et en sucres simples. Cependant, les effets d'un régime WD sur le SNE et les répercussions fonctionnelles associées, restent inconnus. Or, la consommation d'un régime hyperlipidique induit des adaptations GI importantes,

caractérisées notamment par une accélération de la vidange gastrique (Cunningham et al., 1991). Les mécanismes et facteurs responsables de ces dysfonctionnements GI et l'implication éventuelle du SNE, restent à être identifiés. L'objectif premier de cette étude était donc de caractériser, chez la souris, l'impact de l'ingestion chronique d'un régime WD sur le phénotype du SNE dans l'antré, région de l'estomac impliquée dans le contrôle de la vidange gastrique, et dans le jéjunum. Pour cela, des souris ont été nourries pendant 12 semaines avec un régime WD ou un régime contrôle.

Dans la première partie de cette étude, nous avons tout d'abord mis en évidence, par des méthodes immunohistochimiques, que le régime WD prévenait la perte des neurones myentériques, en particulier nitrergiques, observée au cours du temps dans l'antré des souris contrôles. A la fin des 12 semaines de régime, le nombre de neurones nitrergiques était ainsi plus élevé dans l'antré des souris WD que dans celle des souris contrôles. De plus, le régime WD modifiait les propriétés électrophysiologiques des neurones myentériques, conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire calcique induite par la stimulation synaptique du SNE, par rapport aux souris contrôles. D'autre part, le nombre de cellules gliales entériques par ganglion était significativement plus élevé dans l'antré après le régime WD qu'après le régime contrôle. Ces effets du régime WD sur la plasticité du SNE affectaient spécifiquement l'antré mais n'étaient pas observés dans le jéjunum.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si ces modifications du phénotype du SNE, en particulier l'augmentation du nombre de neurones nitrergiques, avaient des répercussions sur la motricité GI. Nous avons mis en évidence, *in vivo*, que la vidange gastrique d'un repas solide, était significativement accélérée chez les souris nourries avec le régime WD par rapport aux souris contrôles. Cette accélération était de nature nitrergique car elle n'était plus observable après une injection intrapéritonéale de L-NAME, inhibiteur de la voie de synthèse du NO (nitric oxyde). De plus, nous avons observé, *ex vivo*, en chambre d'organe, que la composante nitrergique de la réponse contractile des muscles circulaires de l'antré, induite par une stimulation électrique du SNE, était supérieure chez les souris WD comparées aux souris contrôles. En revanche, le transit intestinal n'était pas affecté par le régime WD. Ces résultats suggèrent donc que des modifications du phénotype du SNE, et notamment l'augmentation du nombre de neurones nitrergiques dans l'antré, seraient à l'origine de l'accélération de la vidange gastrique induite par le régime WD.

Ensuite, dans la deuxième partie de cette étude, nous avons cherché à identifier les médiateurs impliqués dans les effets du régime WD sur le SNE, notamment dans la prévention de la perte des neurones myentériques. Nous nous sommes focalisés sur le facteur neurotrophique GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), connu pour jouer un rôle dans la survie des neurones entériques, non seulement au cours du développement mais également à l'âge adulte (Rodrigues et al., 2011; Anitha et al., 2006). Le régime WD induisait une augmentation de la concentration en GDNF dans l'antré après 8 ou 12 semaines de régime, mais pas dans le jéjunum. En parallèle, la concentration en leptine était significativement augmentée dans l'antré après 4, 8 ou 12 semaines de régime WD. De manière intéressante, les concentrations en GDNF et leptine étaient corrélées positivement dans l'antré. De plus, la concentration en GDNF dans l'antré des souris *db/db*, déficientes pour le récepteur à la leptine, était significativement diminuée. Enfin, nous avons montré, *in vitro*, que la leptine induisait une augmentation de la libération de GDNF par le SNE, associée à une augmentation de l'expression de l'ARNm GDNF.

Enfin, dans la dernière partie de cette étude, nous avons cherché à déterminer si le GDNF et la leptine, dont les concentrations étaient augmentées dans l'antré, pouvaient être responsables des effets neuroprotecteurs induits par le régime WD. *In vitro*, sur des cultures primaires de SNE, nous avons montré que ces deux médiateurs exerçaient des effets protecteurs en diminuant la mort apoptotique des neurones entériques. De plus, nous avons mis en évidence que les effets neuroprotecteurs de la leptine étaient bloqués en partie par des anticorps bloquant anti-GDNF.

En conclusion, cette étude démontre que la consommation d'un régime WD prévient la perte des neurones myentériques nitrergiques normalement observée dans l'antré au cours du temps, probablement par l'intermédiaire d'une augmentation des concentrations en leptine et en GDNF. En effet, la leptine exercerait des effets neuroprotecteurs sur les neurones entériques, en stimulant la production de GDNF. Finalement, cette étude identifie le SNE, comme un nouvel acteur impliqué dans l'accélération de la vidange gastrique induite par un régime WD.

Cet article a été soumis à *The Journal of Physiology* le 30 août 2011.

# **Western diet has neuroprotective effects in murine gastric enteric nervous system: involvement of leptin and GDNF.**

**Charlotte Baudry**<sup>1,2,3</sup>, **François Reichardt**<sup>4</sup>, **Justine Marchix**<sup>1,2,3</sup>, **André Bado**<sup>5</sup>, **Michael Schemann**<sup>4</sup>, **Stanislas Bruley des Varannes**<sup>1,2,3</sup>, **Michel Neunlist\***<sup>1,2,3</sup> and **Raphaël Moriez**<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Inserm, U913, Institut Fédératif de Recherche Thérapeutique, IFR26 Nantes, France.

<sup>2</sup> Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

<sup>3</sup> CHU Nantes, Hôtel Dieu, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France.

<sup>4</sup> Lehrstuhl für Humanbiologie, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany.

<sup>5</sup> Inserm, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon, UFR de Médecine Paris 7 - Denis Diderot, IFR02 Claude Bernard, Paris, France.

**Running title:** Enteric neuroplasticity and Western diet

**Key words:** myenteric neurons; gastric emptying; neuroprotection

**Word count:** 4617 words

\* **Corresponding author:** Dr. NEUNLIST Michel  
UMR Inserm U913  
1, place Alexis Ricordeau – 3HNB  
44093 Nantes  
FRANCE  
Tel. +33 2 40 08 75 15  
Fax. +33 2 40 08 75 06  
E-mail: [michel.neunlist@univ-nantes.fr](mailto:michel.neunlist@univ-nantes.fr)

## **NON-TECHNICAL SUMMARY**

The enteric nervous system (ENS) is an autonomous nervous system integrated along the gut that controls major gastrointestinal (GI) functions such as motility. Increasing data have demonstrated that nutritional factors can modulate the ENS phenotype and consequently impact upon GI functions. Western diet (WD) is central in the development of obesity but surprisingly no study has characterized its impact upon ENS phenotype and functions. We show that long-term administration of WD prevented age-associated loss in a specific population of enteric neurons leading to an acceleration of gastric emptying. In addition, we showed that WD neuroprotective effects likely involved molecules called leptin and GDNF. These nutritional-induced neuroplastic changes in the ENS could be 1) involved in the pathophysiology of obesity or 2) conversely set the basis for developing nutritional intervention taking advantage of the WD induced beneficial factors as new approach in the treatment of gastric enteric neuropathies and associated dysfunctions.

## **ABSTRACT**

Nutritional factors can induce profound neuroplastic changes in the enteric nervous system (ENS), responsible for changes in gastrointestinal (GI) motility. However, long-term effects of nutritional imbalance such as Western diet (WD) upon ENS phenotype and control of GI motility remain unknown. Therefore, we investigated the effects of WD on ENS phenotype and function as well as factors involved in functional plasticity. Mice were fed with normal diet (ND) or WD for 12 weeks. GI motility was assessed *in vivo* and *ex vivo*. Myenteric neurons and glia were analyzed with immunohistochemical methods using antibodies against Hu, neuronal nitric oxide synthase (nNOS), Sox-10 and with calcium imaging techniques. Leptin and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) were studied using immunohistochemical, biochemical or PCR methods in mice and primary culture of ENS. WD prevented the age-associated decrease in antral nitrergic myenteric neurons observed in ND mice. Nerve stimulation evoked a stronger neuronal Ca-response in WD compared to ND mice. WD induced a NO-dependent increase in gastric emptying and neuromuscular transmission in the antrum without any change in small intestinal transit. During WD but not ND, a time-dependent increase in leptin and GDNF occurred in the antrum. Finally, we showed that leptin increased GDNF production in the ENS and induced neuroprotective effects mediated in part by GDNF. These results demonstrate that WD induces neuroplastic changes in the antrum leading to a NO-dependent acceleration of gastric emptying. In addition, WD exerted a neuroprotective effect likely involving leptin and GDNF.

## **ABBREVIATIONS**

ChAT, choline acetyltransferase; EFS, electrical field stimulation; ENS, enteric nervous system; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; GE, gastric emptying; GI, gastrointestinal; ND, normal diet; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; WD, Western diet.

## INTRODUCTION

The enteric nervous system (ENS) plays a central role in the control of gastrointestinal (GI) functions both in health and diseases. While submucosal neurons are major regulators of mucosal functions, myenteric neurons are involved in the control of GI motility (Kunze & Furness, 1999). The enteric circuit responsible for peristalsis is characterized by a polarized innervation involving ascending excitatory neurons and descending inhibitory neurons. Excitatory neurons are cholinergic and colocalize often substance P while inhibitory neurons synthesize neuronal nitric oxide (nNOS) and also vasoactive intestinal peptide or ATP (Kunze & Furness, 1999). These mediators are central in controlling motility and changes in their expression are often responsible or associated with GI dysmotility (Di Nardo *et al.*, 2008).

Changes in the expression of neuromediators can occur under physiological conditions such as growth or aging. In particular, during the postnatal period, age-associated increase in the proportion of nNOS and of choline acetyltransferase (ChAT)-immunoreactive neurons occurs and is associated with the development of colonic motility (de Vries *et al.*, 2010). Conversely, during aging, loss of nitroergic and cholinergic neurons has been reported (Takahashi *et al.*, 2000; Phillips, 2003). ENS phenotype can also be modulated by environmental factors of both endogenous or exogenous (luminal) origin. In particular, cellular constituents of the neuronal environment such as immune cells, enteric glia or even intestinal epithelial cells can directly modulate the expression of key neuromediators or enzymes in enteric neurons and impact on GI motility (Schemann *et al.*, 2005; Aubé *et al.*, 2006; Moriez *et al.*, 2009).

In contrast, much less is known about the role of luminal factors, in particular of nutritional origin, in the control of ENS neurochemical coding. A recent study demonstrated such an influence as butyrate increased the proportion of cholinergic neurons and cholinergic neuromuscular transmission, leading to enhanced colonic transit (Soret *et al.*, 2010). However, effects of long-term exposure to other dietary factors on ENS phenotype remain poorly documented. In particular, whether diet high in saturated fatty acid and in simple carbohydrate, also called Western diet (WD), can lead to neuroplastic changes in the ENS and whether these changes could impact on GI motility remains unknown.

Long-term consumption of High-fat diet has been shown to enhance gastric emptying of solid meals. In healthy volunteers, gastric emptying of a High-fat test meal is faster after 14

days of High-fat diet than before this diet (Castiglione *et al.*, 2002). Similarly, gastric emptying is increased in patients receiving a High-fat diet as compared to patients eating a low-fat diet (Cunningham *et al.*, 1991). However, these data are still scarce and only a few animal studies describing the impact of High-fat diet upon gastric functions are available. For example, in rats, after exposure to High-fat diet for 14 days, the inhibitory effect of small intestinal infusion of oleate on gastric emptying is attenuated when compared with rats consuming a low-fat diet (Covasa & Ritter, 2000). Furthermore, the mechanisms and factors responsible for putative functional changes induced by WD remain to be identified.

Leptin is a likely candidate involved in mediating these functional changes (Martínez *et al.*, 1999). Furthermore, circulating leptin levels are elevated during obesity and originate mainly from white adipose tissue (Considine *et al.*, 1996). However, whether changes in leptin also occur in the stomach during WD remains unknown. In addition, although leptin-induced changes in gastric functions occur in part via a modulation of vagal afferent (Cakir *et al.*, 2007), the impact of leptin upon the ENS remains unknown. Although leptin has been shown to increase activity in intestinal enteric neurons (Liu *et al.*, 1999; Reichardt *et al.*, 2011), its effects upon ENS phenotype and function in the stomach remain to be identified.

In the present study, we sought to characterize the impact of chronic ingestion of WD upon the phenotype of myenteric neurons in the antrum and the jejunum and its functional impact upon motility as well as to identify factors involved in these modifications.

## **METHODS**

### **Ethical approval**

Experiments were performed in accordance with an experimental protocol for animal study approved by the Inserm Institutional Animal Care and Use Committee.

### **Experimental protocol**

Male C57BL/6J Rj mice aged 4 weeks (Janvier Laboratory, Le Genest-Saint-Isle, France) were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle (22°C) and had free access to food and water. As described previously (Begrache *et al.*, 2008), after 1 week of adaptation period, animals were randomly assigned to receive for 12 weeks either a normal chow [ND group, Purified diet 210, SAFE, Augy, France] or a Western diet [WD group, Purified diet 230 HF, SAFE]. Body weight and food intake were measured weekly. Fasting glycemia was measured in tail vein blood samples using a glucometer (Roche, Paris, France). Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed as previously described (Andrikopoulos *et al.*, 2008). Plasma insulin and leptin levels were measured using radioimmunoassay kits (RI-13K and ML-82K, respectively, Linco Research, St. Charles, MO, USA). *db/db* mice (12 week-old, Janvier) were also used. Mice were euthanized by cervical dislocation.

### ***In vivo* and *ex vivo* measurement of gastrointestinal transit and contractile activity**

Gastric emptying (GE) and small intestinal transit were measured *in vivo* as described in Supplementary Material. For pharmacological characterization of GE, mice were intraperitoneally (IP) injected either with 0.9% sodium chloride (saline) or nitric oxide synthase inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 50 mg/kg; Sigma), as previously described (De Winter *et al.*, 2002). *Ex vivo* neuromuscular transmission in circular muscle of antrum were measured in organ bath chamber (Supplementary Material).

### **Calcium imaging of antral myenteric neurons**

Longitudinal muscle myenteric plexus (LMMP; 10 x 20 mm) preparations of antrum were continuously perfused with ice cold Krebs solution following staining with the calcium-sensitive probe Fluo-4 AM (Supplementary Material). The impact of electrical stimulation of interganglionic fiber tract on intracellular calcium concentrations in ganglionic structures was recorded by ultra-fast neuroimaging technique (Supplementary Material). After the

neuroimaging experiments, tissues were fixed and immunohistochemistry was performed to characterize whether responding cells were neurons or glial cells (Supplemental Material).

### **Immunohistochemical analysis.**

The stomach and about 2 cm of mid-jejunum were detubulized, stretched and fixed overnight in phosphate buffer saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde. After microdissection, whole-mounts were permeabilized for 1 h in PBS/NaN<sub>3</sub> containing 1% Triton X-100 and 10% donkey serum and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (Supplementary Table 1). After washing step, whole-mounts were incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies (Supplementary Table 1). Preparations were mounted on glass slides and viewed under a fluorescence microscope (Olympus IX50, France). Images were acquired with a digital camera (Olympus DP71) and analyzed with the Cell B software. As previously described (Hoff *et al.*, 2008), two different ganglia were defined as two separate entities if their borders were separated by a gap of at least two neurons in width. The number of Hu- and nNOS-immunoreactive (IR) neurons as well as Sox-10-IR glial cells was counted in at least 20 ganglia/tissue/mice. In order to exclude that difference between groups could be influenced by tissue compliance, we showed in preliminary experiments that neither ganglionic area nor number of neurons per ganglia was modified by the amplitude of stretch applied to the tissue prior fixation.

### **Determination of acetylcholine, GDNF and leptin levels.**

Specimens of antrum were placed in Lysing Matrix D tubes (MPBio, Thüringer, Germany) containing 500 µl of RIPA (Millipore, Temecula, CA, USA) with protease inhibitors (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and homogenized with a Precellys<sup>®</sup> 24 (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). The homogenate was centrifuged and the supernatant collected and stored at -80°C. Acetylcholine, GDNF or leptin levels were measured using Amplex<sup>®</sup> Red (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), GDNF E<sub>max</sub><sup>®</sup> (Promega, Madison, WI, USA) or leptin Quantikine<sup>®</sup> (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), respectively and normalized to protein concentration.

## **Role of leptin in modulation of GDNF production and in neuroprotection in the ENS**

### *Effects of leptin on GDNF mRNA levels and release*

Primary cultures of rat ENS, obtained as previously described, were used at 12-13 days after culture (Chevalier *et al.*, 2008). Primary cultures were incubated for 24 h with various concentrations of recombinant rat leptin (R&D Systems). GDNF levels were measured in supernatants of culture using E<sub>max</sub><sup>®</sup> ImmunoAssay System (Promega). Quantitative PCR of GDNF mRNA expression was performed, as previously described (Soret *et al.*, 2010) using the following primers:

- S6 (forward 5'-CCAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTAACTCC-3'; reverse 5'-CCCTCGAGTCCTTCATTCTCTTGGC-3');
- GDNF (forward 5'-GCTGCCCCGCCGGTAAGAG-3'; reverse 5'-TGGTGGCTTGAATAAAAATCCATGAC-3').

mRNA levels were quantified using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak & Schmittgen, 2001) with S6 as the internal control.

### *Neuroprotective effects of leptin*

Primary cultures of ENS were exposed for 24 h to recombinant rat leptin (100 ng/ml) in presence or absence of neutralizing antibody against rat GDNF (1 µg/ml; R&D Systems) or to recombinant rat GDNF (100 ng/ml, R&D Systems). Primary cultures were fixed and stained with antibodies against Hu C/D and active caspase-3 (Supplementary Table 1), as previously described (Abdo *et al.*, 2010). The number of active caspase-3- IR cells and Hu-IR cells was counted in 15 random ganglia for each well.

### **Statistical analysis**

Values are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M). Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison tests or two-way ANOVA followed by Bonferonni post test were performed using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc). Results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Characterization of the diet-induced obesity model.

WD mice had a significant greater caloric intake than ND mice (+43%,  $n=26$ ,  $P<0.0001$ ) (Table 1). This caloric intake resulted in a significant increase in weight gain as early as 2 weeks after the beginning of WD as compared to ND. After 12 weeks, WD mice had a 61% higher weight ( $n=37-38$ ,  $P<0.0001$ ) than ND mice (Table 1). At the end of the diet, WD mice had increased fat mass (+487%,  $n=35-37$ ,  $P<0.0001$ ), leptinemia (+129%,  $n=6$ ,  $P=0.002$ ), and insulinemia (+154%,  $n=6$ ,  $P=0.005$ ) without any change in fasting glycemia ( $n=20$ ,  $P=0.09$ ) as compared to ND mice (Table 1). However, after 4 and 8 weeks of diet, OGTT showed that the area under the glucose response curve was significantly higher in WD as compared to ND mice (Table 1, +24%,  $n=19-20$ ,  $P<0.0001$  and +25%,  $n=9-10$ ,  $P=0.003$ , respectively).

### Western diet modulated ENS phenotype in the antrum.

#### Changes in total neuronal population

In order to determine the effects of WD upon ENS phenotype, the number of Hu-IR neurons per ganglia was quantified before diet (T0) and after 12 weeks of WD or ND (Figure 1A and B). The total number of Hu-IR neurons per ganglia decreased with time between T0 and the end of ND (Figure 1B, -36%,  $n=5-7$ ,  $P<0.05$ ). In contrast, WD significantly prevented this decrease (Figure 1A and B,  $n=5-8$ ,  $P>0.05$ ).

#### Changes in nitrergic population

The number of nNOS-IR neurons per ganglia decreased between T0 and the end of ND (Figure 1C, -42%,  $n=5-7$ ,  $P<0.05$ ). WD prevented this decrease in nNOS-IR neurons (Figure 1C,  $n=5-8$ ,  $P>0.05$ ). This resulted in a significantly larger number of nitrergic neurons per ganglia at the end of WD than ND (Figure 1A and C, +63%,  $n=7-8$ ,  $P<0.05$ ). Concerning the cholinergic population, the faint staining of ChAT-IR neurons and the dense innervation of ChAT-IR fibers in ganglia prevented the precise analysis of this neuronal population (Supplementary Figure 1). Therefore, acetylcholine content was measured in the antrum. At the end of diet, acetylcholine level was similar between ND and WD mice ( $8.9\pm 1.8$  and  $12.7\pm 2.8$   $\mu\text{mol/g}$  of protein, respectively,  $n=10$ ,  $P=0.45$ ).

### Changes in electrophysiological properties of myenteric neurons

In order to determine the effects of diet on electrophysiological properties of antral myenteric neurons,  $[Ca^{2+}]_i$  transients were recorded in response to electrical train pulse stimulation of interganglionic fiber tracts. The stimulation evoked an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  associated with peaks (Figure 2A). These peaks correspond to action potential discharge (Michel, 2009). The number of peaks was similar in ND and WD mice (ND:  $9.7 \pm 0.1$  in 30 cells, 8 ganglia and 4 animals vs. WD:  $9.8 \pm 0.2$  in 19 cells, 7 ganglia and 4 animals,  $P=0.28$ ). The maximal amplitude of this response was 53% higher in myenteric cells of WD as compared to ND mice ( $P<0.001$ ) (Figure 2B). Immunohistochemical staining of PGP 9.5 and S-100 revealed immunoreactivity in 12 out of 35 cells from 5 tissues (3 ND and 2 WD mice). In the remaining 23 cells, the immunoreactivity was too faint to perform reliable analysis. 83% of responding cells to fibre tract stimulation were identified as neurons and 17% were glial cells.

### Changes in enteric glial cells

Lastly, the number of Sox-10-IR cells per ganglia in the antrum was similar between T0 and the end of ND (Figure 1D,  $n=4-7$ ,  $P>0.05$ ). However, after WD, the number of Sox-10-IR cells was significantly increased as compared to ND and T0 (Figure 1A and D, +36% and +38%, respectively,  $n=4-7$ ,  $P<0.05$ ).

### Changes in ENS phenotype in the jejunum

In jejunum, no difference was observed in the number of Hu-IR neurons between the different groups (Figure 1B,  $n=5-11$ ,  $P>0.05$ ). However, there was an increase in the number of nNOS-IR neurons per ganglia at the end of WD as compared to T0 (Figure 1C, +21%,  $n=5-11$ ,  $P<0.05$ ). Lastly, the number of Sox-10-IR cells was similar in the different groups of mice (Figure 1D,  $n=5-11$ ,  $P>0.05$ ).

## **Western diet increased gastric emptying and nitrergic neuromuscular transmission in antrum.**

In order to determine the putative functional impact of diet-induced neuroplastic changes in the antrum, gastric emptying and neuromuscular transmission in the antrum were evaluated.

### *In vivo* study

At the end of diet, GE was significantly increased by 39% ( $n=16-17$ ,  $P<0.05$ ) in WD as compared to ND mice (Figure 3A). L-NAME significantly reduced GE in WD (-34%,  $n=7$ ,  $P<0.05$ ) but not in ND mice ( $n=9$ ,  $P>0.05$ ) (Figure 3A). Saline did not modify GE (data not shown). In contrast, small intestinal transit was similar in ND and WD mice (Figure 3B,  $n=10$ ,  $P=0.36$ ).

### *Ex vivo* study

In basal conditions, electrical field stimulation (EFS) induced a small decrease in basal tone in antral circular muscle strips (Figure 3C). The area under the curve (AUC) of the EFS-induced response showed no significant difference between ND and WD mice (Figure 3C and D,  $n=25-27$ ,  $P=0.24$ ). In both groups, EFS-induced decrease in basal tone was significantly inhibited by L-NAME (Figure 3D). However, L-NAME sensitive component of EFS-induced AUC was significantly larger in WD as compared to ND mice (Figure 3E). Further addition of atropine significantly reduced EFS-induced AUC in both groups. In this latter condition, EFS-induced AUC was significantly larger in WD as compared to ND (Figure 3D). However, the atropine sensitive component of EFS-induced AUC was similar in both groups (Figure 3F).

Responses to carbachol and sodium nitroprusside (SNP) were similar in both groups (Supplementary Figure 2,  $n=25$ ,  $P>0.05$  and  $n=7-10$ ,  $P>0.05$ , respectively).

### **Western diet increased expression of GDNF in the antrum.**

We next determined whether WD-induced prevention of age-associated changes in the ENS could be associated with increased expression of neuroprotective factors such as GDNF. In ND mice, antral GDNF concentration remained constant over the duration of diet (Figure 4A,  $n=5-10$ ,  $P>0.05$ ). In contrast, WD induced a time-dependent increase in GDNF concentration as early as after 8 weeks of diet (Figure 4A). At the end of diet, GDNF concentration was significantly increased by 65% ( $n=10$ ,  $P<0.05$ ) in WD as compared to ND mice (Figure 4A). Immunohistochemical analysis revealed GDNF and Ret expression at the level of neurons while GFR $\alpha$ 1 expression was found both in neurons and glial cells (Supplementary Figure 3).

### **Leptin was involved in the regulation of GDNF production.**

In parallel to changes in GDNF concentration, we also characterized the impact of WD upon leptin. There was no time-dependent change in leptin concentration in the antrum during ND (Figure 4B,  $n=5-10$ ,  $P>0.05$ ). In contrast, WD induced a time-dependent increase in leptin concentration as early as after 4 weeks of diet (Figure 4B). At the end of diet, leptin concentration was increased by 753% ( $n=10$ ,  $P<0.001$ ) in WD as compared to ND mice (Figure 4B). Interestingly, leptin and GDNF concentrations were positively correlated in the antrum ( $r=0.464$ ,  $n=43$ ,  $P=0.002$ ).

Consequently, we tested the hypothesis that leptin could be involved in the regulation of GDNF production. Leptin receptors were expressed both in neurons and in some glial cells in antrum (Figure 4C) and in primary culture of ENS. In *db/db* mice (devoid of leptin receptors), we showed that antral GDNF concentration was significantly reduced as compared to WT mice (Figure 4D, -88%,  $n=4-7$ ,  $P<0.05$ ). Furthermore, leptin induced a significant increase in GDNF content in supernatants of primary culture of ENS (Figure 4E,  $n=14-23$ ,  $P<0.05$ ). Leptin (1 ng/ml) also induced a significant increase in GDNF mRNA expression as compared to control ( $3.4\pm 0.7$  vs.  $1.2\pm 0.3$ , respectively,  $n=5$ ,  $P=0.03$ ).

### **Leptin had neuroprotective effects via GDNF.**

Neuroprotective effects of leptin and GDNF involvement in these effects were finally investigated. Incubation of primary culture with leptin significantly reduced by 86% ( $n=10-12$ ,  $P<0.05$ ) the proportion of active caspase-3-IR neurons as compared to control (Figure 5A). The effect of leptin was abolished with anti-GDNF neutralizing antibody (Figure 5A,  $n=10-13$ ,  $P>0.05$ ). Finally, we showed that GDNF significantly reduced by 91% ( $n=5-7$ ,  $P=0.03$ ) the proportion of active caspase-3-IR neurons as compared to control (Figure 5B).

## DISCUSSION

This study demonstrated that WD induced neuroplastic changes in the antrum leading to a NO-dependent acceleration of GE. In particular, WD prevented age-associated loss of gastric myenteric neurons, especially nitrergic ones, observed in ND mice. In addition, during WD but not ND, a time-dependent increase in leptin and GDNF concentrations occurred in the antrum. Finally, leptin increased GDNF production in the ENS and induced neuroprotective effects mediated in part by GDNF.

An important finding of our study was that WD prevented age-associated neuroplastic changes in the antrum. Indeed, in the antrum of ND mice, the number of neurons per ganglia decreased by 36% during the course of the diet (*i.e.* between 5 weeks and 17 weeks of age) while they were preserved in WD mice. Age-associated loss of myenteric neurons has already been reported in the antrum of mice during the first year of life (El-Salhy *et al.*, 1999). Similarly to our results, loss of neurons started after 12 weeks of age and reached 30% at 52 weeks as compared to 4 week-old mice (El-Salhy *et al.*, 1999). Furthermore, we also identified nitrergic neurons as being specifically affected by age. Although no data exists in the antrum, various studies have reported age-associated loss of nitrergic myenteric neurons in the colon of rats and mice (Takahashi *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2009). This increase in neuronal density and in particular of NOS-IR neurons could be responsible for the larger Ca concentration induced by fiber tract nerve stimulation in the ENS in WD as compared to ND mice. Indeed, NO has been shown to increase intracellular concentration in myenteric neurons (Sitmo *et al.*, 2007).

Another finding of this study was that the effects of WD upon nitrergic neurons had functional impact upon GE and neuromuscular transmission in the antrum. Indeed, after 12 weeks of diet, the number of nNOS-IR neurons was significantly larger in the antrum of WD than in ND mice. Consequently, the amplitude of both NO-dependent neuromuscular transmission and NO-dependent GE was increased in WD as compared to ND mice. In addition, no change in cholinergic neuromuscular transmission was observed in our study, which is consistent with the absence of effects of WD upon acetylcholine content in the antrum. Our data are in accordance with the key role played by NO in the control of GE. Indeed, in nNOS KO mice, GE was reduced (Mashimo *et al.*, 2000) and administration of NO biosynthesis inhibitors delayed GE in rats and mice (Plourde *et al.*, 1994; Orihata & Sarna,

1994). Similarly, the WD-induced increase in GE observed in mice is in agreement with studies in patients demonstrating an acceleration of GE consecutively to High-fat diet (Cunningham *et al.*, 1991; Castiglione *et al.*, 2002) or during obesity (Cardoso-Júnior *et al.*, 2007).

We also demonstrated that WD-induced effects were mediated in part by leptin and GDNF. We first showed that WD increased leptin content in the antrum as early as after 4 weeks of diet. This time course of leptin changes in the stomach is similar to the one observed in the plasma during High-fat diet (Collin *et al.*, 2006; Sutherland *et al.*, 2008). We next demonstrated that leptin could induce GDNF synthesis and release by the ENS. We first identified leptin receptors in neuronal and glial structures of the antrum, which is in agreement with a previous study showing the expression of leptin receptors on ileal myenteric neurons (Liu *et al.*, 1999). Although a role of leptin in the regulation of GDNF production in the central nervous system (CNS) and the ENS has never been described, leptin can increase the secretion of other neurotrophins such as brain derived-neurotrophic factor in the CNS (Komori *et al.*, 2006). Mechanisms involved in the regulation of GDNF secretion by leptin remain unknown but could involve STAT3 as 1) IL-1 $\beta$  increased GDNF release by rat glioma cells via a STAT3-dependent mechanism (Tanabe *et al.*, 2009) and 2) leptin increased STAT3 phosphorylation in neurons of the nodose ganglia (de Lartigue *et al.*, 2011).

We finally demonstrated that leptin exerted neuroprotective effects in part via GDNF, although we cannot exclude a direct effect of leptin. Neuroprotective effects of leptin have never been identified in the central or peripheral nervous system. However, leptin has been shown to exert cytoprotective effects upon neuronal cell lines during oxidative stress (Lu *et al.*, 2006; Weng *et al.*, 2007). Furthermore, the neuroprotective role of GDNF that we observed is consistent with previous studies showing that GDNF increased survival of postnatal myenteric neurons (Rodrigues *et al.*, 2011). GDNF also prevented hyperglycemia-induced loss of myenteric neurons, especially nitrergic ones, in streptozotocine-induced diabetic mice (Anitha *et al.*, 2006). These results are also consistent with data showing that GDNF +/- mice have fewer myenteric neurons than wild-type animals in the stomach (Shen *et al.*, 2002). Our study also extends the protective effects of leptin described in the stomach to the ENS. Indeed, in the stomach, leptin exerts mucosal protective effects and favors repair processes (Brzozowski *et al.*, 1999; Konturek *et al.*, 2001). Interestingly, GDNF has also been shown to protect intestinal epithelial barrier (Zhang *et al.*, 2010). Therefore, it is tempting to

speculate for a central role of leptin and GDNF in the regulation of neuronal and barrier homeostasis in the stomach.

The overall protective effects of WD observed in our study might be surprising with regard to the long-term adverse effects of obesity. However, our model probably reflects the earlier phases of obesity. In particular, our results strongly suggest that WD can exert a beneficial effect upon gastric functions via upregulation of leptin. However, loss of leptin sensitivity, as observed in latter phases of obesity after 20 weeks of High-fat diet in mice (Lin *et al.*, 2000), would lead to loss of neuroprotective effects of WD and favor the development of enteric neuropathies and GI dysfunctions.

In conclusion, our study demonstrated that WD induced changes in gastric functions characterized by increasing gastric emptying. These functional changes were associated with a prevention of age-associated neuronal cell death likely involving the production of leptin and GDNF. Nutritional intervention taking advantage of the WD-beneficial factors (such as leptin or GDNF) could be used as new therapeutic approach in the treatment of gastric enteric neuropathies and associated dysfunctions.

## REFERENCES

- Abdo H, Derkinderen P, Gomes P, Chevalier J, Aubert P, Masson D, Galmiche J-P, Vanden Berghe P, Neunlist M & Lardeux B (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J* **24**, 1082–1094.
- Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC & Proietto J (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E1323–E1332.
- Anitha M, Gondha C, Sutliff R, Parsadanian A, Mwangi S, Sitaraman SV & Srinivasan S (2006). GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J Clin Invest* **116**, 344–356.
- Aubé A-C, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP & Neunlist M (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* **55**, 630–637.
- Begrache K, Lettéron P, Abbey-Toby A, Vadrot N, Robin M-A, Bado A, Pessayre D & Fromenty B (2008). Partial leptin deficiency favors diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E939–E951.
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Pajdo R, Duda A, Pierzchalski P, Bielański W & Hahn EG (1999). Leptin in gastroprotection induced by cholecystokinin or by a meal. Role of vagal and sensory nerves and nitric oxide. *Eur J Pharmacol* **374**, 263–276.
- Cakir B, Kasimay O, Devseren E & Yeğen BC (2007). Leptin inhibits gastric emptying in rats: role of CCK receptors and vagal afferent fibers. *Physiol Res* **56**, 315–322.
- Cardoso-Júnior A, Coelho LGV, Savassi-Rocha PR, Vignolo MC, Abrantes MM, de Almeida AM, Dias EE, Vieira Júnior G, de Castro MM & Lemos YV (2007). Gastric emptying of solids and semi-solids in morbidly obese and non-obese subjects: an assessment using the <sup>13</sup>C-octanoic acid and <sup>13</sup>C-acetic acid breath tests. *Obes Surg* **17**, 236–241.
- Castiglione KE, Read NW & French SJ (2002). Adaptation to High-fat diet accelerates emptying of fat but not carbohydrate test meals in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R366–R371.
- Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P & Neunlist M (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol (Lond)* **586**, 1963–1975.
- Collin P, Chapados N, Dufresne E, Corriveau P, Imbeault P & Lavoie J-M (2006). Time course of changes in in vitro lipolysis of intra-abdominal fat depots in relation to High-fat diet-induced hepatic steatosis in rats. *Br J Nutr* **96**, 268–275.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ & Bauer TL (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* **334**, 292–295.
- Covasa M & Ritter RC (2000). Adaptation to High-fat diet reduces inhibition of gastric emptying by CCK and intestinal oleate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R166–R170.
- Cunningham KM, Daly J, Horowitz M & Read NW (1991). Gastrointestinal adaptation to diets of differing fat composition in human volunteers. *Gut* **32**, 483–486.

- El-Salhy M, Sandström O & Holmlund F (1999). Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. *Mech Ageing Dev* **107**, 93–103.
- Hoff S, Zeller F, von Weyhern CWH, Wegner M, Schemann M, Michel K & Rühl A (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol* **509**, 356–371.
- Komori T, Morikawa Y, Nanjo K & Senba E (2006). Induction of brain-derived neurotrophic factor by leptin in the ventromedial hypothalamus. *Neuroscience* **139**, 1107–1115.
- Konturek PC, Brzozowski T, Sulekova Z, Brzozowska I, Duda A, Meixner H, Hahn EG & Konturek SJ (2001). Role of leptin in ulcer healing. *Eur J Pharmacol* **414**, 87–97.
- Kunze WA & Furness JB (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* **61**, 117–142.
- de Lartigue G, Barbier de la Serre C, Espero E, Lee J & Raybould HE (2011). Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E187–E195.
- Lin S, Thomas TC, Storlien LH & Huang XF (2000). Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**, 639–646.
- Liu M, Seino S & Kirchgessner AL (1999). Identification and characterization of glucoreponsive neurons in the enteric nervous system. *J Neurosci* **19**, 10305–10317.
- Liu M-T, Kuan Y-H, Wang J, Hen R & Gershon MD (2009). 5-HT<sub>4</sub> receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci* **29**, 9683–9699.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408.
- Lu J, Park C-S, Lee S-K, Shin DW & Kang J-H (2006). Leptin inhibits 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* **407**, 240–243.
- Martínez V, Barrachina MD, Wang L & Taché Y (1999). Intracerebroventricular leptin inhibits gastric emptying of a solid nutrient meal in rats. *Neuroreport* **10**, 3217–3221.
- Mashimo H, Kjellin A & Goyal RK (2000). Gastric stasis in neuronal nitric oxide synthase-deficient knockout mice. *Gastroenterology* **119**, 766–773.
- Michel K (2009). Calcium and voltage sensitive dye imaging in cultured myenteric neurons of the guinea pig. *NGM Chicago, Neurogastroenterology and motility*, pages:1–98.
- Moriez R, Abdo H, Chaumette T, Faure M, Lardeux B & Neunlist M (2009). Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: Role of epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **382**, 577–582.
- Di Nardo G, Blandizzi C, Volta U, Colucci R, Stanghellini V, Barbara G, Del Tacca M, Tonini M, Corinaldesi R & De Giorgio R (2008). Review article: molecular, pathological and therapeutic features of human enteric neuropathies. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **28**, 25–42.
- Orihata M & Sarna SK (1994). Inhibition of nitric oxide synthase delays gastric emptying of solid meals. *J Pharmacol Exp Ther* **271**, 660–670.

- Phillips R (2003). Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Autonomic Neuroscience* **106**, 69–83.
- Plourde V, Quintero E, Suto G, Coimbra C & Taché Y (1994). Delayed gastric emptying induced by inhibitors of nitric oxide synthase in rats. *Eur J Pharmacol* **256**, 125–129.
- Reichardt F, Krueger D & Schemann M (2011). Leptin excites enteric neurons of guinea-pig submucous and myenteric plexus. *Neurogastroenterol Motil* **23**, e165–e170.
- Rodrigues DM, Li AY, Nair DG & Blennerhassett MG (2011). Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **23**, e44–e56.
- Schemann M, Michel K, Ceregrzyn M, Zeller F, Seidl S & Bischoff SC (2005). Human mast cell mediator cocktail excites neurons in human and guinea-pig enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **17**, 281–289.
- Shen L, Pichel JG, Mayeli T, Sariola H, Lu B & Westphal H (2002). Gdnf haploinsufficiency causes Hirschsprung-like intestinal obstruction and early-onset lethality in mice. *Am J Hum Genet* **70**, 435–447.
- Sitmo M, Rehn M & Diener M (2007). Stimulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels by NO at rat myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G886–G893.
- Soret R, Chevalier J, De Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, Segain JP & Neunlist M (2010). Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats. *Gastroenterology* **138**, 1772–1782.e4.
- Sutherland LN, Capozzi LC, Turchinsky NJ, Bell RC & Wright DC (2008). Time course of High-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E1076–E1083.
- Takahashi T, Qoubaitary A, Owyang C & Wiley JW (2000). Decreased expression of nitric oxide synthase in the colonic myenteric plexus of aged rats. *Brain Res* **883**, 15–21.
- Tanabe K, Nishimura K, Dohi S & Kozawa O (2009). Mechanisms of interleukin-1beta-induced GDNF release from rat glioma cells. *Brain Res* **1274**, 11–20.
- de Vries P, Soret R, Suply E, Heloury Y & Neunlist M (2010). Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* **299**, G539–G547.
- Weng Z, Signore AP, Gao Y, Wang S, Zhang F, Hastings T, Yin X-M & Chen J (2007). Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* **282**, 34479–34491.
- De Winter BY, Bredenoord AJ, De Man JG, Moreels TG, Herman AG & Pelckmans PA (2002). Effect of inhibition of inducible nitric oxide synthase and guanylyl cyclase on endotoxin-induced delay in gastric emptying and intestinal transit in mice. *Shock* **18**, 125–131.
- Zhang DK, He FQ, Li TK, Pang XH, Cui DJ, Xie Q, Huang XL & Gan HT (2010). Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J Pathol* **222**, 213–222.

## **AUTHORS CONTRIBUTIONS**

**Charlotte Baudry and Raphaël Moriez** contributed to conception and design of the experiments, collection, analysis and interpretation of data and to the draft of the article and critical revision for important intellectual content.

**Stanislas Bruley des Varannes, Michael Schemann and Michel Neunlist** contributed to conception and design of the experiments and revision of the article for important intellectual content.

**François Reichardt, Justine Marchix and André Bado** contributed to conception and design of the experiments, collection, analysis and interpretation of data.

We confirm that all of the authors approved the final version of the manuscript and had no conflicts of interest to disclose.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Birgit Kuch and Mandy Biraud for their technical support.

## **GRANTS**

This research was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale, the Agence Nationale de la Recherche (ALIA 2009), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Sche 267/8-1) and the Nycomed pharmaceutical company. Charlotte Baudry is a recipient of a research grant from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur.

**Table 1. Characterization of the diet-induced obesity model**

		ND	WD
Daily food intake	(g)	19.4 ± 0.6	17.9 ± 0.5
	(kCal)	66.6 ± 1.9	95.5 ± 2.8 *
Body weight (g)	0 week of diet	18.3 ± 0.2	18.2 ± 0.2
	12 weeks of diet	24.4 ± 0.25	39.2 ± 0.8 *
Epididymal WAT (g)		0.24 ± 0.01	1.41 ± 0.1 *
Plasma glucose (mg/dL)		108.2 ± 1.9	102.8 ± 2.3
Plasma leptin (ng/mL)		0.75 ± 0.07	1.72 ± 0.19 *
Plasma insulin (ng/mL)		0.28 ± 0.05	0.71 ± 0.06 *
OGTT: AUC <sub>glucose</sub> (mg/dLx120min)	4 weeks of diet	22422 ± 753	27707 ± 614 *
	8 weeks of diet	23430 ± 1283	29407 ± 1207 *

WAT: white adipose tissue; OGTT: oral glucose tolerance test; AUC glucose: area under the glucose response curve. (Values are expressed as means ± S.E.M. \*  $P < .05$ , Mann-Whitney test)

## FIGURES LEGENDS

### **Figure 1. Impact of Western diet upon ENS phenotype in antrum and jejunum.**

(A) Immunohistochemical labeling of antral myenteric plexus in mice after 12 weeks of normal diet (ND) and Western diet (WD). Myenteric neurons were stained with anti-Hu C/D and anti-nNOS antibodies. Enteric glial cells were stained with anti-Sox-10 antibody. Scale bar=50 $\mu$ m. (B-D) Quantitative analysis of the number of Hu-IR neurons (B), nNOS-IR neurons (C) and Sox-10-IR cells (D) per ganglia was performed in antrum and jejunum in mice before the beginning of the diet (T0,  $n=5$ ) and in mice after 12 weeks of ND or WD ( $n=7-11$ ). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , Kruskal-Wallis test).

### **Figure 2. Impact of Western diet upon $[Ca^{2+}]_i$ in response to electric stimulation of interganglionic fiber tracts in myenteric neurons.**

(A) Typical recordings showing calcium responses in a myenteric neuron from a normal diet (ND) mice and from a Western diet (WD) mice during and following interganglionic fiber tract train pulse stimulation. Calcium peaks can be observed during each electrical pulse. (B) Percentage of changes of resting fluorescence ( $\Delta F/F$ ) induced by train pulse stimulations of interganglionic fiber tracts in cells of the myenteric plexus (ND:  $n=30$  cells, 8 ganglia, 4 mice and WD:  $n=19$  cells, 7 ganglia, 4 mice). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , Mann-Whitney test).

### **Figure 3. Impact of Western diet upon gastric emptying, small intestinal transit and neuromuscular transmission in antrum.**

(A) Gastric emptying of solids in mice after 12 weeks of ND or WD following intraperitoneal injection of saline ( $n=16-17$ ) or L-NAME solution ( $n=7-9$ ). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , Kruskal-Wallis test). (B) Small intestinal transit in mice after 12 weeks of ND or WD ( $n=10$ ). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , Mann-Whitney test). (C) Typical recordings showing EFS-mediated contractile responses in ND and WD mice in basal conditions. (D) Quantitative analysis of the area under the curve (AUC) measured during EFS in ND and WD mice in basal conditions, in the presence of L-NAME and in the presence of L-NAME and atropine ( $n=25-27$ ). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , Kruskal-Wallis test). (E) Quantitative analysis of L-NAME sensitive AUC ( $\Delta$ AUC; difference between AUC in the presence of L-NAME and AUC

without drug) in ND and WD mice ( $n=25-27$ ). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , Mann-Whitney test). (F) Quantitative analysis of atropine sensitive AUC ( $\Delta$ AUC; difference between AUC in the presence of L-NAME and atropine and AUC in the presence of L-NAME) in ND and WD mice ( $n=25-27$ ). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , Mann-Whitney test).

**Figure 4. Impact of Western diet upon GDNF and leptin content in antrum. Involvement of leptin in the regulation of GDNF production.**

(A) Evolution of GDNF concentration in antrum in mice before diet ( $n=5$ ), after 4 weeks ( $n=5$ ), 8 weeks ( $n=5$ ) and 12 weeks ( $n=10$ ) of normal diet (ND) or Western diet (WD). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , two-way ANOVA). (B) Evolution of leptin concentration in antrum in mice before diet ( $n=5$ ), after 4 weeks ( $n=5$ ), 8 weeks ( $n=5$ ) and 12 weeks ( $n=10$ ) of ND or WD. (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , two-way ANOVA). (C) Immunohistochemical labeling of antral myenteric plexus with anti-ObR, anti-PGP 9.5 and anti-GFAP antibodies. ObR-IR cells coexpressed PGP 9.5 (arrows) and GFAP (arrowheads). Scale bar=50 $\mu$ m. (D) GDNF concentration in antrum in 12 week-old WT, *db/+* and *db/db* mice ( $n=4-7$ ). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , Kruskal-Wallis test). (E) GDNF concentration in supernatants of primary cultures of ENS treated with different doses of leptin for 24 h, normalized to control ( $n=14-23$ ; control 69.5 $\pm$ 5.4 pg/ml). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$  vs. control, Kruskal-Wallis test).

**Figure 5. Involvement of GDNF in neuroprotective effects of leptin.**

(A) Percentage of active caspase-3-IR neurons (of total Hu-IR neurons) in primary cultures of ENS treated with leptin and anti-GDNF neutralizing antibody (GDNF neut. Ab) and normalized to control ( $n=10-13$ ; control: 0.48 $\pm$ 0.23%). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , Kruskal-Wallis test). (B) Percentage of active caspase-3-IR neurons (of total Hu-IR neurons) in primary cultures of ENS treated with GDNF and normalized to control ( $n=5-7$ ; control: 0.25 $\pm$ 0.08%). (Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P<0.05$ , Mann-Whitney test).

Figure 1.

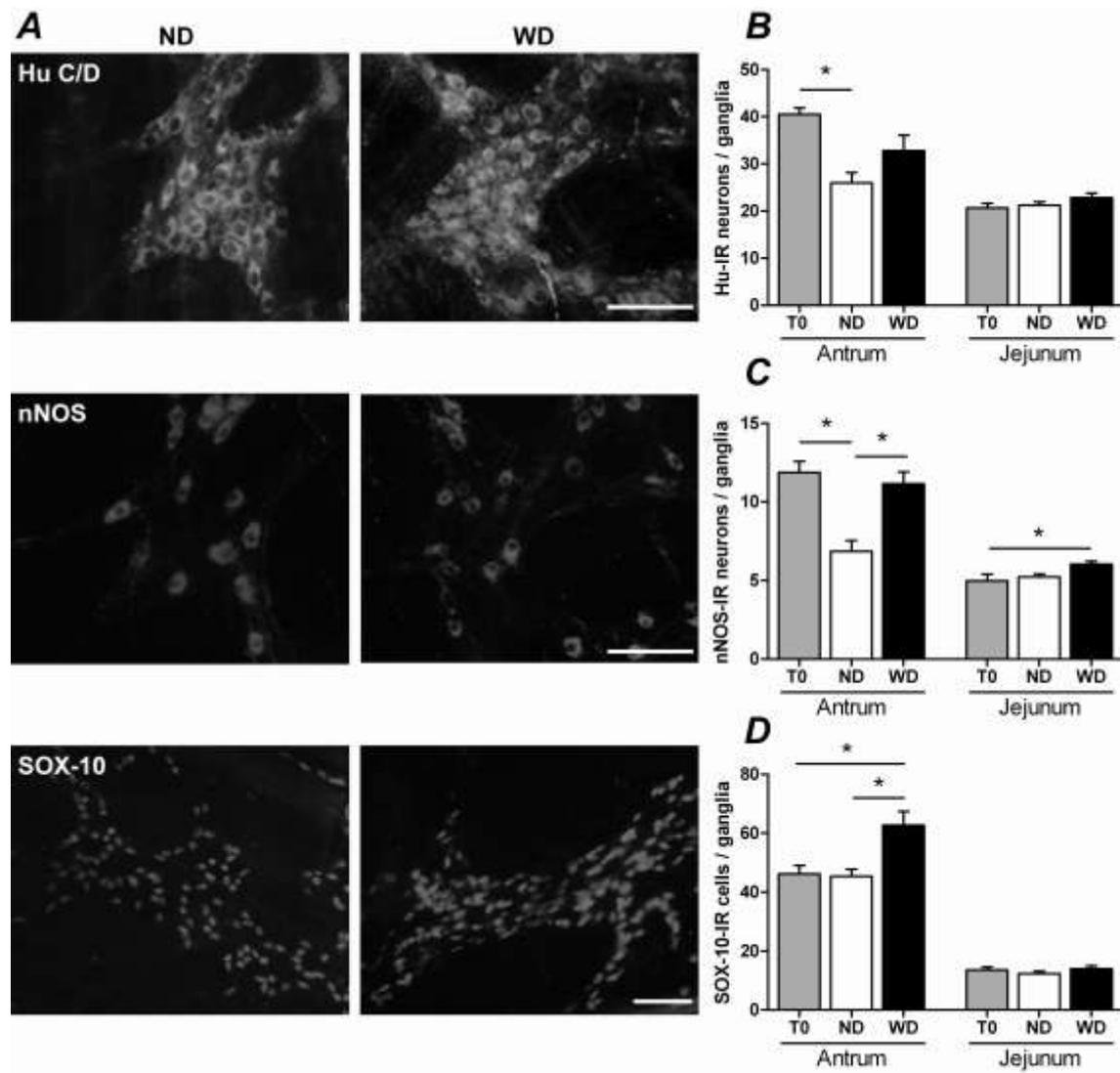


Figure 2.

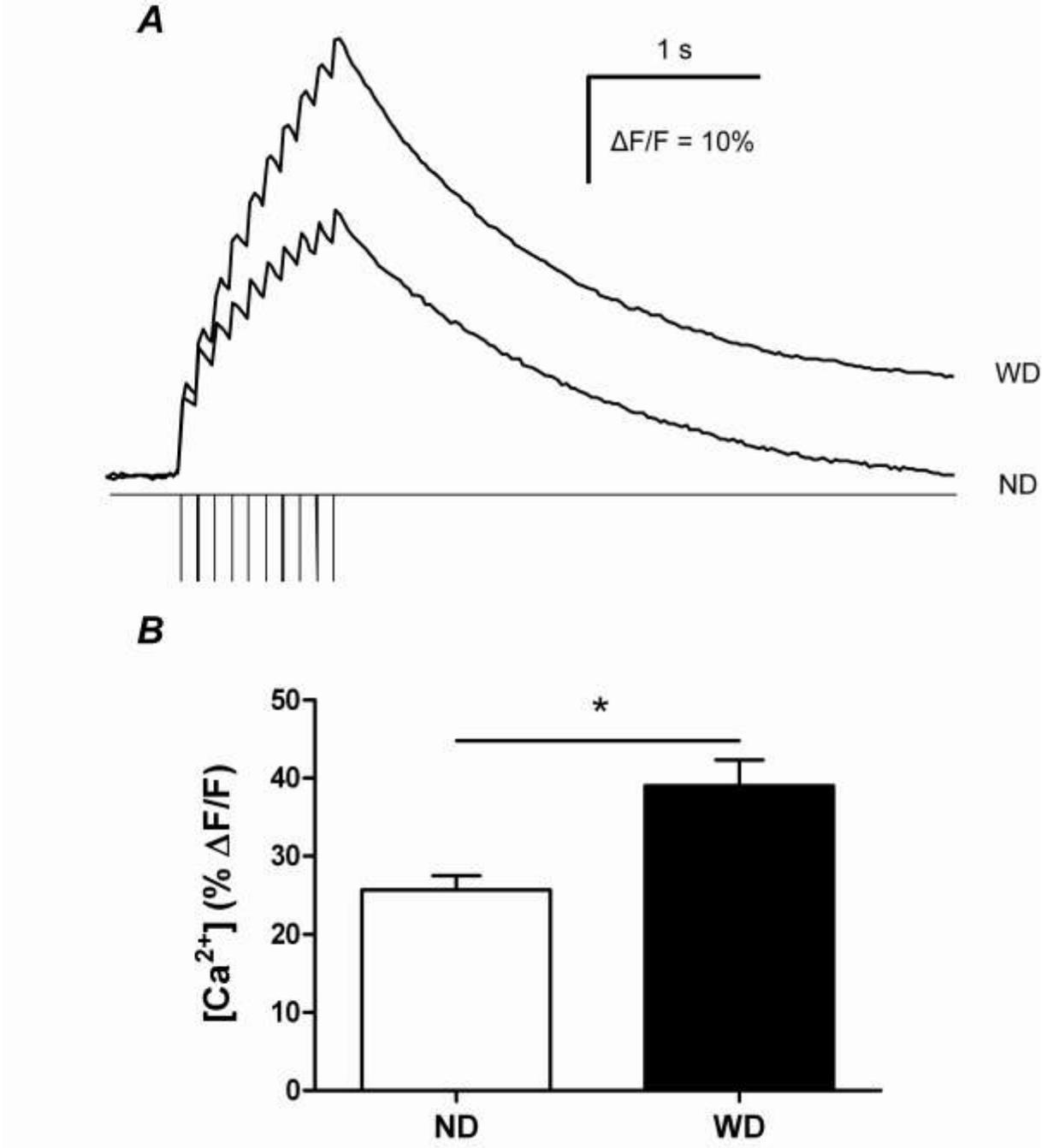


Figure 3.

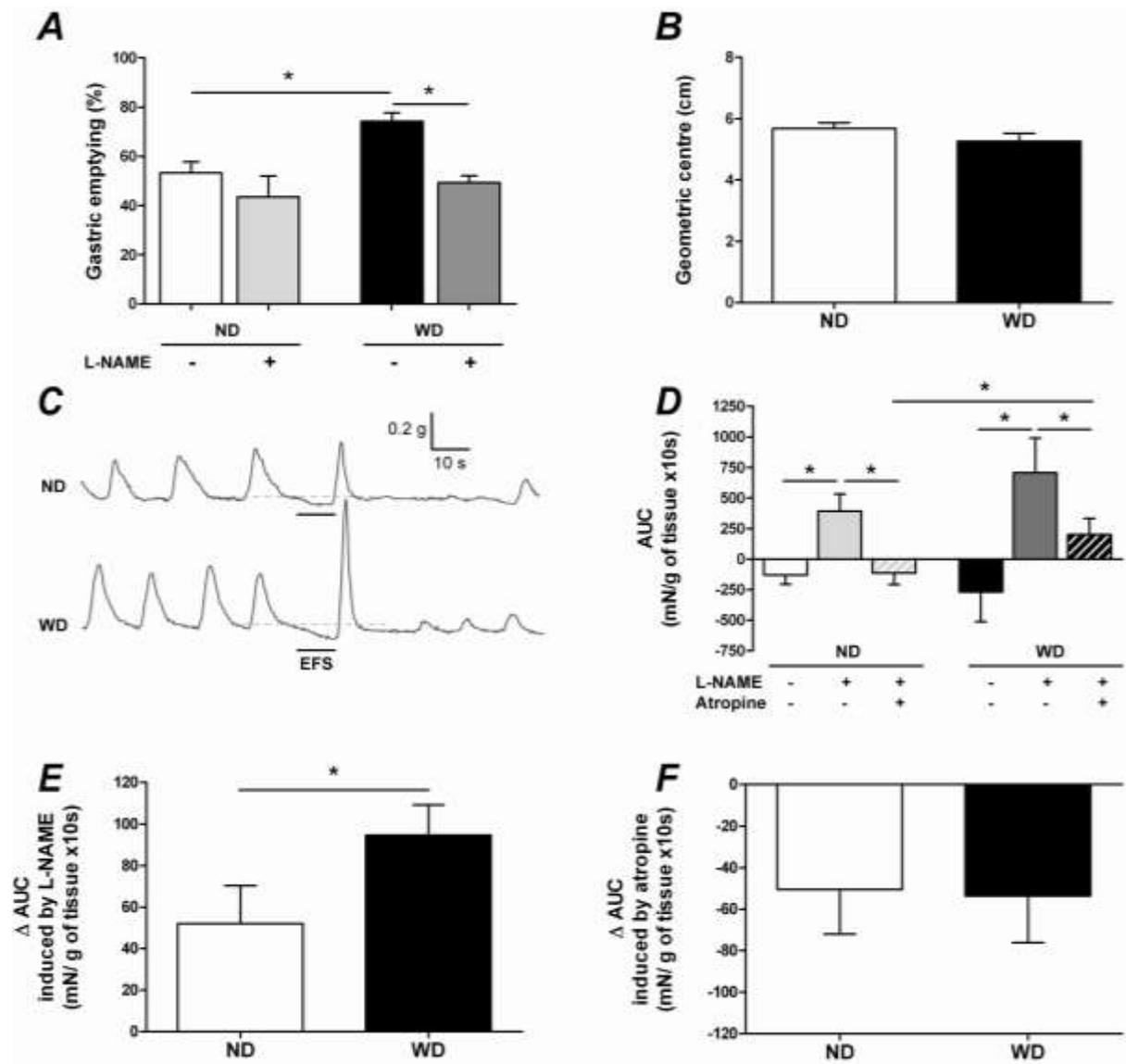


Figure 4.

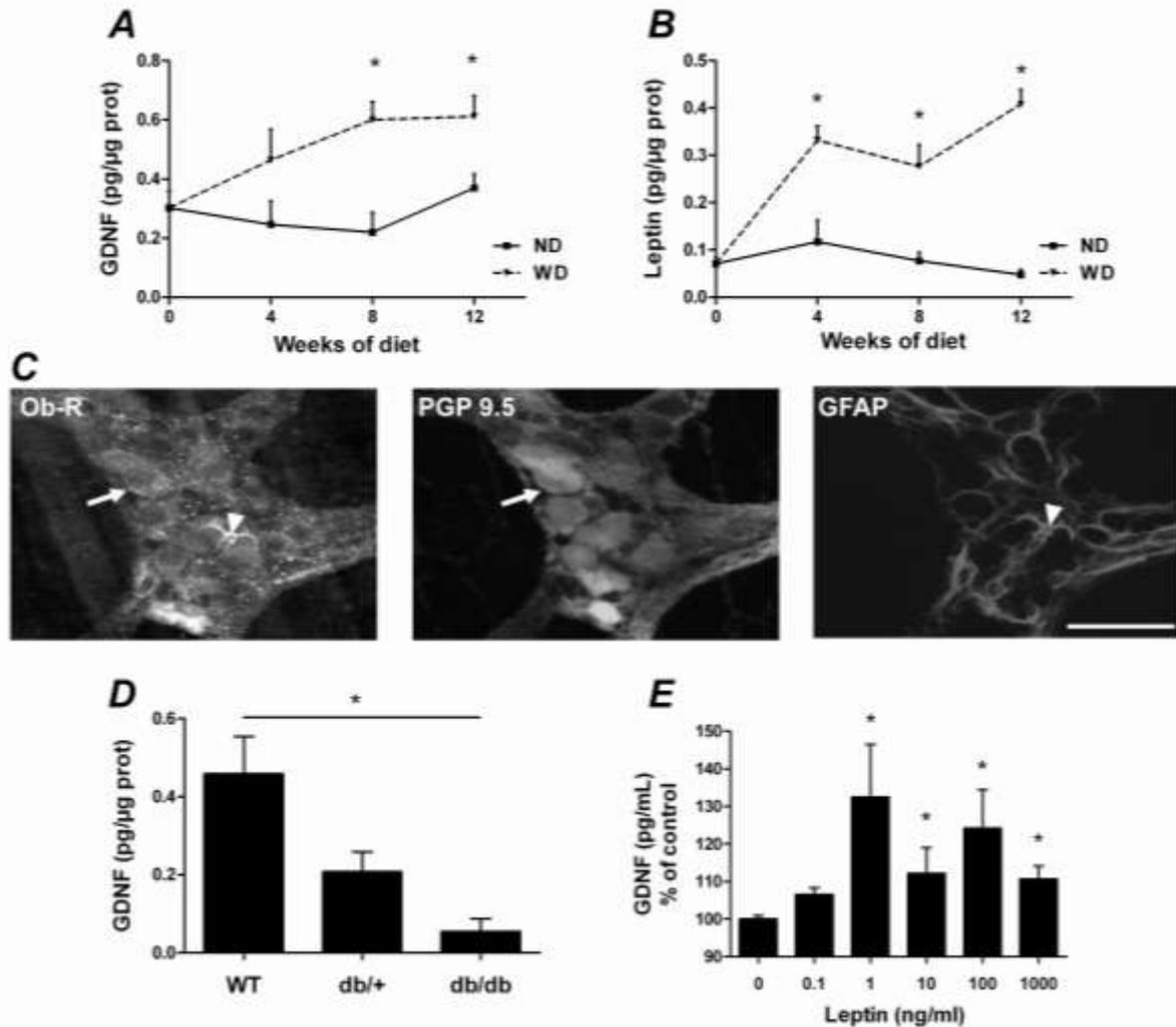
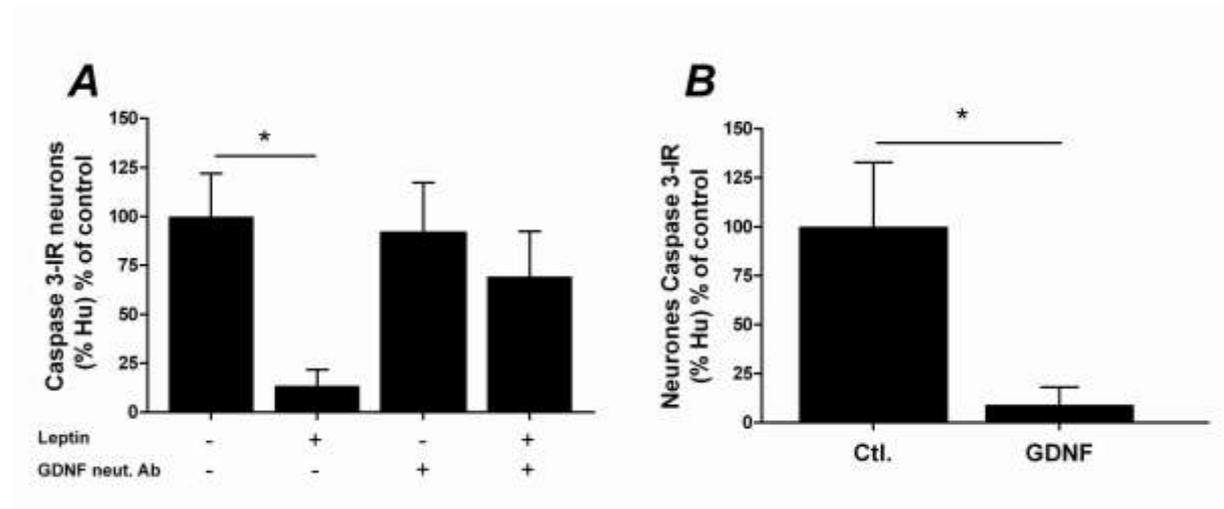


Figure 5.



## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### ***In vivo* studies: test for gastric emptying**

Gastric emptying for solids was measured as previously reported (Yamamoto *et al.*, 2008). After a 24-h fasting period (9:00 AM - 9:00 AM) with free access to water, mice had free access to pre-weighed Western diet for 1 h (9:00 AM - 10:00 AM). Food intake was calculated by weighing food left uneaten. Mice were returned to the cages without food and water, and sacrificed after 1.5 h. After clamping the esophagus at the cardia and pylorus, the stomach was exposed, and the content of the stomach was dried and weighed. Gastric emptying was calculated according to the following formula: gastric emptying (%) = [1 - (weight of food remaining in the stomach/weight of food intake)]/100.

### **Small intestinal transit**

Small intestinal transit was determined by assessing the distribution of the 70 kDa FITC conjugated dextran marker (Sigma) throughout the gastrointestinal tract as previously described (Aubé *et al.*, 2006). Briefly, mice were fasted overnight with free access to water. In the morning between 8:00 and 9:00 AM, each mouse was gavaged with 0.2 ml of 5 mg/ml FITC-dextran prepared in PBS. After 20 min postgavage, mice were sacrificed by cervical dislocation. The entire gastrointestinal tract was removed and divided into 10 equal segments of small intestine. The intestinal segments were opened, and the luminal contents were rinsed out into 2 ml of PBS and centrifuged at 1200 rpm for 5 min, and fluorescence activity of the supernatant was measured using a fluorimeter (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, FR). For measurement of small intestinal transit, the geometric center of the fluorescence distribution present in the small intestine only was calculated as previously described (Aubé *et al.*, 2006).

### ***Ex vivo* studies: gastric motility**

Mice were killed by cervical dislocation. The whole stomach of each mouse was then quickly excised and placed in an ice-cold Krebs solution (NaCl, 117 mM; KCl, 4.7 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM and glucose, 11 mM). Circular muscle strips (10–15 mm in length and 0.5 mm in width) were cut from distal antrum region. Muscle preparations were suspended vertically in an organ bath filled with Krebs solution warmed at 37 °C and gassed with 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>. After an equilibration period of 45-60 min at initial tension of 0.5 g, muscle strips were stimulated with two platinum rod electrodes.

Three electrical field stimulation (EFS, train duration: 10 s; stimulation frequency: 20 Hz; pulse duration: 200  $\mu$ s; pulse amplitude: 15 V) were applied at 10-min intervals.

EFS-induced responses in preparations from ND and WD mice were compared in basal condition, in the presence of the nitric oxide synthase inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME 500  $\mu$ M; Sigma) and L-NAME + atropine (1  $\mu$ M; Sigma). Atropine and L-NAME were applied 15 min before nerve stimulation. At the end of the experiment, after multiple washings, dose-response curves were generated by exposing the tissue to increasing concentrations of the muscarinic agonist carbachol (1 nM to 10 mM; Sigma). Lastly, the response of the antrum preparation to the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP 10<sup>-4</sup> M; Sigma) was measured. The effects of EFS and carbachol on tension were evaluated by measuring the area under the curve (AUC) using baseline as the 0 value. For EFS, AUC was measured during stimulation (10 s). For carbachol, AUC was measured for 2 minutes following the addition of a dose of carbachol respectively. All values were normalized to the wet weight of the tissue. Data are expressed in mN/ g of tissue x duration of measurement of the AUC. The contractile response of the circular muscle was continuously recorded, using isometric force transducers (Basile no 7005; Comerio, VA, IT), and a MacLab/4s System (ADI, Spechbach, DE). All EFS-induced responses were of neuronal origin as they were abolished in the presence of tetrodotoxin (1  $\mu$ M; Sigma) (data not shown). All tested substances were administered in a volume which did not exceed 1% of the total bath volume.

### **Calcium imaging of antral myenteric neurons**

Electrophysiological properties of antral myenteric neurons were investigated in 4 ND and 4 WD C57BL/6J mice (Charles Rivers, Sulzfeld, Germany). Stomachs were sampled and dissected to obtain preparations of the myenteric plexus (final size, 10 x 20 mm) that were continuously perfused with ice cold Krebs solution of the following composition; in mM: MgCl<sub>2</sub>: 1.2, CaCl<sub>2</sub>: 2.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.2, NaCl: 120.9, NaHCO<sub>3</sub>: 14.4, Glucose: 11.5, KCl: 5.9, at pH 7.4, gassed with 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, pH 7.4) (all chemicals from Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany).

Ultra fast neuroimaging technique was used to record intracellular calcium concentrations as described previously (Vanden Berghe *et al.*, 2000). Tissue preparations were incubated for 120 min at room temperature with 30 $\mu$ M Fluo-4 AM (Invitrogen, Darmstadt, Germany) and 1.25 mM Probenecid (Sigma-Aldrich) in Krebs solution followed by a 60 min equilibration

period with superfusion of Krebs solution at 37°C. Tissue chamber was mounted onto an inverted microscope IX50 (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with appropriate filter blocks and a high-speed charge coupled device camera (CCD) with a spatial resolution of 80x80 pixels (NeuroCCD, Redshirt Imaging Decatur, GA, USA). The NeuroCCD SM system consists of a fast CCD camera and the Neuroplex 8.3 software for experiment control and data analysis. The fluorescence filterset for the Fluo-4 AM used was a FITC filterset (excitation: HC482/35, dichroic: BS506, emission: HC536/40, AHF Analysentechnik). The light source was a Luxeon LXHL-LB3C blue LED (operated at constant current 700 mA, Philips Lumileds Lighting Company, San Jose, CA, USA) and light illumination time was controlled by the Neuroplex software. Acquisitions of 10 s duration were done at 40 Hz frame rate (x40 objective, UAPO 340, NA 1.35, oil immersion, Olympus).

Electrical stimulation of interganglionic nerve strands was performed with a bipolar electrode (uncoated diameter: 51  $\mu\text{m}$ , Science Products, Hofheim, Germany). Train pulses stimulations (500  $\mu\text{A}$ , 10 Hz, 0.6 ms pulse duration) were done with a Universal Stimulus Isolator Model 501 (University of Cologne, Department of Zoology, Köln, Germany). Data were displayed as % changes of resting fluorescence ( $\Delta\text{F}/\text{F}$ ).

Immunohistochemistry was used to characterize whether responding cells were neurons or glia cells. After the neuroimaging experiments, tissues were fixed overnight in the fridge in phosphate buffered 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid, then washed (3 x 10 minutes) in phosphate buffer and incubated for 1 hour at room temperature in phosphate-buffered saline containing 0.5% Triton X-100 and 4% horse serum to block nonspecific binding. Tissues were then incubated for 16 hours overnight at room temperature with the primary antibodies sheep anti-PGP 9.5 (1:10000, PH164, The Binding Site, Birmingham, United Kingdom) and rabbit anti-S100 (1:20000, Z0311, Dako, Glostrup, Denmark). This was followed by incubation for 1.5 hours at room temperature with species specific secondary antibodies (Cy5-conjugated donkey anti-sheep, 1:500, 713-175-147 and Cy3-conjugated donkey anti-rabbit, 1:500, 711-165-152, Dianova, Hamburg, Germany). The fluorescence was detected by using an Olympus microscope (BX61 WI; Olympus, Hamburg, Germany) equipped with appropriate filter blocks, a Fview II CCD camera and software (Cell^P, Olympus) as previously described (Schemann *et al.*, 2010).

- Aubé A-C, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP & Neunlist M (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* **55**, 630–637.
- Schemann M, Hafsi N, Michel K, Kober OI, Wollmann J, Li Q, Zeller F, Langer R, Lee K & Celtek S (2010). The beta3-adrenoceptor agonist GW427353 (Solabegron) decreases excitability of human enteric neurons via release of somatostatin. *Gastroenterology* **138**, 266–274.
- Vanden Berghe P, Tack J, Coulie B, Andrioli A, Bellon E & Janssens J (2000). Synaptic transmission induces transient Ca<sup>2+</sup> concentration changes in cultured myenteric neurones. *Neurogastroenterol Motil* **12**, 117–124.
- Yamamoto T, Watabe K, Nakahara M, Ogiyama H, Kiyohara T, Tsutsui S, Tamura S, Shinomura Y & Hayashi N (2008). Disturbed gastrointestinal motility and decreased interstitial cells of Cajal in diabetic db/db mice. *J Gastroenterol Hepatol* **23**, 660–667.

## Supplementary Table 1. Characteristics of primary and secondary antibodies

### Primary Antibodies

Antigen	Host species	Dilution	Sources
Active caspase-3	Rabbit	1:2000	Sigma; C8487
ChAT	Goat	1:200	Millipore; AB144P
GDNF	Rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology; (D-20) sc-328
GFAP	Rat	1:200	Calbiochem; 345860-100UG
GFR-alpha 1	Goat	1:50	Santa Cruz Biotechnology; (C-20) sc-6157
Hu C/D (tissues)	Mouse-biotin	1:50	Invitrogen; A21272
Hu C/D (cultures of ENS)	Mouse	1:200	Invitrogen; A21275
nNOS	Rabbit	1:1000	Enzo Life Sciences; ALX-210-501
Ob-R	Goat	1:50	Santa Cruz Biotechnology; (M-18) sc-1834
PGP 9.5	Rabbit	1:10000	UltraClone Limited; RA95101
Ret	Goat	1:50	R&D Systems; AF482
Sox-10	Goat	1:500	Santa Cruz Biotechnology; (N-20) sc-1732

### Secondary Antibodies

Antibody	Dilution	Sources
Cy3-conjugated donkey Anti-goat	1:500	Jackson ImmunoResearch; 705-165-003
Cy3-conjugated donkey Anti-rabbit	1:500	Jackson ImmunoResearch; 711-165-152
Cy5-conjugated donkey Anti-rat	1:500	Jackson ImmunoResearch; 712-175-150
FluoProbes 488 donkey Anti-mouse	1:200	Interchim innovations; FP-SA4110
FluoProbes 488 donkey Anti-rabbit	1:200	Interchim innovations; FP-SA5110
Streptavidin Alexa Fluor 488	1:200	Invitrogen; s11223

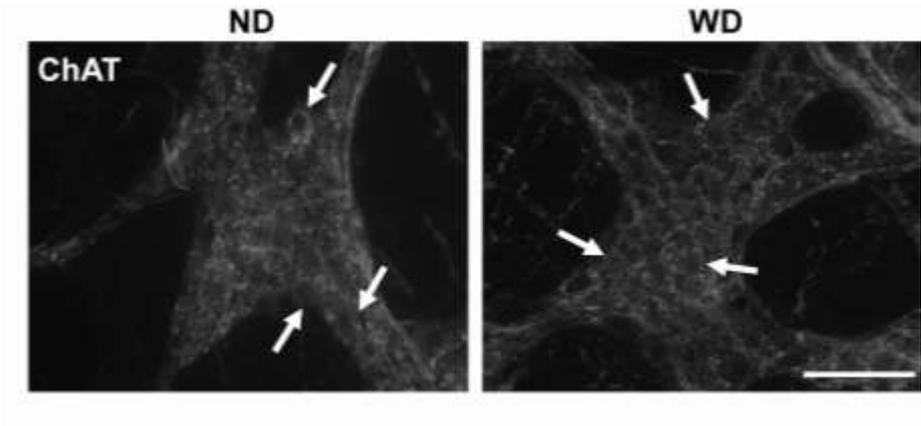
## **SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS**

**Supplementary Figure 1. ChAT-immunoreactive labeling of antral myenteric plexus in mice after 12 weeks of ND and WD.** The faint staining of ChAT-IR neurons and the network of ChAT-IR fibres overlaying the ganglia prevented the precise evaluation of the number of ChAT-IR neurons per ganglia. Scale bar=50µm.

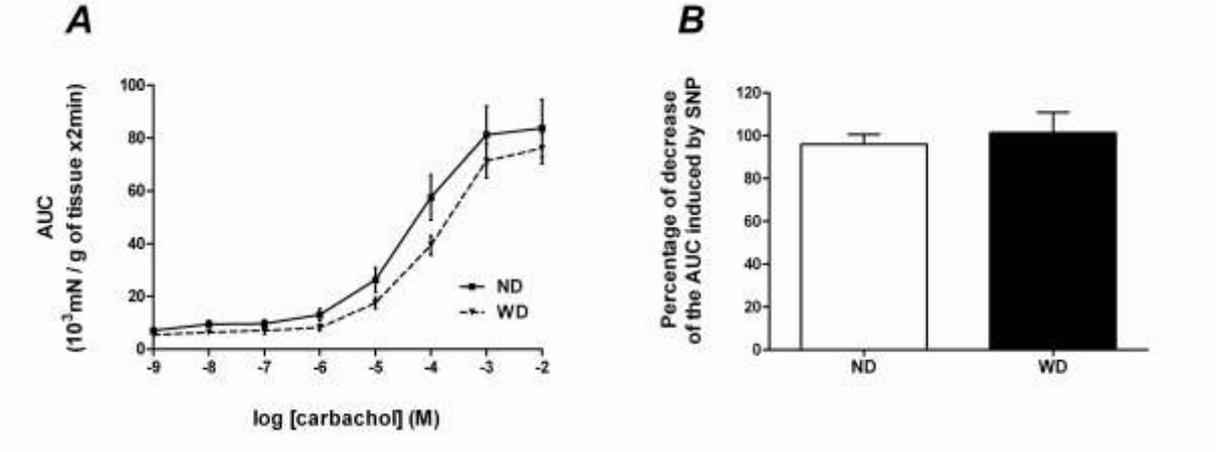
**Supplementary Figure 2. Impact of Western diet upon circular muscle response to NO donor and carbachol.** (A) Quantitative analysis of the area under the curve (AUC) of the contractile response induced by increasing concentrations of carbachol in ND and WD mice ( $n=25$ ). (B) Amplitude of the AUC induced by sodium nitroprusside (SNP) and normalized to the AUC induced by carbachol ( $10^{-2}$  M) ( $n=7-10$ ).

**Supplementary Figure 3. Immunohistochemical labeling of antral myenteric plexus with anti-GDNF, anti-GFR $\alpha$ 1, anti-Ret, anti-PGP 9.5 and anti-GFAP antibodies.** GDNF-IR and Ret-IR cells coexpressed PGP 9.5 (arrows) while GFR $\alpha$ 1-IR cells coexpressed PGP 9.5 and GFAP. Scale bar=50µm.

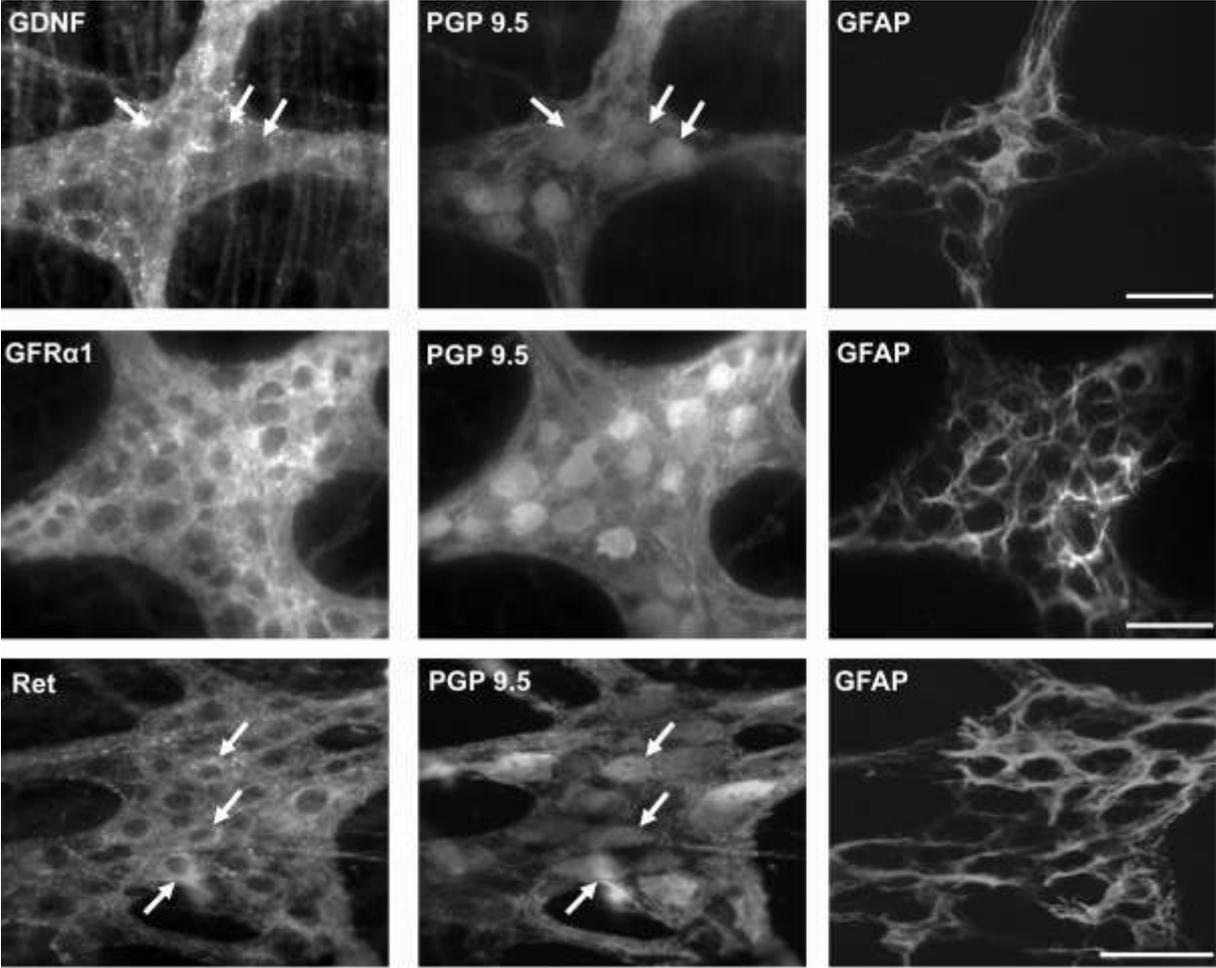
Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure 3.



## Article 2

*Le régime Western diet diminue la perméabilité  
intestinale : implication du peptide vasoactif intestinal  
et de la leptine.*

## Résumé de l'article 2

La barrière épithéliale intestinale (BEI) est située à l'interface entre l'organisme et les substances exogènes présentes dans la lumière intestinale. Elle doit assurer un double rôle en permettant le passage des nutriments tout en contrôlant l'entrée des éléments néfastes (bactéries, toxines...) (Arrieta et al., 2006). La BEI est formée d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) dont l'étanchéité et la cohésion sont assurées par des interactions entre les membranes plasmiques des CEI adjacentes et avec la lame basale sur laquelle elles reposent. Les jonctions serrées, situées au pôle apical des CEI, sont formées de protéines transmembranaires, comme les claudines et l'occludine, et de protéines cytoplasmiques comme les protéines Zonula Occludens ZO-1, -2 ou -3. Les jonctions serrées forment des pores entre les CEI dont la taille détermine la perméabilité paracellulaire.

La perméabilité paracellulaire est modulée par différents facteurs provenant du microenvironnement de la BEI, tels que des médiateurs du système immunitaire ou du système nerveux entérique (SNE). Ainsi, il a été montré que la stimulation des neurones sous-muqueux diminuait la perméabilité paracellulaire *in vitro* (Neunlist et al., 2003). Différents neuromédiateurs du SNE jouent un rôle dans la régulation des fonctions de la BEI. En particulier, le VIP (vasoactive intestinal peptide) diminue la perméabilité paracellulaire *in vivo* et *in vitro* (Hällgren et al., 1998; Neunlist et al., 2003; Boudry et al., 2011) alors que l'acétylcholine l'augmente (Cameron et Perdue, 2007). D'autre part, des études récentes suggèrent que certains facteurs luminaux d'origine nutritionnelle, tels que le glucose, les acides gras à chaîne longue (AGCL) n-3 ou les acides gras à chaîne courte comme le butyrate, interviennent également dans la régulation de la perméabilité intestinale (de Quelen et al., 2011; Turner, 2000; Kinoshita et al., 2002). De plus, il a été montré qu'outre leur effet direct sur les CEI, les facteurs nutritionnels pourraient aussi agir sur la BEI en modulant le phénotype du SNE. Ainsi, l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par les AGCL n-3 est associée à une augmentation de la proportion de neurones cholinergiques et à une diminution de la proportion de neurones VIPergiques (de Quelen et al., 2011). Cependant, les effets d'un régime WD sur les fonctions de la BEI et le rôle potentiel du SNE dans ces effets restent largement méconnus. Les objectifs de cette étude étaient donc de caractériser les effets du régime WD sur la perméabilité intestinale et de rechercher l'éventuelle implication du SNE dans ces effets.

Dans la première partie de cette étude, nous avons tout d'abord mis en évidence, *in vivo*, qu'après 12 semaines de régime WD, la perméabilité paracellulaire intestinale (aux molécules de 400 et 4000 Da) était diminuée par rapport aux souris contrôles. En revanche, la perméabilité transcellulaire était similaire entre les deux groupes d'animaux. Nous avons ensuite cherché à déterminer si le régime WD entraînait des modifications morphologiques de la muqueuse. Le régime WD tendait à entraîner une diminution de la taille des villosités mais n'affectait pas le nombre de CEI dans le jéjunum. De plus, dans le côlon, aucune modification de l'expression de molécules de stress du réticulum endoplasmique, de la BEI (E-cadhérine) ou inflammatoire n'était mesurée. Nous avons ensuite recherché si la diminution de la perméabilité paracellulaire observée *in vivo* était associée à des modifications de l'expression des protéines constituant les jonctions serrées. Ainsi, nous avons montré que l'expression de l'ARNm de la claudine-1 était significativement augmentée dans le jéjunum des souris WD par rapport aux souris ND. En revanche, l'expression des ARNm de ZO-1, ZO-2, claudine-3 et occludine était similaire entre les souris WD et les souris contrôles.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons cherché à identifier les neuromédiateurs potentiellement impliqués dans les effets du régime WD sur la perméabilité intestinale. Nous nous sommes tout d'abord intéressés au VIP, connu pour diminuer la perméabilité intestinale. Nous avons ainsi observé que la concentration en VIP était significativement augmentée dans le jéjunum des souris WD par rapport aux souris contrôles. En parallèle, la concentration en leptine était également fortement augmentée dans le jéjunum des souris WD par rapport aux contrôles. De manière intéressante, les concentrations en VIP et en leptine étaient positivement et significativement corrélées dans le jéjunum. Enfin, nous avons enfin montré, *in vitro*, que la leptine induisait une uprégulation de l'expression de l'ARNm du VIP dans le SNE.

En conclusion, cette étude démontre que la consommation d'un régime WD induit une diminution de la perméabilité intestinale, associée à la surexpression de la protéine de jonction serrée Claudine-1. Ces modifications fonctionnelles de la BEI étaient associées à une augmentation de la concentration en VIP, résultant probablement de l'augmentation de la concentration en leptine. En effet, la leptine était capable d'augmenter l'expression des transcrits du VIP dans le SNE. En conclusion, nos travaux identifient un nouvel effet

bénéfique d'un régime WD sur les fonctions digestives, caractérisé par un renforcement de la BEI. Les facteurs nutritionnels responsables de ces effets restent à identifier.

Cet article est actuellement en préparation.

# Western diet decreases intestinal permeability in mice: involvement of vasoactive intestinal peptide and leptin.

Charlotte Baudry <sup>1,2,3</sup>, Stanislas Bruley des Varannes <sup>1,2,3</sup>, Lisa Grueber <sup>4</sup>, Michael Schemann <sup>4</sup>, Raphaël Moriez <sup>1,2,3</sup> and Michel Neunlist\* <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Inserm, U913, Nantes, France.

<sup>2</sup> Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

<sup>3</sup> CHU Nantes, Hôtel Dieu, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France.

<sup>4</sup> Lehrstuhl für Humanbiologie, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany.

**Running title:** Western diet and intestinal permeability.

**Key words:** intestinal paracellular permeability, intestinal epithelial barrier, vasoactive intestinal peptide, leptin

RM and MN equally contributed to this study.

\* **Corresponding author:** Dr. NEUNLIST Michel  
UMR Inserm U913  
1, place Alexis Ricordeau – 3HNB  
44093 Nantes  
FRANCE  
Tel. +33 2 40 08 75 15  
Fax. +33 2 40 08 75 06  
E-mail: [michel.neunlist@univ-nantes.fr](mailto:michel.neunlist@univ-nantes.fr)

## ABSTRACT

The intestinal epithelial barrier (IEB) plays a dual role by allowing the passage of nutrients and preventing the passage of pathogens and toxins. Increasing evidences suggest that intestinal paracellular permeability can be modulated by nutrients through the modulation of the enteric nervous system (ENS) phenotype. However, long-term effects of nutritional imbalance such as Western diet (WD) upon ENS phenotype and IEB functions remain largely unknown. Therefore, we investigated the effects of WD on intestinal permeability and factors responsible for these effects. Mice were fed with normal diet (ND) or WD for 12 weeks. Intestinal paracellular permeability was assessed *in vivo* and *ex vivo*. IEB morphology was analyzed in the jejunum and expression of tight junction proteins was evaluated by RT-qPCR. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and leptin were quantified in the jejunum. The effects of leptin on VIP production were investigated in primary cultures of ENS. WD induced a decrease in intestinal paracellular permeability *in vivo* but did affect nor jejunal paracellular permeability *ex vivo*. In contrast, WD did not modify transcellular permeability *in vivo* and *ex vivo* as compared to ND. Claudin-1, but not occludin or ZO-1, mRNA expression was significantly increased in the jejunum of WD as compared to ND mice. WD increased VIP and leptin content in the jejunum as compared to ND. Finally, leptin increased mRNA VIP expression in the ENS. In conclusion, WD reduced paracellular permeability probably via a leptin-mediated increase in VIP. Nutritional factors responsible for these effects remain unknown but our study identifies WD as a putative new nutritional approach to enhance IEB resistance.

## INTRODUCTION

The presence of nutrients in the gut has been described to induce a variety of effects on digestive functions, especially on gastrointestinal (GI) motility (Masclee *et al.*, 1996). However, less is known about the effects of nutritional factors upon the functions of the intestinal epithelial barrier (IEB). The IEB is located at the interface between the organism and exogenous substances present within the luminal environment. It plays a dual role by allowing the passage of nutrients but preventing the passage of pathogens or toxins. The IEB consists of a continuous monolayer of intestinal epithelial cells (IEC), under constant renewal and maintained together thanks to various cell-to-cell and cell-to-matrix interactions. Tight junctions (TJ) are the most apical epithelial intercellular junctions and form a barrier that limits the paracellular diffusion of hydrophilic solutes (Cereijido *et al.*, 2000; Nusrat *et al.*, 2000). TJ proteins include transmembrane proteins, such as occludin and claudin, and cytoplasmic plaque proteins zonula occludens (ZO)-1, ZO-2, ZO-3, cingulin and 7H6 (Mitic & Anderson, 1998).

Paracellular permeability can be influenced by various physiological stimuli from the IEB microenvironment such as mediators from the immune system or the enteric nervous system (ENS) (Pácha, 2000; Keita & Söderholm, 2010). The ENS is an integrative neuronal network embedded within the GI wall and divided into two plexus: the myenteric and the submucosal plexus. Submucosal neurons innervate the mucosa and regulate absorption and secretion of fluid and electrolytes (Xue *et al.*, 2007). More recently, data have suggested that, besides controlling secretory processes, activation of enteric neurons can reduce IEC proliferation and barrier permeability (Toumi *et al.*, 2003; Neunlist *et al.*, 2003). Different neuromediators are known to regulate mucosal functions. In particular, VIP decreased paracellular permeability *in vivo* and *in vitro* (Hällgren *et al.*, 1998; Neunlist *et al.*, 2003; Boudry *et al.*, 2011). Conversely, acetylcholine (Ach) has been shown to increase intestinal paracellular permeability in rodents (Phillips *et al.*, 1987; Cameron & Perdue, 2007).

Emerging data suggest that nutritional factors can also modulate intestinal paracellular permeability. In particular, glucose and n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) have been shown to increase intestinal paracellular permeability in humans and piglets, respectively (Turner *et al.*, 2000; de Quelen *et al.*, 2011). In contrast, short chain fatty acids (SCFA), such as butyrate, decreased paracellular permeability *in vitro* (Mariadason *et al.*, 1997; Kinoshita *et*

*al.*, 2002). Besides a direct effect of nutritional factors upon IEC, increasing data suggest that their effects upon IEB could be due to a modulation of the ENS phenotype. Indeed, a recent study has shown that 1) n-3 PUFA increased the proportion of choline acetyltransferase (ChAT)-immunoreactive (IR) neurons and decreased the proportion of VIP-IR neurons in the submucosal plexus and 2) increased permeability was blocked by cholinergic antagonists (de Quelen *et al.*, 2011). Similarly, butyrate has recently been shown to induce neuroplastic changes in myenteric neurons characterized by an increase in Ach (Soret *et al.*, 2010). However, the impact of a nutritional imbalance such as Western diet (WD), high in saturated fatty acids and simple carbohydrates, on intestinal paracellular permeability and the involvement of the ENS in these effects remain largely unknown. Therefore, the purpose of this study was to investigate the impact of WD on intestinal permeability and the possible involvement of WD-induced modifications of the ENS in these effects.

## **METHODS**

### **Animals**

Experiments were performed in accordance with an experimental protocol for animal study approved by the Inserm Institutional Animal Care and Use Committee. Male C57BL/6J Rj mice aged 4 weeks (Janvier Laboratory, Le Genest-Saint-Isle, France) were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle (22°C) and had free access to food and water. As described previously (Begrache *et al.*, 2008), after 1 week of adaptation, animals were randomly assigned to receive either a normal chow [ND group, Purified diet 210, SAFE, Augy, France] or a Western diet [WD group, Purified diet 230 HF, SAFE] for 12 weeks. *db/db* mice (12 week-old, Janvier) were also used. Mice were euthanized by cervical dislocation.

### **Evaluation of intestinal permeability *in vivo***

Intestinal paracellular permeability was determined by measuring the appearance in blood of markers administered by gavage as described previously (Cani *et al.*, 2008). 400 Da Fluorescein-sulfonic acid (FS, 10 mg/mL, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) or 4 kDa Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (FD-4, 125 mg/mL, Sigma) were used. Mice were fasted for 6 h and 150 µL of phosphate-buffered saline (PBS) containing FS or FD-4 were administered by gavage. After 30 min (FS) or 1 h (FD-4), a blood sample was collected from the tip of the tail vein and centrifuged (3000 rpm at 4°C) for 20 minutes. Plasma (5 µL) was diluted in PBS (145 µL) and the concentration of fluorescein was determined using a fluorimeter (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, USA) at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 535 nm using serially diluted samples of the marker as standard. Transcellular permeability was determined by measuring the appearance in blood of 400 kDa Horseradish peroxidase (HRP, 1 mg/mL, Sigma) administered by gavage. After 3 h, a blood sample was collected and plasma concentration of HRP was determined by a kinetic enzymatic assay (Berin *et al.*, 1997). Briefly, plasma (appropriately diluted) was mixed with a reaction solution containing hydrogen peroxide and *o*-dianisidine (Sigma) and the rate of appearance of the reaction product was determined at 460 nm.

### **Evaluation of jejunal permeability *ex vivo* in Ussing chambers**

Full-thickness segments of jejunum were mounted in 2-mm diameter Ussing chambers (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA). Tissues were bathed on each side with 2

mL of Krebs solution (NaCl, 117 mM; KCl, 4.7 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM and glucose, 11 mM) continuously oxygenated and maintained at 37°C. After 30 min of equilibration, 200 µL of apical medium were replaced by 200 µL of solution containing FS (10 mg/mL). After 1 hour, the fluorescence level of a basolateral aliquot of 150 µL was determined using a fluorimeter.

### **Morphological analysis of the intestinal epithelial barrier in the jejunum**

Tubular segments of jejunum were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections were made, stained with hematoxylin and eosin and examined under a microscope. Images were acquired a digital camera (Olympus DP71) and analyzed with the Cell B software. Villi height and the number of IEC per unit of surface of middle and top of villi were evaluated.

### **Expression of tight junction protein by RT-qPCR analysis**

Total RNA was extracted from jejunal tissues using Nucleospin RNA/protein kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and cDNA was synthesized using standard procedures as previously described (Neunlist et al. 2007). Real time RT-qPCR of ZO-1, ZO-2, occludin, Claudin-1 and Claudin-3 mRNA expression were performed as previously described (Soret *et al.* 2010). The sequences of primers used are listed in Table 1. The expression level of S6 was used as a reference value to normalize gene expression.

### **Determination of VIP and leptin content in the jejunum**

Proteins were extracted from jejunal specimens as described previously (Baudry et al. 2011). VIP and leptin levels were measured using VIP EIA kit (Bachem, Torrance, CA, USA) or leptin Quantikine (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA), respectively, and normalized to protein concentration.

### **Effect of leptin on VIP production *in vitro***

Primary cultures of rat ENS were obtained as previously described (Chevalier *et al.*, 2008) and used at 12-13 days after culture. Primary cultures were incubated for 24 h with various concentrations of recombinant rat leptin (0.1, 1, 10, 100 and 1000 ng/mL, R&D Systems, Mineapolis, MN, USA). VIP levels were measured both in cultures and in supernatants using VIP EIA kit (Bachem). Real time RT-qPCR of VIP mRNA expression was performed as

previously described (Soret *et al.*, 2010). The sequences of VIP primers are listed in Table 1. The expression level of S6 was used as a reference value to normalize gene expression.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Experimental data were compared using a unpaired t-test, one-way ANOVA followed by Tukey's post test or two-way ANOVA followed by Bonferonni post test. A *P* value < 0.05 was considered to be significant.

## RESULTS

### Impact of Western diet on intestinal permeability *in vivo* and *ex vivo*

*In vivo* paracellular permeability to FS was lower (-30%,  $P=0.03$ ,  $n=6-7$ ) in WD as compared to ND after 12 weeks of diet (Figure 1A). Similarly, *in vivo* paracellular permeability to FD-4 was significantly lower (-36%,  $P=0.03$ ,  $n=7-10$ ) in WD as compared to ND mice after 12 weeks of diet (Figure 1B). In contrast, transcellular permeability to HRP was similar after 16 weeks in WD and ND mice (data not shown).

Next, we evaluated *ex vivo* jejunal permeability in Ussing chambers. Jejunal permeability to FS was similar ( $P=0.55$ ,  $n=22$ ) in both groups after 12 weeks of diet (Figure 2). Jejunal transcellular permeability to HRP was also similar in ND and WD mice after 12 weeks of diet (data not shown).

### Impact of Western diet on IEB morphology in the jejunum

We next determined whether diet could induce changes in the mucosal structure of the jejunum. Villi height tended to be smaller (-14%,  $P=0.15$ ,  $n=4$ ) in WD as compared to ND mice after 12 weeks of diet (Table 2). The number of intestinal epithelial cells was similar in both groups ( $P=0.97$ ,  $n=4$ ) (Table 2).

### Impact of Western diet on IEB integrity and inflammation

The expression of cleaved caspase-3, glucose regulated protein grp78 and of E-cadherin was similar in the colon of ND and WD mice after 12 weeks of diet (data not shown).

### Impact of Western diet on TJ proteins in the jejunum

We next determined whether changes in paracellular permeability observed *in vivo* were associated with changes in the expression of key TJ proteins. RT-qPCR analysis revealed that claudin-1 mRNA expression was significantly increased (+155%,  $P=0.01$ ,  $n=4-5$ ) in the jejunum of WD as compared to ND mice after 12 weeks of diet (Figure 3). In contrast, WD had no significant effect mRNA expression of claudin-3 ( $P=0.24$ ,  $n=5$ ), ZO-1 ( $P=0.86$ ,  $n=5$ ), ZO-2 ( $P=0.44$ ,  $n=2-3$ ) and occludin ( $P=0.10$ ,  $n=5$ ) (Figure 3).

### **Impact of Western diet on VIP content in the jejunum**

Among mediators known to be involved in reduction in intestinal paracellular permeability is VIP (Hällgren *et al.*, 1998; Neunlist *et al.*, 2003; Boudry *et al.*, 2011). We therefore quantified VIP levels in the jejunum. VIP content was significantly increased (+36%,  $P=0.05$ ,  $n=21$ ) in WD as compared to ND mice after 12 weeks of diet (Figure 4A). In parallel to changes in VIP content, we observed that 12 weeks of WD also induced an increase (+1060%,  $P=0.0008$ ,  $n=27$ ) in leptin content in the jejunum (Figure 4B). Interestingly, VIP and leptin content were positively correlated in the jejunum ( $R=0.64$ ,  $P=0.008$ ,  $n=20$ ).

### **Impact of leptin on VIP production *in vitro***

We finally aimed at determining whether leptin could be involved in the increase in VIP observed in the jejunum of WD mice. In primary cultures of ENS, leptin (10 and 100 ng/mL) significantly increased ( $P=0.04$ ,  $n=10$  and  $P=0.04$ ,  $n=10$ , respectively) VIP mRNA expression (Figure 5A). However, leptin did not modify VIP content in cultures ( $P=0.35$ ,  $n=7-10$ ) or in supernatants ( $P=0.24$ ,  $n=13-20$ ) (Figure 5B and C).

## DISCUSSION

This study demonstrated that WD induced a decrease in intestinal paracellular permeability *in vivo* after 12 weeks of diet. This decrease in intestinal permeability was associated with an increased expression of TJ protein claudin-1 in the jejunum, without any change in IEB morphology and integrity. WD also induced an increase in VIP and leptin content in the jejunum as compared to ND. Finally, we demonstrated that leptin increased VIP expression in the ENS.

An important finding of our study was that WD reduced *in vivo* intestinal paracellular permeability as compared to ND but did not modify jejunal paracellular permeability measured *ex vivo*. This absence of change in jejunal paracellular permeability at 12 weeks of diet could be due to a lack of sensitivity of Ussing chambers to measure small differences. This is consistent with the observation that jejunal permeability to FS was decreased after 36 weeks of WD when *in vivo* intestinal permeability was more pronounced (-64%) than after 12 weeks (-30%) of WD (data not shown). We also observed that transcellular permeability measured both *in vivo* and *ex vivo* in the jejunum was similar in WD and ND mice. Although no data exist on the impact of WD on intestinal permeability, some studies have reported permeability changes after high fat diet (HFD). First, it has been shown that 4 weeks of HFD induced a strong increase in intestinal paracellular permeability to FD-4 in mice (Cani *et al.*, 2008). Another study showed that 10 weeks of HFD significantly increased intestinal permeability to FD-4 in rats (de La Serre *et al.*, 2010). Finally, it has also been demonstrated that HFD for 16 weeks increased intestinal permeability to phenolsulfonphthalein and Cr-EDTA both in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty and Long-Evans Tokushima Otsuka rats (Suzuki & Hara, 2010). This discrepancy with our results could be due to differences in diet composition, especially concerning carbohydrates, or in methods used to measure intestinal permeability. Indeed, our diet was high in simple carbohydrates whereas the diet used by Cani *et al.* (2008) was carbohydrate-free and the ones used by de La Serre *et al.* (2010) and Suzuki *et al.* (2011) contained complex carbohydrates. These differences in diet composition might have induced different changes in gut microbiota, supposed to be involved in the increase of intestinal permeability observed in these studies (Cani *et al.*, 2008; de La Serre *et al.*, 2010). Moreover, we did not observe any sign of inflammation or altered integrity of the IEB in the jejunum and colon of WD as compared to ND mice. In contrast, de La Serre *et al.* (2011)

observed that obese-prone rats exhibited ileal inflammation, potentially involved in the increase in intestinal permeability. Finally, in these three studies, the volume of FD-4 solution administered by gavage was adapted to mice weight whereas we administered a fixed volume. However, we also observed a decrease in intestinal permeability to FS if the volume administered by gavage was adapted to mice weight in WD as compared to ND.

Another important finding of this study was that WD induced an increase in the mRNA expression of the key TJ protein claudin-1 in the jejunum without affecting claudin-3, ZO-1, ZO-2 and occludin. Upregulation of Claudin-1 expression in the jejunum could be responsible for the decrease in intestinal permeability observed in our study during WD. Indeed, claudins have been shown to directly regulate the paracellular barrier function. For example, IL-17-induced increase in Caco-2 monolayer resistance was associated with an upregulation of claudin-1 and -2 *in vitro* (Kinugasa *et al.*, 2000).

In the second part of this study, we aimed at identifying mediators potentially involved in the WD-induced decrease in intestinal permeability. We first observed that VIP content was significantly increased in the jejunum of WD as compared to ND mice. VIP could be indeed responsible for the WD-induced effects on intestinal permeability since it has been widely described to decrease intestinal paracellular permeability (Hällgren *et al.*, 1998; Neunlist *et al.*, 2003; Boudry *et al.*, 2011). In addition, VIP can regulate TJ proteins such as ZO-1 (Neunlist *et al.*, 2003). However, the effects of VIP on claudin-1 expression remain unknown and require further investigations. Mechanisms responsible for the increase in jejunal VIP content are not fully understood. However, WD has already been shown to induce neuroplastic changes in the ENS, resulting in an increased number of myenteric nitrergic neurons in the antrum, by a mechanism likely involving leptin (Baudry *et al.*, 2011). In this study, we demonstrated that WD-induced effects on VIP content could be mediated in part by leptin. We first showed that WD increased leptin content in the jejunum after 12 weeks of diet. Next, we demonstrated that leptin increased VIP mRNA expression in the ENS in primary cultures of ENS. However, VIP protein content in cultures and supernatants were not modified in the presence of leptin as compared to controls. This could be due to the fact that leptin-induced VIP mRNA upregulation was observed after 24h of treatment and VIP protein content was also measured at the same time. Therefore, measuring VIP protein in the ENS after longer period of leptin treatment would allow detecting changes in protein expression. Although a role for leptin in the regulation of VIP production in the ENS has never been

described before, leptin was shown to increase VIP expression in a murine cholinergic neuronal cell line (Di Marco *et al.*, 2000). Mechanisms involved in the regulation of VIP expression by leptin remain unknown but could involve the signal transducers and activators of transcription (STAT) transcription factor family as 1) activation of STAT contributes to the induction of the VIP gene by the ciliary neurotrophic factor family of cytokines in a neuroblastoma cell line (Symes *et al.*, 1994) and 2) leptin increased STAT3 phosphorylation in neurons of nodose ganglia (de Lartigue *et al.*, 2011).

In conclusion, our study demonstrated that WD induced a decrease in intestinal permeability by a mechanism associated with an increased expression of claudin-1 in the jejunum. These functional changes were associated with an increase in VIP content in the jejunum likely involving leptin. These protective effects of WD on the IEB are consistent with a previous study showing neuroprotective effects of WD on myenteric neurons in the antrum (Baudry *et al.*, 2011). Nutritional intervention taking advantage of the WD-beneficial factors (such as VIP and leptin) could be used as new therapeutic approach in the treatment of IEB dysfunctions.

## REFERENCES

- Begrache K, Lettéron P, Abbey-Toby A, Vadrot N, Robin M-A, Bado A, Pessayre D & Fromenty B (2008). Partial leptin deficiency favors diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E939–E951.
- Berin MC, Kiliaan AJ, Yang PC, Groot JA, Taminiou JA & Perdue MH (1997). Rapid transepithelial antigen transport in rat jejunum: impact of sensitization and the hypersensitivity reaction. *Gastroenterology* **113**, 856–864.
- Boudry G, Morise A, Seve B & LE Huërou-Luron I (2011). Effect of milk formula protein content on intestinal barrier function in a porcine model of LBW neonates. *Pediatr Res* **69**, 4–9.
- Cameron HL & Perdue MH (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* **19**, 47–56.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM & Burcelin R (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* **57**, 1470–1481.
- Cereijido M, Shoshani L & Contreras RG (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G477–G482.
- Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P & Neunlist M (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol (Lond)* **586**, 1963–1975.
- Hällgren A, Flemström G & Nylander O (1998). Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am J Physiol* **275**, G95–G103.
- Keita AV & Söderholm JD (2010). The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 718–733.
- Kinoshita M, Suzuki Y & Saito Y (2002). Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPAR[gamma] activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **293**, 827–831.
- Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X & Reinecker H (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* **118**, 1001–1011.
- de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC & Raybould HE (2010). Propensity to High-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**, G440–G448.
- de Lartigue G, Barbier de la Serre C, Espero E, Lee J & Raybould HE (2011). Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E187–E195.
- Di Marco A, Demartis A, Gloaguen I, Lazzaro D, Delmastro P, Ciliberto G & Laufer R (2000). Leptin receptor-mediated regulation of cholinergic neurotransmitter phenotype

- in cells of central nervous system origin. *European Journal of Biochemistry* **267**, 2939–2944.
- Mariadason JM, Barkla DH & Gibson PR (1997). Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **272**, G705–G712.
- Masclee AA, Gielkens HA, Lam WF, de Boer SY & Lamers CB (1996). Effects of parenteral nutrients on gastrointestinal motility and secretion. *Scand J Gastroenterol Suppl* **218**, 50–55.
- Mitic LL & Anderson JM (1998). Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* **60**, 121–142.
- Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, Galmiche J-P & Jarry A (2003). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G1028–G1036.
- Nusrat A, Turner JR & Madara JL (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G851–G857.
- Pácha J (2000). Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev* **80**, 1633–1667.
- Phillips TE, Phillips TL & Neutra MR (1987). Macromolecules can pass through occluding junctions of rat ileal epithelium during cholinergic stimulation. *Cell Tissue Res* **247**, 547–554.
- de Quelen F, Chevalier J, Rolli-Derkinderen M, Mourot J, Neunlist M & Boudry G (2011). N-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the post-natal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *J Physiol*; DOI: 10.1113/jphysiol.2011.214056.
- Soret R, Chevalier J, De Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, Segain JP & Neunlist M (2010). Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats. *Gastroenterology* **138**, 1772–1782.e4.
- Suzuki T & Hara H (2010). Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond)* **7**, 19.
- Symes A, Lewis S, Corpus L, Rajan P, Hyman SE & Fink JS (1994). STAT proteins participate in the regulation of the vasoactive intestinal peptide gene by the ciliary neurotrophic factor family of cytokines. *Molecular Endocrinology* **8**, 1750–1763.
- Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisse CL, Galmiche J-P & Jarry A (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* **15**, 239–242.
- Turner JR, Cohen DE, Mrsny RJ & Madara JL (2000). Noninvasive in vivo analysis of human small intestinal paracellular absorption: regulation by Na<sup>+</sup>-glucose cotransport. *Dig Dis Sci* **45**, 2122–2126.

Xue J, Askwith C, Javed NH & Cooke HJ (2007). Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface. *Auton Neurosci* **133**, 55–63.

## TABLES

**Table 1. Characteristics of primers used**

<b>Gene</b>	<b>Accession n°</b>	<b>Forward primer 5'-3'</b>	<b>Reverse primer 5'-3'</b>
<b>mS6 rS6</b>	<i>NM_009096</i> <i>NM_017160</i>	CCAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC	CCCTCGAGTCCTTCATTCTCTTGGC
<b>mZO-1</b>	<i>v1:NM_009386</i> <i>v2:NM_001163574</i>	AAGAATATGGTCTTCGATTGGC	ATTTTCTGTACAGTACCATTTATCTTC
<b>mZO-2</b>	<i>v1:NM_001198985.1</i> <i>v2:NM_011597.4</i>	CTAGACCCCCAGAGCCCCAGAAAA	TCGAGGAGTCCACGCATACAAG
<b>mOCL</b>	<i>NM_008756</i>	GGTAAAAAATGTGTCTGCAGGCAC	GAGGCTGCCTGAAGTCATCCAC
<b>mClaudin-1</b>	<i>NM_008756</i>	TCGCAAAGCACCGGGCAG	GATCAGCCCCAGCAGGATGC
<b>mClaudin-3</b>	<i>NM_009902.4</i>	GCCCCAGGAGAGGAGCCGTAA	GCCGATGAAGGCCGAAACGC
<b>rVIP</b>	<i>NM_053991.1</i>	GCAAACGAATCAGCAGTAG	ATTTGCTTTCTAAGGCGGGTGTA

**Table 2. Evaluation of villi height and number of intestinal epithelial cells in the jejunum of normal diet (ND) and Western diet (WD) mice.**

	<b>ND</b>	<b>WD</b>
Villi height ( $\mu\text{m}$ )	256.1 $\pm$ 16.3	220.4 $\pm$ 14.1
Number of intestinal epithelial cells / nm of villi	182.3 $\pm$ 5.4	182.6 $\pm$ 7.9

## FIGURES LEGENDS

### **Figure 1. Effects of Western diet on *in vivo* paracellular permeability.**

(A) Plasma concentration of 400 Da Fluorescein-sulfonic acid (FS) 30 minutes after gavage in mice after 12 weeks of normal diet (ND) or Western diet (WD). (\*  $P < 0.05$ , unpaired t-test). (B) Plasma concentration of 4 kDa Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (FD-4) 1 hour after gavage in mice after 12 weeks of ND or WD. (\*  $P < 0.05$ , unpaired t-test).

### **Figure 2. Effects of Western diet on *ex vivo* paracellular permeability.**

Basal jejunal permeability to Fluorescein-sulfonic acid (FS) measured in Ussing chambers after 12 weeks of normal diet (ND) or Western diet (WD). (\*  $P < 0.05$ , unpaired t-test).

### **Figure 3. Effects of Western diet on the expression of tight junction proteins in the jejunum.**

Relative mRNA expression of Claudin-1, Claudin-3, ZO-1, ZO-2 and occludin (OCL) normalized to ND in the jejunum of mice after 12 weeks of normal diet (ND) or Western diet (WD). (Data are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P < 0.05$ , unpaired t-test).

### **Figure 4. Effects of Western diet on VIP and leptin content in the jejunum.**

(A) Vasoactive intestinal peptide (VIP) concentration in the jejunum of mice after 12 weeks of normal diet (ND) or Western diet (WD), in percentage of ND (ND: 1029 $\pm$ 102.6 vs. WD: 1404 $\pm$ 155.0 ng/ $\mu$ g of protein). (Data are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P < 0.05$ , unpaired t-test). (B) Leptin concentration in the jejunum of mice after 12 weeks of ND or WD, in percentage of ND (ND: 0.026 $\pm$ 0.006 vs. WD: 0.228 $\pm$ 0.048 pg/ $\mu$ g of protein). (Data are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P < 0.05$ , unpaired t-test).

### **Figure 5. Effects of leptin on VIP production in primary culture of ENS.**

(A) Relative mRNA expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) in primary cultures of ENS treated with different doses of leptin for 24 hours, normalized to controls. (Data are expressed as means $\pm$ S.E.M. \*  $P < 0.05$ , unpaired t-test). (B) VIP concentration in primary cultures of ENS treated with different doses of leptin for 24 hours, normalized to controls (Control: 4.0 $\pm$ 0.3 pg/ $\mu$ g of protein). (Data are expressed as means $\pm$ S.E.M.). (C) VIP concentrations in supernatants of primary cultures of ENS treated with different doses of

leptin for 24 hours, normalized to controls (Control:  $76 \pm 5.9$  pg/ $\mu$ g of protein). (Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M.).

# FIGURES

Figure 1.

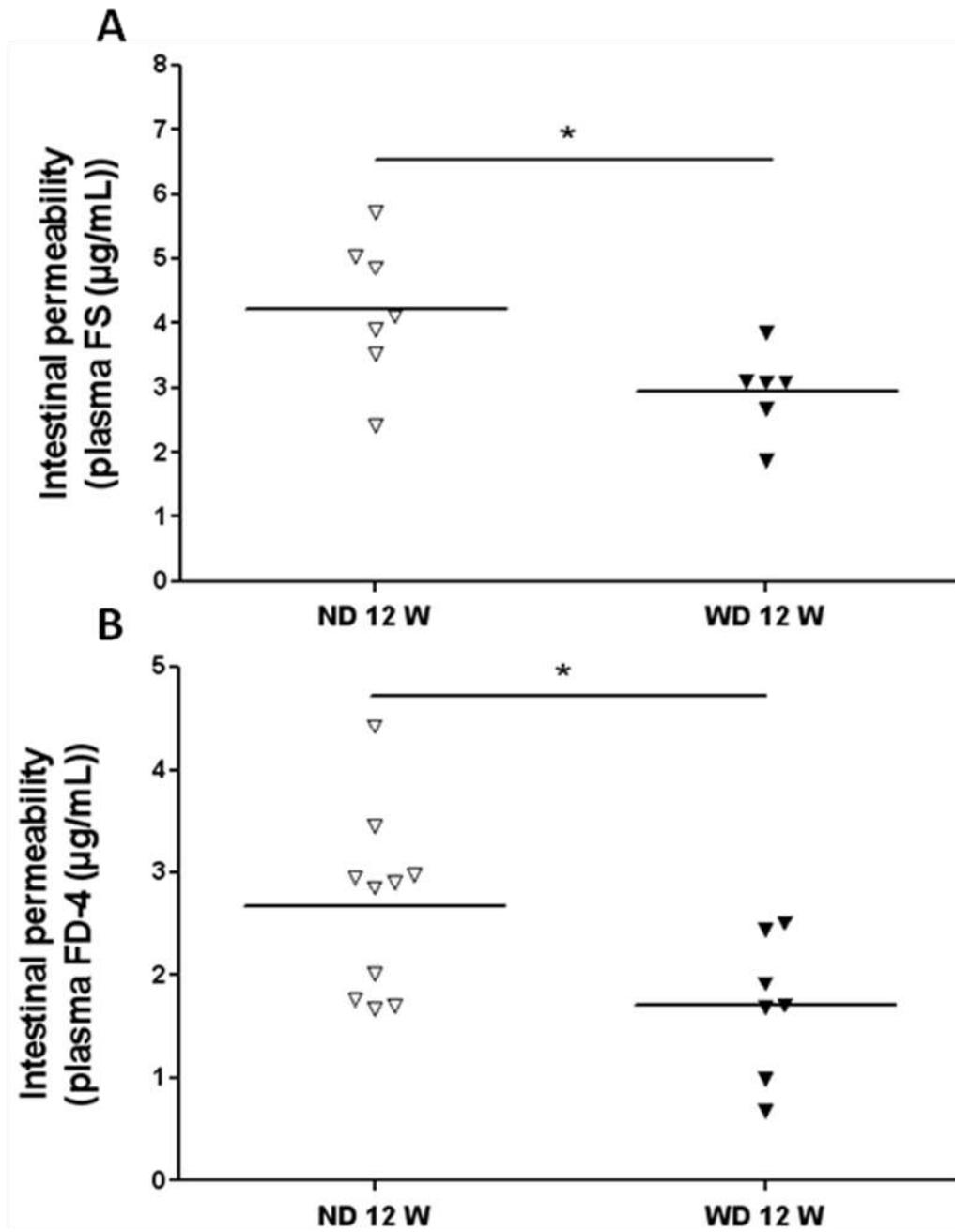


Figure 2.

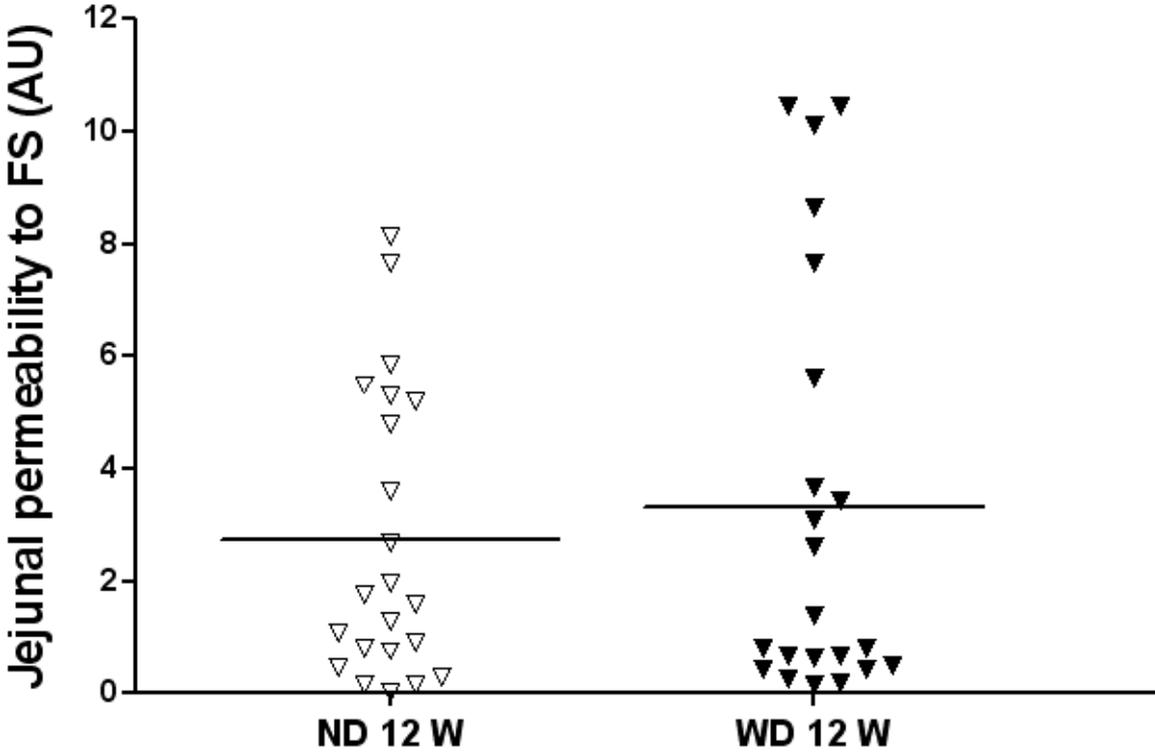


Figure 3.

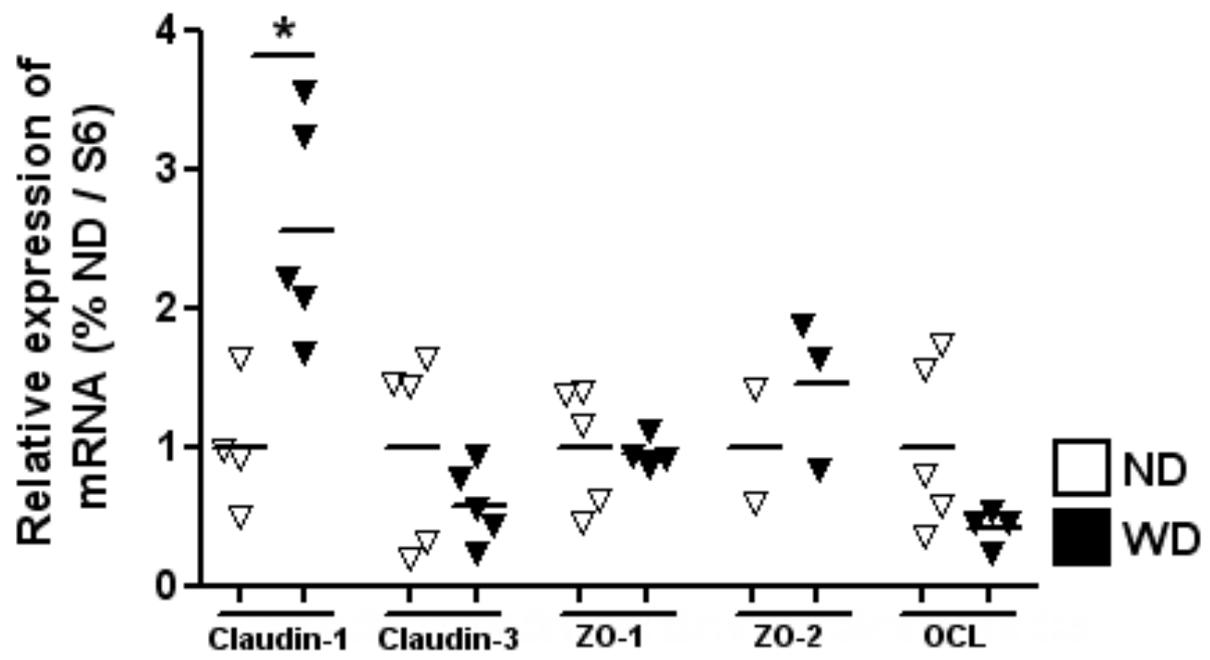


Figure 4.

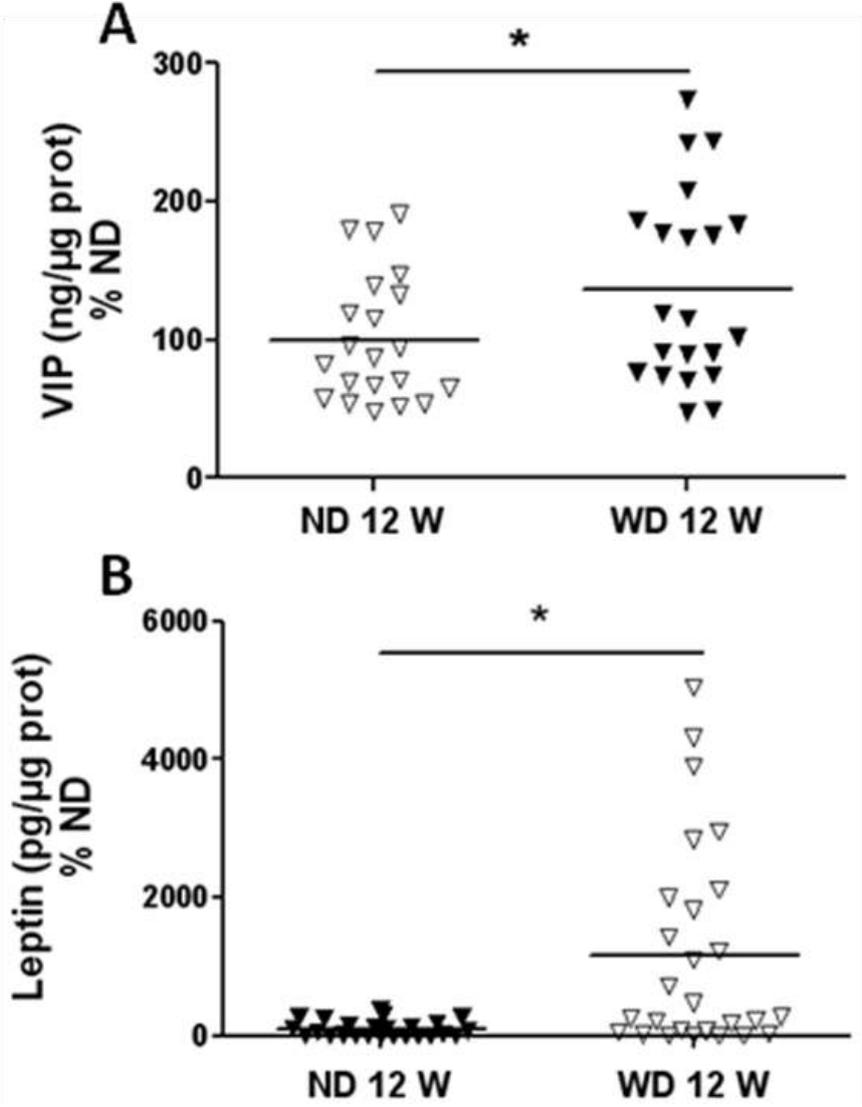
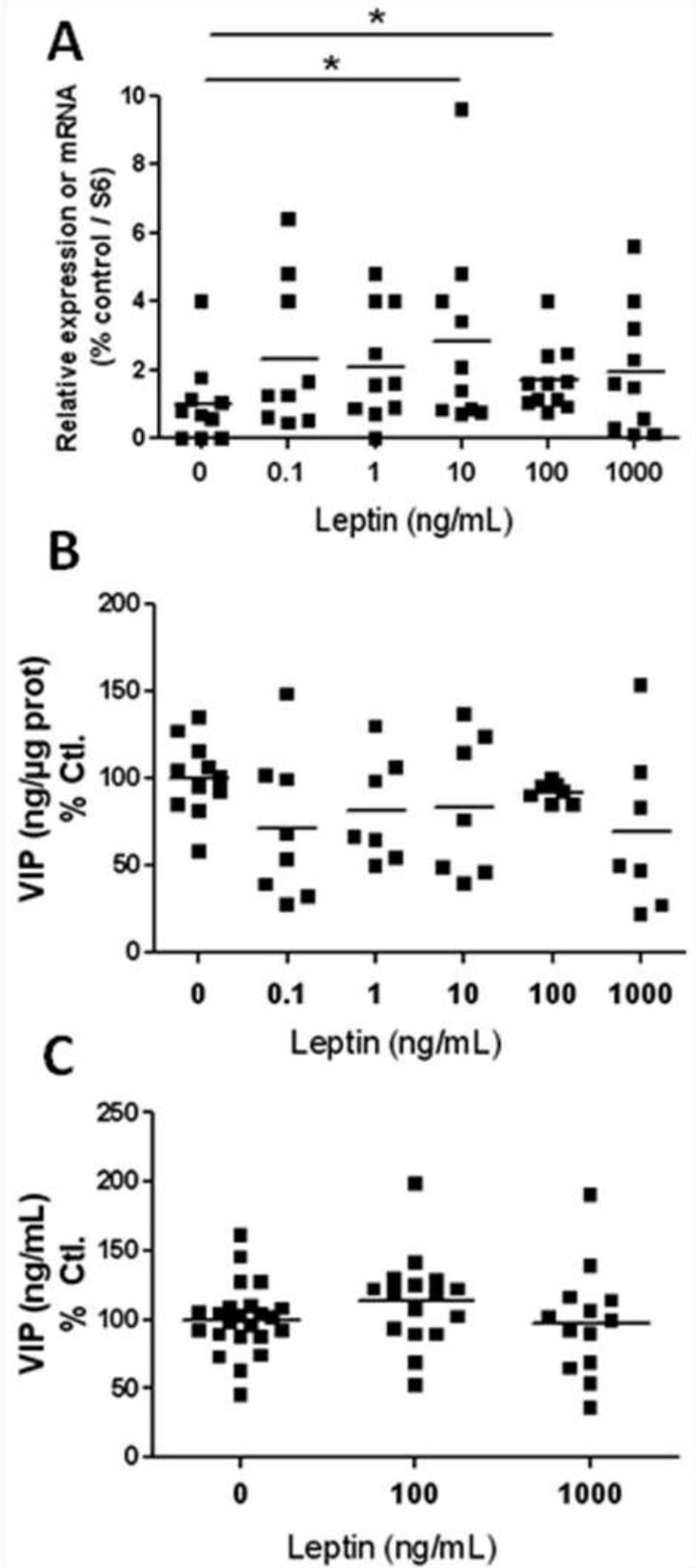


Figure 5.



# Discussion générale

---

Ces travaux de thèse, combinant des approches expérimentales *in vivo* et *in vitro*, ont permis de caractériser, chez la souris, l'impact d'un régime Western diet (WD) sur les fonctions motrices de la partie haute du tractus gastro-intestinal (GI) et sur les fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI). Ils identifient le système nerveux entérique (SNE) comme un acteur directement impliqué dans les modifications fonctionnelles induites par le régime WD. De plus, nos résultats placent la leptine comme un médiateur central dans cette modulation nutritionnelle du SNE et des fonctions GI.

## **Les modifications des fonctions GI induites par un régime WD chronique.**

Nos travaux ont permis de mettre en évidence que la consommation d'un régime WD pendant 12 semaines entraînait une accélération de la vidange gastrique. En revanche, le transit intestinal et les fonctions motrices de l'intestin grêle n'étaient pas modifiés par ce régime. De plus, dans une étude en cours, nous avons montré une accélération du transit colique distal induite par le régime WD.

Chez l'animal, des travaux antérieurs ont montré que les réponses GI normalement induites par les lipides étaient atténuées après la consommation chronique d'un régime High-fat, conduisant à une accélération de la vidange gastrique (Covasa et Ritter, 2000). De plus, une accélération de la vidange gastrique a été mise en évidence chez l'homme, suite à la consommation chronique d'un régime High-fat (Cunningham et al., 1991; Castiglione et al., 2002). D'autre part, chez les patients obèses, la majorité des études décrit une accélération de la vidange gastrique d'un repas solide, par rapport aux patients contrôles (Wright et al., 1983; Tosetti et al., 1996; Cardoso-Júnior et al., 2007), bien que quelques études montrent que la vidange gastrique est similaire (Zahorska-Markiewicz et al., 1986; Chiloiro et al., 1999), voire diminuée (Horowitz et al., 1986). La progression de la vidange gastrique est corrélée positivement à l'apparition de la sensation de faim, probablement du fait de la diminution de la distension gastrique induite par les aliments (Sepple et Read, 1989). En effet, il a été

montré que la distension de l'estomac diminuait la prise alimentaire (Geliebter, 1988). Par conséquent, en entraînant une accélération de la vidange gastrique, le régime WD pourrait provoquer une disparition plus rapide des signaux de satiété et une augmentation de la prise alimentaire, susceptibles de participer au développement de l'obésité.

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'impact de la consommation d'un régime WD sur les fonctions de barrière intestinale. Nous avons mis en évidence que la consommation d'un régime WD induisait une diminution de la perméabilité paracellulaire, associée à une augmentation de l'expression d'une protéine clé des jonctions serrées, la claudine-1, dans le jéjunum. En revanche, nous n'avons pas observé de modification de la morphologie ou de l'intégrité de la BEI.

Jusqu'à présent, l'impact d'un régime hyperlipidique sur la perméabilité intestinale a été peu étudié. Néanmoins, en contraste avec nos résultats, plusieurs études décrivent une augmentation de la perméabilité paracellulaire, suite à la consommation d'un régime High-fat chez le rat et la souris, associée à une expression diminuée de certaines protéines de jonction serrée (Cani et al., 2008; Suzuki et Hara, 2010; de La Serre et al., 2010). Seule une étude a montré qu'un régime High-fat pouvait induire une diminution de la perméabilité paracellulaire colique chez le rat (Mullin et al., 2002). Les différences observées entre ces résultats restent à expliquer mais pourraient résulter, par exemple, de différences de composition entre les régimes utilisés (sans glucides ou contenant des glucides complexes, par opposition à notre régime ne contenant que des glucides simples). Outre les effets directs des nutriments, le régime WD pourrait aussi induire des modifications de la flore intestinale différentes de celles observées lors des régimes High-fat par Cani et al. (2008) et de la Serre et al. (2010). D'autre part, l'âge des animaux utilisés dans chaque étude pourrait jouer un rôle dans les différences de perméabilité observées (souris âgées de 12 semaines dans l'étude de Cani et al. (2008) contre 4 semaines dans notre étude). Enfin, de la Serre et al. (2010) ont observé une altération de l'intégrité de la BEI, associée à une inflammation au niveau de l'iléon, qui pourrait être à l'origine de l'augmentation de la perméabilité observée suite au régime High-fat. En revanche, d'autres études montrent que l'administration entérale d'une solution High-fat peut, au contraire, réduire la réponse inflammatoire intestinale et l'augmentation de perméabilité paracellulaire induites dans un modèle de choc hémorragique ou d'iléus post-opératoire (Luyer et al., 2004; Lubbers et al., 2009). En accord avec ces

derniers résultats, nous n'avons observé aucune altération de la BEI ou inflammation intestinale dans notre modèle. Enfin, chez l'homme, aucune altération des fonctions de la barrière intestinale ou colique n'a été constatée chez les patients obèses, comparés aux patients contrôles (Brignardello et al., 2010).

Les modifications des fonctions digestives observées dans notre modèle murin de WD se rapprochent fortement des modifications observées chez les patients obèses et il pourrait constituer un bon modèle d'étude pour caractériser les mécanismes physiopathologiques intervenant dans l'obésité. D'autre part, nos travaux renforcent la nécessité de mieux identifier les constituants nutritionnels responsables (seuls ou en combinaison) des effets observés sur les fonctions digestives, ainsi que les mécanismes et médiateurs impliqués.

## **Le système nerveux entérique : un acteur impliqué dans les effets d'un régime WD chronique sur les fonctions GI.**

Nos travaux ont permis de renforcer le concept émergent soulignant à la fois l'influence de l'âge et des facteurs nutritionnels sur la plasticité du SNE et de ses fonctions. Parmi les principaux résultats de notre étude, figurent les modifications du phénotype du SNE au cours du temps. En effet, nous avons montré une perte de neurones myentériques, en particulier de phénotype nitreurgique, au cours du temps, dans l'antré mais pas dans le jéjunum. Ces résultats suggèrent l'existence d'un gradient rostro-caudal de vieillissement, par analogie avec celui existant au cours du développement lors de la colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale. Même si peu de données existent sur l'évolution du phénotype du SNE dans l'estomac au cours de la vie, une perte neuronale a été décrite dans l'antré pendant la première année de vie chez la souris (El-Salhy et al., 1999). De plus, il a été montré que le vieillissement affectait aussi d'autres parties du tube digestif, que ce soit l'intestin grêle ou le côlon (Camilleri et al., 2008). Les facteurs responsables du « vieillissement » du SNE restent à identifier. Il pourrait être dû à la fois à une augmentation du stress oxydant et/ou à une perte de propriétés antioxydantes du SNE au cours du temps. De manière intéressante, la restriction calorique prévient cette perte neuronale, probablement en induisant la production de facteurs neurotrophiques, tels que le GDNF et la neurotrophine-3,

protégeant les neurones du stress oxydant (Cowen et al., 2000; Thrasivoulou et al., 2006). Nos travaux montrent qu'un régime hypercalorique WD peut, lui aussi, induire la production du facteur neurotrophique GDNF, et ce, de manière site spécifique, dans l'antré mais pas dans le jéjunum. Parmi les autres hypothèses permettant d'expliquer la perte des neurones entériques liée à l'âge, figure la perte potentielle des capacités neurogéniques du SNE au cours du temps. En effet, différentes études montrent que le SNE adulte possède des cellules progénitrices, *i.e.* les cellules gliales entériques (CGE), qui sont capables de proliférer et de se différencier, assurant une source potentielle de neurones (Laranjeira et al., 2011). L'augmentation du nombre de CGE observée dans l'antré, mais pas dans le jéjunum, pourrait donc être impliquée dans l'augmentation du nombre de neurones induite par le régime WD. Bien que les effets d'un régime hyperlipidique sur les CGE n'aient jamais été décrits auparavant, plusieurs études ont montré qu'un régime High-fat induisait une augmentation de l'expression de la GFAP (Glial fibrillary acid protein) et du nombre d'astrocytes exprimant les récepteurs à la leptine dans le système nerveux central (Hsueh et al., 2009; Horvath et al., 2010).

L'évolution du SNE au cours de la vie a été largement ignorée dans les précédentes études de l'impact des facteurs environnementaux, d'origine endogène ou exogène, sur le phénotype du SNE. Au vu des différences de phénotype observées au cours du temps dans notre étude, il semble important de prendre en compte un tel facteur à l'avenir. En particulier, des modifications du SNE, caractérisées par une augmentation de la densité des fibres nerveuses, ont été décrites dans un modèle d'IBS (Irritable Bowel Syndrome) induit par une séparation maternelle (Barreau et al., 2008) ou chez des patients IBS (Wang et al., 2004; Barreau et al., 2008). Les auteurs ont souvent conclu à une augmentation du nombre de neurones ou à un phénomène de pousse neuritique induits par la pathologie. Au vu de notre étude, ces modifications pourraient refléter un ralentissement des processus naturels de vieillissement, induit par la pathologie par rapport aux témoins. De plus, dans notre modèle, les conséquences du nombre de neurones plus élevé, observé chez les animaux WD, sur la sensibilité viscérale restent à déterminer.

D'autre part, nos travaux ont permis de confirmer que les facteurs luminaux, en particulier nutritionnels, pouvaient profondément impacter sur le phénotype du SNE. A ce jour, la majorité des études a porté sur l'impact à court terme de facteurs nutritionnels, tels que le butyrate, l'oléate et le glucose, sur les neurones entériques (Neunlist et al., 1999;

Sayegh et al., 2004; Hamodeh et al., 2004). Une des originalités de notre étude a été de démontrer que la consommation chronique d'un régime WD pouvait induire une plasticité du phénotype du SNE, capable de conduire à des modifications importantes des fonctions digestives. En particulier, nous avons mis en évidence que la prévention de la perte des neurones myentériques nitreergiques, induite par le régime WD dans l'antre, était en partie responsable d'une accélération de la vidange gastrique. D'autre part, nous avons observé que le régime WD entraînait une augmentation de la concentration en VIP dans le jéjunum, probablement impliquée dans la diminution de la perméabilité paracellulaire observée chez les souris WD. Une étude récente a montré qu'un régime butyrogène entraînait une augmentation de la proportion des neurones cholinergiques dans le côlon de rat (Soret et al., 2010). D'autre part, il a été mis en évidence qu'un régime maternel supplémenté en acides gras polyinsaturés n-3 pouvait conduire à une augmentation de la proportion des neurones cholinergiques et à une diminution de la proportion de neurones VIPergiques dans le jéjunum chez le porcelet (de Quelen et al., 2011). La nature des facteurs nutritionnels impliqués dans les effets du régime WD sur le phénotype du SNE, ainsi que leurs mécanismes d'action restent à déterminer. Les nutriments impliqués pourraient exercer leurs effets sur le SNE et les fonctions digestives par une action directe ou par une action indirecte, en induisant la production de médiateurs par les constituants du tube digestif. Le régime WD semble ainsi agir de manière différentielle le long du tractus GI et réguler de manière région-spécifique la production de ces médiateurs. Ainsi, nous avons mis en évidence que le régime WD induisait une augmentation des concentrations en GDNF dans l'antre mais pas dans le jéjunum. De même, nous avons observé une augmentation de la concentration en VIP dans le jéjunum, mais pas dans le côlon, des souris WD par rapport aux souris contrôles. Ainsi, nos travaux renforcent le concept d'une modulation différentielle du phénotype du SNE, et par conséquent des fonctions digestives, spécifique à chaque facteur nutritionnel et à chaque région du tube digestif.

Enfin, parmi les mécanismes régulant l'expression de nombreux gènes, figurent les modifications épigénétiques. Des travaux récents ont montré que le butyrate pouvait modifier le phénotype du SNE, et notamment augmenter la proportion de neurones cholinergiques dans le côlon, en inhibant les histones désacétylases (HDAC), ce qui conduit à une augmentation de l'acétylation des histones H3Lys9 dans les neurones (Soret et al., 2010). En particulier, la période péri- ou post-natale, au cours de laquelle les processus de développement sont fortement sous le contrôle de mécanismes épigénétiques, reste une période particulièrement

sensible à la présence de facteurs environnementaux. Dans ce contexte, le rôle des modifications épigénétiques dans les modifications du phénotype du SNE induites par le régime WD dans notre modèle de souris jeunes (âgées de 4 semaines) reste à identifier.

L'ensemble de ces résultats a permis de montrer, pour la première fois, que le régime WD induisait des modifications du SNE, en partie responsables de modifications des fonctions motrices et des fonctions de barrière. Les mécanismes impliqués dans les effets du régime WD sur le SNE restent à identifier mais pourraient faire intervenir la leptine.

### **La leptine : un médiateur central impliqué dans les effets du régime WD sur la plasticité du système nerveux entérique.**

Nos résultats suggèrent que le régime WD entraîne une augmentation des concentrations en leptine dans le plasma mais également dans l'antré et le jéjunum. Ces résultats complètent et étendent les données d'autres études décrivant une augmentation de la concentration en leptine plasmatique suite à la consommation d'un régime High-fat (Lin et al., 2000) ou WD (Frederich et al., 1995). De plus, bien que la source principale de la leptine soit le tissu adipeux, elle est également produite par l'épithélium fundique (Bado et al., 1998). Cependant, la contribution de la leptine gastrique à l'augmentation de la leptinémie est inconnue. De plus, la source cellulaire à l'origine de l'augmentation de la concentration en leptine dans l'antré et le jéjunum, observée dans notre étude, reste à identifier. L'impact d'un régime hyperlipidique sur la production de leptine gastrique n'avait jamais été décrit précédemment. Seule une étude a montré que l'expression de leptine gastrique était significativement plus élevée chez les rats obèses (modèle d'obésité génétique) que chez les rats contrôles (Picó et al., 2002). L'augmentation précoce de la concentration en leptine dans l'antré, observée dès 4 semaines de régime WD, coïncide avec l'augmentation de la leptinémie décrite suite à la consommation d'un régime High-fat (Collin et al., 2006; Sutherland et al., 2008).

Notre étude a également mis en évidence la présence de récepteurs à la leptine, non seulement au niveau des neurones entériques mais également des CGE, et identifie ainsi le SNE comme une cible potentielle de la leptine. Seule une étude avait déjà montré l'expression

des récepteurs à la leptine sur les neurones myentériques dans l'iléon de souris (Liu et al., 1999). Nos résultats suggèrent que la leptine pourrait également exercer une action sur les CGE. Bien que les effets sur les CGE n'aient jamais été démontrés, des études ont mis en évidence une activation gliale, caractérisée par une augmentation des protéines GFAP et vimentine, en réponse à une exposition chronique à la leptine dans le système nerveux central (García-Cáceres et al., 2011). L'implication de la leptine dans l'augmentation du nombre de CGE, observée dans l'antre, reste donc à déterminer. D'autre part, en accord avec un effet neuronal, des travaux récents ont montré que la leptine était capable d'augmenter l'activité des neurones entériques à court terme (Liu et al., 1999; Reichardt et al., 2011). Néanmoins, ses effets à plus long terme sur le phénotype du SNE restaient jusqu'à présent inconnus. Au cours de cette étude, nous avons démontré que la leptine induisait des modifications neuroplastiques du SNE, en augmentant la production de neuromédiateurs, comme le VIP, et de facteurs neurotrophiques, comme le GDNF. Bien que nous n'ayons pas identifié les voies de signalisation impliquées dans cette régulation, des facteurs de transcription tels que STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) qui sont activés par la leptine (de Lartigue et al., 2011) et qui sont impliqués dans la régulation de la production du VIP (Symes et al., 1994) et du GDNF (Tanabe et al., 2009) pourraient intervenir.

Globalement, notre étude suggère des capacités protectrices de la leptine sur le SNE et les fonctions digestives. En effet, l'augmentation de la concentration en GDNF induite par la leptine pourrait être impliquée dans la neuroprotection des neurones myentériques observée dans l'antre des souris WD. De plus, la leptine induit également la production de VIP, connu pour jouer un rôle neuroprotecteur dans le SNE (Arciszewski et al., 2008). Outre leurs effets neuroprotecteurs dans le SNE, les deux médiateurs, GDNF et VIP, exercent également des effets bénéfiques sur la BEI. En effet, le GDNF est capable de protéger la BEI dans un modèle de colite expérimentale chez la souris (Zhang et al., 2010). De même, le VIP diminue la perméabilité paracellulaire (Neunlist et al., 2003) et protège la BEI dans un modèle de colite chez la souris (Conlin et al., 2009).

L'ensemble de ces résultats suggère donc des effets protecteurs de la leptine sur les neurones myentériques de l'antre et sur la BEI, qui pourraient correspondre à un mécanisme d'adaptation précoce face à l'augmentation du stress oxydant induite par le régime WD. En effet, il a été décrit que le régime WD augmentait significativement, et dès les premières

semaines de régime, le stress oxydant dans le tractus GI (Erdelyi et al., 2009). Cette augmentation du stress oxydant a été décrite comme précédant l'apparition de complications telles que l'insulino-résistance (Matsuzawa-Nagata et al., 2008). Les effets protecteurs de la leptine pourraient ainsi être transitoires jusqu'au développement d'une leptino-résistance, induite par l'exposition prolongée à des concentrations en leptine trop élevées. En accord avec cette hypothèse, les résultats obtenus *in vitro* suggèrent que la leptine n'exerce plus ses effets sur le SNE à la concentration testée la plus élevée. En effet, à la dose 1000 ng/mL, la leptine n'augmente pas la production de VIP dans les cultures primaires de SNE, suggérant une possible désensibilisation des récepteurs ou une atténuation de la signalisation de la leptine (Myers et al., 2008). De plus, nous avons observé qu'après 36 semaines de régime WD, la concentration en VIP dans le jéjunum était diminuée par rapport au régime contrôle (données non montrées). Il est possible que le processus de leptino-résistance se mette en place entre les temps 12 et 36 semaines de régime WD, comme cela a été décrit chez la souris à partir de 20 semaines de régime High-fat (Lin et al., 2000), et que la leptine ne puisse plus induire l'augmentation de la production de VIP dans le SNE. En effet, des modifications physiologiques telles que la mise en place du diabète, ont été observées, dans notre modèle, entre les temps 12 et 36 semaines de régime. Par conséquent, notre modèle d'étude (12 semaines de régime WD) reflète probablement une phase précoce de l'obésité. Dans des phases plus tardives, une perte de la sensibilité à la leptine, pourrait entraîner une perte des effets protecteurs du régime WD et favoriser le développement de neuropathies entériques et de dysfonctionnements GI.

## **Conclusion générale et perspectives**

En conclusion, l'ensemble des résultats de ce travail de thèse souligne qu'une intervention nutritionnelle tirant profit des facteurs protecteurs associés au régime WD, tels que la leptine, le GDNF ou le VIP, pourrait être envisagée comme une nouvelle approche thérapeutique dans des pathologies chroniques où des processus dégénératifs ou inflammatoires sont mis en jeu.

# Références

---

- Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.-P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., et Lardeux, B. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J* 24, 1082-1094.
- Adibi, S. (1997). The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: Biology and function. *Gastroenterology* 113, 332-340.
- Adrian, T. E., Ferri, G. L., Bacarese-Hamilton, A. J., Fuessl, H. S., Polak, J. M., et Bloom, S. R. (1985). Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology* 89, 1070-1077.
- Ahrén, B. (1999). Plasma leptin and insulin in C57BI/6J mice on a high-fat diet: relation to subsequent changes in body weight. *Acta Physiol. Scand* 165, 233-240.
- Ahrén, B., et Larsson, H. (1997). Leptin--a regulator of islet function?: its plasma levels correlate with glucagon and insulin secretion in healthy women. *Metab. Clin. Exp* 46, 1477-1481.
- Anderson, C. M. H., Mendoza, M. E., Kennedy, D. J., Raldua, D., et Thwaites, D. T. (2003). Inhibition of intestinal dipeptide transport by the neuropeptide VIP is an anti-absorptive effect via the VPAC1 receptor in a human enterocyte-like cell line (Caco-2). *Br. J. Pharmacol* 138, 564-573.
- Anglade, P., Michel, C., et Rozé, 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.
- Anitha, M., Gondha, C., Sutliff, R., Parsadonian, A., Mwangi, S., Sitaraman, S. V., et Srinivasan, S. (2006). GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J. Clin. Invest* 116, 344-356.
- Anlauf, M., Schäfer, M. K.-H., Eiden, L., et Weihe, E. (2003). Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J. Comp. Neurol* 459, 90-111.
- Arakawa, T., Uno, H., Fukuda, T., Higuchi, K., Kobayashi, K., et Kuroki, T. (1997). New aspects of gastric adaptive relaxation, reflex after food intake for more food: involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves and nitric oxide. *J Smooth Muscle Res* 33, 81-88.

- Arciszewski, M. B., Sand, E., et Ekblad, E. (2008). Vasoactive intestinal peptide rescues cultured rat myenteric neurons from lipopolysaccharide induced cell death. *Regul. Pept.* *146*, 218-223.
- Arrieta, M. C., Bistritz, L., et Meddings, J. B. (2006). Alterations in intestinal permeability. *Gut* *55*, 1512-1520.
- Aubé, A.-C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J. P., et Neunlist, M. (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* *55*, 630-637.
- Auerbach, L. (1864). Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch. Pathol. Anat. Physiol.*(, 457-460.
- Azpiroz, F., et Malagelada, J. R. (1985). Intestinal control of gastric tone. *Am. J. Physiol* *249*, G501-509.
- Bach-Ngohou, K., Mahé, M. M., Aubert, P., Abdo, H., Boni, S., Bourreille, A., Denis, M. G., Lardeux, B., Neunlist, M., et Masson, D. (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J. Physiol. (Lond.)* *588*, 2533-2544.
- 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.
- Bailey, C. J., Flatt, P. R., Kwasowski, P., Powell, C. J., et Marks, V. (1986). Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide and K cell hyperplasia in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice fed high fat and high carbohydrate cafeteria diets. *Acta Endocrinol* *112*, 224-229.
- Balda, M. S., Garrett, M. D., et Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell Biol* *160*, 423-432.
- Balemba, O. B., Hay-Schmidt, A., Assey, R. J., Kahwa, C. K. B., Semuguruka, W. D., et Dantzer, V. (2002). An Immunohistochemical Study of the Organization of Ganglia and Nerve Fibres in the Mucosa of the Porcine Intestine. *Anatomia, Histologia, Embryologia* *31*, 237-246.
- Balint, J., Fried, M., et Imai, C. (1980). Ileal uptake of oleic acid: evidence for adaptive response to high fat feeding. *The American Journal of Clinical Nutrition* *33*, 2276 - 2280.
- Bär, K. J., Facer, P., Williams, N. S., Tam, P. K., et Anand, P. (1997). Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* *112*, 1381-1385.
- Barada, K. A., Saadé, N. E., Atweh, S. F., Khoury, C. I., et Nassar, C. F. (2000). Calcitonin gene-related peptide regulates amino acid absorption across rat jejunum. *Regul. Pept* *90*, 39-45.

- Barrachina, M. D., Martínez, V., Wang, L., Wei, J. Y., et Taché, Y. (1997). Synergistic interaction between leptin and cholecystikinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 10455-10460.
- Barreau, F., Salvador-Cartier, C., Houdeau, E., Bueno, L., et Fioramonti, J. (2008). Long-term alterations of colonic nerve-mast cell interactions induced by neonatal maternal deprivation in rats. *Gut* 57, 582-590.
- Bayliss, W. M., et Starling, E. H. (1899). The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol. (Lond.)* 24, 99-143.
- Bayliss, W. M., et Starling, E. H. (1900). The movements and the innervation of the large intestine. *J Physiol* 26, 107-118.
- Beck, B., Musse, N., et Stricker-Krongrad, A. (2002). Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in long-evans rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 292, 1031-1035.
- Belai, A., Cooper, S., et Burnstock, G. (1995). Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurones of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Res* 279, 379-383.
- Belai, A., et Burnstock, G. (1999). Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and calretinin in myenteric neurons of developing, aging, and Crohn's disease human small intestine. *Dig. Dis. Sci* 44, 1579-1587.
- Bernard, C. E., Gibbons, S. J., Gomez-Pinilla, P. J., Lurken, M. S., Schmalz, P. F., Roeder, J. L., Linden, D., Cima, R. R., Dozois, E. J., Larson, D. W., et al. (2009). Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterol. Motil* 21, 746-e46.
- Bertrand, P. P., Kunze, W. A., Bornstein, J. C., Furness, J. B., et 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.
- Bertrand, R. L., Senadheera, S., Markus, I., Liu, L., Howitt, L., Chen, H., Murphy, T. V., Sandow, S. L., et Bertrand, P. P. (2011). A Western diet increases serotonin availability in rat small intestine. *Endocrinology* 152, 36-47.
- Bjerknes, M., et Cheng, H. (2001). Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98, 12497-12502.
- Blais, A., Aymard, P., et Lacour, B. (1997). Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers. *Pflugers Arch* 434, 300-305.
- Blaugrund, E., Pham, T. D., Tennyson, V. M., Lo, L., Sommer, L., Anderson, D. J., et Gershon, M. D. (1996). Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Development* 122, 309 -320.

- Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N., et Pachnis, V. (2006). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development* *133*, 2075 -2086.
- Borovicka, J., Schwizer, W., Guttman, G., Hartmann, D., Kosinski, M., Wastiel, C., Bischof-Delaloye, A., et Fried, M. (2000). Role of lipase in the regulation of postprandial gastric acid secretion and emptying of fat in humans: a study with orlistat, a highly specific lipase inhibitor. *Gut* *46*, 774-781.
- Boudry, G., Morise, A., Seve, B., et LE Huërou-Luron, I. (2011). Effect of milk formula protein content on intestinal barrier function in a porcine model of LBW neonates. *Pediatr. Res.* *69*, 4-9.
- Boyd, K. A., O'Donovan, D. G., Doran, S., Wishart, J., Chapman, I. M., Horowitz, M., et Feinle, C. (2003). High-fat diet effects on gut motility, hormone, and appetite responses to duodenal lipid in healthy men. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* *284*, G188 -G196.
- von Boyen, G. B., Steinkamp, M., Geerling, I., Reinshagen, M., Schäfer, K. H., Adler, G., et Kirsch, J. (2006). Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis* *12*, 346-354.
- von Boyen, G. B., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., et Kirsch, J. (2004). Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* *53*, 222-228.
- von Boyen, Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., et Steinkamp, M. (2011). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol* *11*, 3.
- Braun, N., Sévigny, J., Robson, S. C., Hammer, K., Hanani, M., et Zimmermann, H. (2004). Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia* *45*, 124-132.
- Brehmer, A., Schrödl, F., et Neuhuber, W. (1999). Morphological classifications of enteric neurons -- 100 years after Dogiel. *Anatomy and Embryology* *200*, 125-135.
- Brignardello, J., Morales, P., Diaz, E., Romero, J., Brunser, O., et Gotteland, M. (2010). Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *32*, 1307-1314.
- Brookes, S. J., Meedeniya, A. C., Jobling, P., et Costa, M. (1997). Orally projecting interneurons in the guinea-pig small intestine. *J. Physiol. (Lond.)* *505* ( Pt 2), 473-491.
- Brown, N. J., Read, N. W., Richardson, A., Rumsey, R. D., et Bogentoft, C. (1990). Characteristics of lipid substances activating the ileal brake in the rat. *Gut* *31*, 1126-1129.

- Brown, N. J., Rumsey, R. D., et Read, N. W. (1987). Adaptation of hydrogen analysis to measure stomach to caecum transit time in the rat. *Gut* 28, 849-854.
- Brown, N. J., Rumsey, R. D., et Read, N. W. (1994). Gastrointestinal adaptation to enhanced small intestinal lipid exposure. *Gut* 35, 1409-1412.
- Brubaker, P. L. (2006). The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1070, 10-26.
- Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., et Bollheimer, L. C. (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J. Mol. Endocrinol* 36, 485-501.
- Burns, A. J., Pasricha, P. J., et Young, H. M. (2004). Enteric neural crest-derived cells and neural stem cells: biology and therapeutic potential. *Neurogastroenterol. Motil* 16 *Suppl* 1, 3-7.
- Burns, A. J., Roberts, R. R., Bornstein, J. C., et Young, H. M. (2009). Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. *Semin. Pediatr. Surg.* 18, 196-205.
- Bush, T. G., Savidge, T. C., Freeman, T. C., Cox, H. J., Campbell, E. A., Mucke, L., Johnson, M. H., et Sofroniew, M. V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93, 189-201.
- Byrnes, D. J., Borody, T., Daskalopoulos, G., Boyle, M., et Benn, I. (1981). Cholecystokinin and gallbladder contraction: effect of CCK infusion. *Peptides* 2 *Suppl* 2, 259-262.
- Cabarrocas, J., Savidge, T. C., et Liblau, R. S. (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41, 81-93.
- Cacalano, G., Fariñas, I., Wang, L.-C., Hagler, K., Forgie, A., Moore, M., Armanini, M., Phillips, H., Ryan, A. M., Reichardt, L. F., et al. (1998). GFR $\alpha$ 1 Is an Essential Receptor Component for GDNF in the Developing Nervous System and Kidney. *Neuron* 21, 53-62.
- Cameron, H. L., et 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.
- Camilleri, M., Cowen, T., et Koch, T. R. (2008). Enteric neurodegeneration in ageing. *Neurogastroenterol. Motil.* 20, 418-429.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., et Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 57, 1470 -1481.
- Cannon, W. B. (1912). Peristalsis, segmentation and the myenteric reflex. *American Journal of Physiology -- Legacy Content* 30, 114 -128.

- Cardoso-Júnior, A., Coelho, L. G. V., Savassi-Rocha, P. R., Vignolo, M. C., Abrantes, M. M., de Almeida, A. M., Dias, E. E., Vieira Júnior, G., de Castro, M. M., et Lemos, Y. V. (2007). Gastric emptying of solids and semi-solids in morbidly obese and non-obese subjects: an assessment using the <sup>13</sup>C-octanoic acid and <sup>13</sup>C-acetic acid breath tests. *Obes Surg* 17, 236-241.
- Casparly, W. (1992). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition* 55, 299S -308S.
- Castell, T., Gómez de Segura, I. A., Vázquez, I., Mata, A., et De Miguel, E. (2001). Somatostatin blockade improves the proliferative response but not intestinal morphological growth after small bowel resection in rats. *Eur J Surg* 167, 54-59.
- Castiglione, K. E., Read, N. W., et French, S. J. (2002). Adaptation to high-fat diet accelerates emptying of fat but not carbohydrate test meals in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 282, R366-371.
- Cataland, S., Crockett, S. E., Brown, J. C., et Mazzaferri, E. L. (1974). Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulation by oral glucose in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 39, 223-228.
- Chaturvedi, L. S., Marsh, H. M., Shang, X., Zheng, Y., et Basson, M. D. (2007). Repetitive deformation activates focal adhesion kinase and ERK mitogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells through Src and Rac1. *J. Biol. Chem* 282, 14-28.
- Cheeseman, C. I. (1993). GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology* 105, 1050-1056.
- Chey, W. Y., et Chang, T. M. (2003). Secretin, 100 years later. *J. Gastroenterol* 38, 1025-1035.
- Chey, W. Y., Hitanant, S., Hendricks, J., et Lorber, S. H. (1970). Effect of secretin and cholecystokinin on gastric emptying and gastric secretion in man. *Gastroenterology* 58, 820-827.
- Chiloiro, M., Caroli, M., Guerra, V., Lodadea Piepoli, A., et Riezzo, G. (1999). Gastric emptying in normal weight and obese children--an ultrasound study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23, 1303-1306.
- van Citters, G. W., Kabir, M., Kim, S. P., Mittelman, S. D., Dea, M. K., Brubaker, P. L., et Bergman, R. N. (2002). Elevated glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide, but not glucose, associated with hyperinsulinemic compensation for fat feeding. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 5191-5198.
- Code, C. F., et Marlett, J. A. (1975). The interdigestive myo-electric complex of the stomach and small bowel of dogs. *The Journal of Physiology* 246, 289 -309.
- Colegio, O. R., Van Itallie, C. M., McCrea, H. J., Rahner, C., et Anderson, J. M. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 283, C142-147.

- Collin, P., Chapados, N., Dufresne, E., Corriveau, P., Imbeault, P., et Lavoie, J.-M. (2006). Time course of changes in in vitro lipolysis of intra-abdominal fat depots in relation to high-fat diet-induced hepatic steatosis in rats. *Br. J. Nutr* 96, 268-275.
- Colturi, T. J., Unger, R. H., et Feldman, M. (1984). Role of circulating somatostatin in regulation of gastric acid secretion, gastrin release, and islet cell function. *Studies in healthy subjects and duodenal ulcer patients. J. Clin. Invest* 74, 417-423.
- Conlin, V. S., Wu, X., Nguyen, C., Dai, C., Vallance, B. A., Buchan, A. M. J., Boyer, L., et Jacobson, K. (2009). Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297, G735-750.
- Cooke, H. J., Wang, Y. Z., et Rogers, R. (1993). Coordination of Cl<sup>-</sup> secretion and contraction by a histamine H<sub>2</sub>-receptor agonist in guinea pig distal colon. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 265, G973 -G978.
- Cooke, H. J., Wunderlich, J., et Christofi, F. L. (2003). « The force be with you »: ATP in gut mechanosensory transduction. *News Physiol. Sci* 18, 43-49.
- Cornet, A., Savidge, T. C., Cabarrocas, J., Deng, W. L., Colombel, J. F., Lassmann, H., Desreumaux, P., et Liblau, R. S. (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13306-13311.
- Corns, R. A., Hidaka, H., et Santer, R. M. (2002). Neurocalcin-alpha immunoreactivity in the enteric nervous system of young and aged rats. *Cell Calcium* 31, 53-58.
- Covasa, M., et Ritter, R. C. (2000). Adaptation to high-fat diet reduces inhibition of gastric emptying by CCK and intestinal oleate. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 278, R166-170.
- Covasa, M., et Ritter, R. C. (1998). Rats maintained on high-fat diets exhibit reduced satiety in response to CCK and bombesin. *Peptides* 19, 1407-1415.
- Covasa, M., Grahn, J., et Ritter, R. C. (2000). Reduced hindbrain and enteric neuronal response to intestinal oleate in rats maintained on high-fat diet. *Auton Neurosci* 84, 8-18.
- Cowen, T., Johnson, R. J., Soubeyre, V., et Santer, R. M. (2000). Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. *Gut* 47, 653-660.
- Crowe, S. E., Soda, K., Stanisiz, A. M., et Perdue, M. H. (1993). Intestinal permeability in allergic rats: nerve involvement in antigen-induced changes. *Am. J. Physiol* 264, G617-623.
- Cummings, D. E., Purnell, J. Q., Frayo, R. S., Schmidova, K., Wisse, B. E., et Weigle, D. S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714-1719.

- Cunningham, K. M., Daly, J., Horowitz, M., et Read, N. W. (1991). Gastrointestinal adaptation to diets of differing fat composition in human volunteers. *Gut* 32, 483-486.
- Daugherty, A. L., et Mrsny, R. J. (1999). Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2, 281-287.
- Debas, H. T., et Carvajal, S. H. (1994). Vagal regulation of acid secretion and gastrin release. *Yale J Biol Med* 67, 145-151.
- Debas, H. T., Faroog, O., et Grossman, M. I. (1975). Inhibition of gastric emptying is a physiological action of cholecystokinin. *Gastroenterology* 68, 1211-1217.
- DelValle, J., et Yamada, T. (1990). Amino acids and amines stimulate gastrin release from canine antral G-cells via different pathways. *J. Clin. Invest* 85, 139-143.
- Demaude, J., Levêque, M., Chaumaz, G., Eutamène, H., Fioramonti, J., Bueno, L., et Ferrier, L. (2009). Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: involvement of pancreatic trypsin. *Life Sci* 84, 847-852.
- Dignass, A. U., Becker, A., Spiegler, S., et Goebell, H. (1998). Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing in vitro. *Eur. J. Clin. Invest* 28, 554-561.
- Dogiel, A. (1899). Uber den bau der ganglion in den geflechten des darms und der gallenblase der menschen und der saugtiere. *Arch Anat Physiol Anat*, 130-158.
- Drucker (2007). The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest* 117, 24-32.
- Ebnet, K. (2008). Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem. Cell Biol* 130, 1-20.
- Eckardt, V. F., et LeCompte, P. M. (1978). Esophageal ganglia and smooth muscle in the elderly. *Am J Dig Dis* 23, 443-448.
- El-Salhy, M., Sandström, O., et Holmlund, F. (1999). Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. *Mech. Ageing Dev* 107, 93-103.
- Erdelyi, I., Levenkova, N., Lin, E. Y., Pinto, J. T., Lipkin, M., Quimby, F. W., et Holt, P. R. (2009). Western-style diets induce oxidative stress and dysregulate immune responses in the colon in a mouse model of sporadic colon cancer. *J. Nutr.* 139, 2072-2078.
- Falko, J. M., Crockett, S. E., Cataland, S., et Mazzaferri, E. L. (1975). Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulated by fat ingestion in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 41, 260-265.
- Fehér, E., et Péntzes, L. (1987). Density of substance P, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin-containing nerve fibers in the ageing small intestine of the rats. *Gerontology* 33, 341-348.

- Feinle, C., D'Amato, M., et Read, N. W. (1996). Cholecystokinin-A receptors modulate gastric sensory and motor responses to gastric distension and duodenal lipid. *Gastroenterology* *110*, 1379-1385.
- Feinle, C., O'Donovan, D., Doran, S., Andrews, J. M., Wishart, J., Chapman, I., et Horowitz, M. (2003). Effects of fat digestion on appetite, APD motility, and gut hormones in response to duodenal fat infusion in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* *284*, G798-807.
- Feinle, C., Rades, T., Otto, B., et Fried, M. (2001). Fat digestion modulates gastrointestinal sensations induced by gastric distention and duodenal lipid in humans. *Gastroenterology* *120*, 1100-1107.
- Feinle-Bisset, C., Patterson, M., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., et Horowitz, M. (2005). Fat digestion is required for suppression of ghrelin and stimulation of peptide YY and pancreatic polypeptide secretion by intraduodenal lipid. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* *289*, E948-953.
- Feltrin, K. L., Little, T. J., Meyer, J. H., Horowitz, M., Smout, A. J. P. M., Wishart, J., Pilichiewicz, A. N., Rades, T., Chapman, I. M., et Feinle-Bisset, C. (2004). Effects of intraduodenal fatty acids on appetite, antropyloroduodenal motility, and plasma CCK and GLP-1 in humans vary with their chain length. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* *287*, R524-533.
- Feltrin, K. L., Patterson, M., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., Meyer, J. H., Horowitz, M., et Feinle-Bisset, C. (2006). Effect of fatty acid chain length on suppression of ghrelin and stimulation of PYY, GLP-2 and PP secretion in healthy men. *Peptides* *27*, 1638-1643.
- Flamant, M., Aubert, P., Rolli-Derkinderen, M., Bourreille, A., Neunlist, M. R., Mahé, M. M., Meurette, G., Marteyn, B., Savidge, T., Galmiche, J. P., et al. (2011). Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* *60*, 473-484.
- Fletcher, E. L., Clark, M. J., et Furness, J. B. (2002). Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. *Cell Tissue Res* *308*, 339-346.
- Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem. Cell Biol* *130*, 55-70.
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., et Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med* *1*, 1311-1314.
- French, S. J., Murray, B., Rumsey, R. D., Fadzlin, R., et Read, N. W. (1995). Adaptation to high-fat diets: effects on eating behaviour and plasma cholecystokinin. *Br. J. Nutr* *73*, 179-189.

- Furness, J. B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 81, 87-96.
- Furness, J. B., Bornstein, J. C., et Trussell, D. C. (1988). Shapes of nerve cells in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine revealed by the intracellular injection of dye. *Cell Tissue Res* 254, 561-571.
- Furness, J. B., Kunze, W. A. A., Bertrand, P. P., Clerc, N., et Bornstein, J. C. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Progress in Neurobiology* 54, 1-18.
- Furness, J. B., Robbins, H. L., Xiao, J., Stebbing, M. J., et Nurgali, K. (2004). Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon. *Cell Tissue Res* 317, 1-12.
- Gabella, G. (1989). Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterology* 96, 1487-1493.
- Gabella, G. (1971). Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat* 109, 81-95.
- Gabella, G. (1990). On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. *J. Auton. Nerv. Syst* 30 Suppl, S59-66.
- Gabella, G. (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* 6, 425-436.
- Gabella, G., et Trigg, P. (1984). Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *J. Neurocytol* 13, 49-71.
- García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Burgos-Ramos, E., Granado, M., Frago, L. M., Barrios, V., Horvath, T., Argente, J., et Chowen, J. A. (2011). Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology* 152, 1809-1818.
- Garrod, D. R., Merritt, A. J., et Nie, Z. (2002). Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation (Review). *Mol. Membr. Biol* 19, 81-94.
- Geliebter, A. (1988). Gastric distension and gastric capacity in relation to food intake in humans. *Physiol. Behav.* 44, 665-668.
- Gershon, M. D. (1997). Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 7, 101-109.
- Gershon, M. D., et Bursztajn, S. (1978). Properties of the enteric nervous system: limitation of access of intravascular macromolecules to the myenteric plexus and muscularis externa. *J. Comp. Neurol* 180, 467-488.
- Gomes, O. A., de Souza, R. R., et Liberti, E. A. (1997). A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gerontology* 43, 210-217.

- Goyal, R. K., et Hirano, I. (1996). The enteric nervous system. *N. Engl. J. Med* 334, 1106-1115.
- Guilmeau, S., Buyse, M., Tsocas, A., Laigneau, J. P., et Bado, A. (2003). Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop. *Diabetes* 52, 1664-1672.
- Guo, X., Merlin, D., Harvey, R. D., Laboisse, C., et Hopfer, U. (1997). Pharmacological evidence that calcium is not required for P2-receptor-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion in HT29-Cl.16E. *J. Membr. Biol* 155, 239-246.
- Gwynne, R. M., et Bornstein, J. C. (2007). Mechanisms underlying nutrient-induced segmentation in isolated guinea pig small intestine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, G1162 -G1172.
- Hällgren, A., Flemström, G., et Nylander, O. (1998). Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am. J. Physiol* 275, G95-103.
- Hamodeh, S. A., Rehn, M., Haschke, G., et Diener, M. (2004). Mechanism of butyrate-induced hyperpolarization of cultured rat myenteric neurones. *Neurogastroenterol. Motil* 16, 597-604.
- Hampton, S. M., Kwasowski, P., Tan, K., Morgan, L. M., et Marks, V. (1983). Effect of pretreatment with a high fat diet on the gastric inhibitory polypeptide and insulin responses to oral triolein and glucose in rats. *Diabetologia* 24, 278-281.
- Hanani, M., Francke, M., Härtig, W., Grosche, J., Reichenbach, A., et Pannicke, T. (2000). Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 278, G644-651.
- Hansen, M. B. (2003). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol* 92, 105-113.
- Hao, M., et Young, H. (2009). Development of enteric neuron diversity. *J. Cell. Mol. Med* 13, 1193-1210.
- Hardcastle, J. D., et Mann, C. V. (1968). Study of large bowel peristalsis. *Gut* 9, 512-520.
- Hasnain, S. Z., Wang, H., Ghia, J.-E., Haq, N., Deng, Y., Velcich, A., Grecis, R. K., Thornton, D. J., et Khan, W. I. (2010). Mucin gene deficiency in mice impairs host resistance to an enteric parasitic infection. *Gastroenterology* 138, 1763-1771.
- van Haver, E. R., de Vooght, L., Oste, M., Sangild, P. T., Thymann, T., Weyns, A. L. M., et van Ginneken, C. J. (2008). Postnatal and diet-dependent increases in enteric glial cells and VIP-containing neurones in preterm pigs. *Neurogastroenterol. Motil* 20, 1070-1079.

- Hayashi, H., Suzuki, T., Yamamoto, T., et Suzuki, Y. (2003). Cholinergic inhibition of electrogenic sodium absorption in the guinea pig distal colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 284, G617-628.
- Hayden, U. L., et Carey, H. V. (2000). Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 278, R1589-1594.
- Heanue, T. A., et Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat. Rev. Neurosci* 8, 466-479.
- Heddle, R., Collins, P. J., Dent, J., Horowitz, M., Read, N. W., Chatterton, B., et Houghton, L. A. (1989). Motor mechanisms associated with slowing of the gastric emptying of a solid meal by an intraduodenal lipid infusion. *J. Gastroenterol. Hepatol* 4, 437-447.
- Heddle, R., Dent, J., Read, N. W., Houghton, L. A., Toouli, J., Horowitz, M., Maddern, G. J., et Downton, J. (1988a). Antropyloroduodenal motor responses to intraduodenal lipid infusion in healthy volunteers. *Am. J. Physiol* 254, G671-679.
- Heddle, R., Dent, J., Toouli, J., et Read, N. W. (1988b). Topography and measurement of pyloric pressure waves and tone in humans. *Am. J. Physiol* 255, G490-497.
- Heizmann, C. W., Fritz, G., et Schäfer, B. W. (2002). S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front. Biosci* 7, d1356-1368.
- van Helden, D. F., Laver, D. R., Holdsworth, J., et Imtiaz, M. S. (2010). Generation and propagation of gastric slow waves. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 37, 516-524.
- Hennig, G. W., Brookes, S. J., et Costa, M. (1997). Excitatory and inhibitory motor reflexes in the isolated guinea-pig stomach. *J. Physiol. (Lond.)* 501 ( Pt 1), 197-212.
- Hens, J., Schrödl, F., Brehmer, A., Adriaensen, D., Neuhuber, W., Scheuermann, D. W., Schemann, M., et Timmermans, J. P. (2000). Mucosal projections of enteric neurons in the porcine small intestine. *J. Comp. Neurol* 421, 429-436.
- Herrmann, C., Göke, R., Richter, G., Fehmann, H. C., Arnold, R., et Göke, B. (1995). Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56, 117-126.
- Hirota, C. L., et McKay, D. M. (2006). Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *Br. J. Pharmacol* 149, 463-479.
- Hirst, G. D. S., Holman, M. E., et Spence, I. (1974). Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *The Journal of Physiology* 236, 303-326.
- Hoehner, J. C., Wester, T., Pählman, S., et Olsen, L. (1996). Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology* 110, 756-767.

- Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C. W. H., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., et Rühl, A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J. Comp. Neurol* 509, 356-371.
- Hölzer, H. H., Turkelson, C. M., Solomon, T. E., et Raybould, H. E. (1994). Intestinal lipid inhibits gastric emptying via CCK and a vagal capsaicin-sensitive afferent pathway in rats. *Am. J. Physiol* 267, G625-629.
- Hopfer, U., et Groseclose, R. (1980). The mechanism of Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose transport. *J. Biol. Chem* 255, 4453-4462.
- Horowitz, M., Collins, P. J., et Shearman, D. J. (1986). Effect of increasing the caloric/osmotic content of the liquid component of a mixed solid and liquid meal on gastric emptying in obese subjects. *Hum Nutr Clin Nutr* 40, 51-56.
- Horvath, T. L., Sarman, B., García-Cáceres, C., Enriori, P. J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., Borok, E., Argente, J., Chowen, J. A., Perez-Tilve, D., et al. (2010). Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14875-14880.
- Hsuchou, H., He, Y., Kastin, A. J., Tu, H., Markadakis, E. N., Rogers, R. C., Fossier, P. B., et Pan, W. (2009). Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain* 132, 889-902.
- Hunt, J. N., et Knox, M. T. (1968). A relation between the chain length of fatty acids and the slowing of gastric emptying. *J. Physiol. (Lond.)* 194, 327-336.
- Hunt, J. N., et Spurrell, W. R. (1951). The pattern of emptying of the human stomach. *J. Physiol. (Lond.)* 113, 157-168.
- Hunt, J. N., et Stubbs, D. F. (1975). The volume and energy content of meals as determinants of gastric emptying. *J. Physiol. (Lond.)* 245, 209-225.
- Janssens, J., Peeters, T. L., Vantrappen, G., Tack, J., Urbain, J. L., De Roo, M., Muls, E., et Bouillon, R. (1990). Improvement of gastric emptying in diabetic gastroparesis by erythromycin. Preliminary studies. *N. Engl. J. Med* 322, 1028-1031.
- Jessen, K. R., et Mirsky, R. (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286, 736-737.
- Jones, H. F., Butler, R. N., et Brooks, D. A. (2011). Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 300, G202-206.
- Kaspar, M., Zardi, L., et Neri, D. (2006). Fibronectin as target for tumor therapy. *Int. J. Cancer* 118, 1331-1339.
- Katayama, M., Xu, D., Specian, R. D., et Deitch, E. A. (1997). Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: effects of protein malnutrition and endotoxin in rats. *Ann. Surg* 225, 317-326.

- Kellow, J. E., Borody, T. J., Phillips, S. F., Tucker, R. L., et Haddad, A. C. (1986). Human interdigestive motility: variations in patterns from esophagus to colon. *Gastroenterology* *91*, 386-395.
- Kelsh, R. N. (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays* *28*, 788-798.
- Khurana, I. (2006). *Textbook Of Medical Physiology* (Elsevier India).
- Kim, M., Cooke, H. J., Javed, N. H., Carey, H. V., Christofi, F., et Raybould, H. E. (2001a). D-glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells. *Gastroenterology* *121*, 1400-1406.
- Kim, M., Javed, N. H., Yu, J. G., Christofi, F., et Cooke, H. J. (2001b). Mechanical stimulation activates Galphaq signaling pathways and 5-hydroxytryptamine release from human carcinoid BON cells. *J. Clin. Invest* *108*, 1051-1059.
- Kinoshita, M., Suzuki, Y., et Saito, Y. (2002). Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPAR[gamma] activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *293*, 827-831.
- Kirchgessner, A. L., et Gershon, M. D. (1988). Projections of submucosal neurons to the myenteric plexus of the guinea pig intestine: in vitro tracing of microcircuits by retrograde and anterograde transport. *J. Comp. Neurol* *277*, 487-498.
- Kirchgessner, A. L., Liu, M. T., et Gershon, M. D. (1996). In situ identification and visualization of neurons that mediate enteric and enteropancreatic reflexes. *J. Comp. Neurol* *371*, 270-286.
- Kleibeuker, J. H., Beekhuis, H., Piers, D. A., et Schaffalitzky de Muckadell, O. B. (1988). Retardation of gastric emptying of solid food by secretin. *Gastroenterology* *94*, 122-126.
- de La Serre, C. B., Ellis, C. L., Lee, J., Hartman, A. L., Rutledge, J. C., et Raybould, H. E. (2010). Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* *299*, G440-448.
- Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M. M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., et Neunlist, M. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* *300*, G976-987.
- Van Landeghem, L., Mahé, M. M., Teusan, R., Léger, J., Guisle, I., Houlgatte, R., et Neunlist, M. (2009). Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics* *10*, 507.
- Langley, J. N., et Magnus, R. (1905). Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. *J Physiol* *33*, 34-51.

- Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessar, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P., et Pachnis, V. (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J. Clin. Invest.* *121*, 3412-3424.
- de Lartigue, G., Barbier de la Serre, C., Espero, E., Lee, J., et Raybould, H. E. (2011). Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* *301*, E187-195.
- Lee, H.-M., Wang, G., Englander, E. W., Kojima, M., et Greeley Jr., G. H. (2002). Ghrelin, A New Gastrointestinal Endocrine Peptide that Stimulates Insulin Secretion: Enteric Distribution, Ontogeny, Influence of Endocrine, and Dietary Manipulations. *Endocrinology* *143*, 185 -190.
- Lelièvre, V., Meunier, A. C., Caigneaux, E., Falcon, J., et Muller, J. M. (1998). Differential expression and function of PACAP and VIP receptors in four human colonic adenocarcinoma cell lines. *Cell. Signal* *10*, 13-26.
- Levin, F., Edholm, T., Schmidt, P. T., Grybäck, P., Jacobsson, H., Degerblad, M., Höybye, C., Holst, J. J., Rehfeld, J. F., Hellström, P. M., et al. (2006). Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal-weight humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *91*, 3296-3302.
- Li, P., Lee, K. Y., Chang, T. M., et Chey, W. Y. (1990). Mechanism of acid-induced release of secretin in rats. Presence of a secretin-releasing peptide. *J. Clin. Invest* *86*, 1474-1479.
- Li, Q., Zhang, Q., Wang, C., Li, N., et Li, J. (2008). Invasion of enteropathogenic *Escherichia coli* into host cells through epithelial tight junctions. *FEBS J* *275*, 6022-6032.
- Li, Y., et Owyang, C. (2003). Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? V. Remodeling of vagus and enteric neural circuitry after vagal injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* *285*, G461-469.
- Li, Y., et Owyang, C. (1993). Vagal afferent pathway mediates physiological action of cholecystokinin on pancreatic enzyme secretion. *J. Clin. Invest* *92*, 418-424.
- Lieverse, R. J., Jansen, J. B., Masclee, A. A., Rovati, L. C., et Lamers, C. B. (1994). Effect of a low dose of intraduodenal fat on satiety in humans: studies using the type A cholecystokinin receptor antagonist loxiglumide. *Gut* *35*, 501-505.
- Lin, S., Thomas, T. C., Storlien, L. H., et Huang, X. F. (2000). Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *24*, 639-646.
- Little, T. J., Feltrin, K. L., Horowitz, M., Meyer, J. H., Wishart, J., Chapman, I. M., et Feinle-Bisset, C. (2008). A high-fat diet raises fasting plasma CCK but does not affect upper gut motility, PYY, and ghrelin, or energy intake during CCK-8 infusion in lean men. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *294*, R45 -R51.

- Liu, M., Seino, S., et Kirchgessner, A. L. (1999). Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system. *J. Neurosci* 19, 10305-10317.
- Lomax, A. E., et Furness, J. B. (2000). Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res* 302, 59-72.
- Lu, L., et Walker, W. A. (2001). Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 1124S-1130S.
- Lubbers, T., Luyer, M. D. P., de Haan, J.-J., Hadfoune, M., Buurman, W. A., et Greve, J. W. M. (2009). Lipid-rich enteral nutrition reduces postoperative ileus in rats via activation of cholecystinin-receptors. *Ann. Surg.* 249, 481-487.
- Luyer, M. D. P., Buurman, W. A., Hadfoune, M., Jacobs, J. A., Konstantinov, S. R., Dejong, C. H. C., et Greve, J. W. M. (2004). Pretreatment with high-fat enteral nutrition reduces endotoxin and tumor necrosis factor-alpha and preserves gut barrier function early after hemorrhagic shock. *Shock* 21, 65-71.
- Mammen, J. M. V., et Matthews, J. B. (2003). Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit. Care Med* 31, S532-537.
- Marieb, E.-N. (1993). Anatomie et physiologie humaine (De Boeck).
- Mashimo, H., Kjellin, A., et Goyal, R. K. (2000). Gastric stasis in neuronal nitric oxide synthase-deficient knockout mice. *Gastroenterology* 119, 766-773.
- Mathison, R., et Shaffer, E. (2006). Increased cholinergic contractions of jejunal smooth muscle caused by a high cholesterol diet are prevented by the 5-HT4 agonist--tegaserod. *BMC Gastroenterol* 6, 8.
- Matini, P., Mayer, B., et Faussone-Pellegrini, M. S. (1997). Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. *Cell Tissue Res* 288, 11-23.
- Matsuzawa-Nagata, N., Takamura, T., Ando, H., Nakamura, S., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Yokoyama, M., Honda, M., Miyamoto, K.-ichi, et al. (2008). Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 57, 1071-1077.
- Maudlej, N., et Hanani, M. (1992). Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig. *Brain Res* 578, 94-98.
- Mawe, G. M., et Gershon, M. D. (1989). Structure, afferent innervation, and transmitter content of ganglia of the guinea pig gallbladder: relationship to the enteric nervous system. *J. Comp. Neurol* 283, 374-390.
- Mazzuoli, G., et Schemann, M. (2009). Multifunctional rapidly adapting mechanosensitive enteric neurons (RAMEN) in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 4681-4694.

- McConalogue, et Furness (1994). Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab* 8, 51-76.
- McLaughlin, J., Grazia Lucà, M., Jones, M. N., D'Amato, M., Dockray, G. J., et Thompson, D. G. (1999). Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility. *Gastroenterology* 116, 46-53.
- Mearadji, B., Straathof, J. W., Lamers, C. B., et Masclee, A. A. (1999). Effect of gastrin on proximal gastric motor function in humans. *Neurogastroenterol. Motil* 11, 449-455.
- Meciano Filho, J., Carvalho, V. C., et de Souza, R. R. (1995). Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. *Gerontology* 41, 18-21.
- Misiewicz, J. J., Waller, S. L., et Holdstock, D. J. (1969). Gastrointestinal motility and gastric secretion during intravenous infusions of gastrin II. *Gut* 10, 723-729.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., et Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6, 56-68.
- Moesgaard, S. G., Ahrén, B., Carr, R. D., Gram, D. X., Brand, C. L., et Sundler, F. (2004). Effects of high-fat feeding and fasting on ghrelin expression in the mouse stomach. *Regulatory Peptides* 120, 261-267.
- Mogard, M. H., Maxwell, V., Wong, H., Reedy, T. J., Sytnik, B., et Walsh, J. H. (1988). Somatostatin may not be a hormonal messenger of fat-induced inhibition of gastric functions. *Gastroenterology* 94, 405-408.
- Moore, B. J. (1987). The Cafeteria Diet—An Inappropriate Tool for Studies of Thermogenesis. *The Journal of Nutrition* 117, 227 -231.
- Moore, M. W., Klein, R. D., Fariñas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L. F., Ryan, A. M., Carver-Moore, K., et Rosenthal, A. (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 76-79.
- Mullin, J. M., Valenzano, M. C., Verrecchio, J. J., et Kothari, R. (2002). Age- and diet-related increase in transepithelial colon permeability of Fischer 344 rats. *Dig. Dis. Sci* 47, 2262-2270.
- Muza-Moons, M. M., Schneeberger, E. E., et Hecht, G. A. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol* 6, 783-793.
- Myers, M. G., Cowley, M. A., et Münzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 537-556.
- Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M., et Aoki, E. (2001). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol Signals Recept* 10, 336-340.

- Natarajan, D., Marcos-Gutierrez, C., Pachnis, V., et de Graaff, E. (2002). Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* *129*, 5151-5160.
- Nauck, M. A., Niedereichholz, U., Ettl, R., Holst, J. J., Orskov, C., Ritzel, R., et Schmiegel, W. H. (1997). Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am. J. Physiol* *273*, E981-988.
- Neal, M. D., Leaphart, C., Levy, R., Prince, J., Billiar, T. R., Watkins, S., Li, J., Cetin, S., Ford, H., Schreiber, A., et al. (2006). Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J. Immunol.* *176*, 3070-3079.
- Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Rühl, A., Lardeux, B., Savidge, T., et al. (2007). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* *292*, G231-241.
- Neunlist, M., Dobрева, G., et Schemann, M. (1999). Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *J. Physiol. (Lond.)* *517 ( Pt 2)*, 533-546.
- Neunlist, M., et Schemann, M. (1998). Polarised innervation pattern of the mucosa of the guinea pig distal colon. *Neurosci. Lett* *246*, 161-164.
- Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisse, C. L., Galmiche, J.-P., et Jarry, A. (2003). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* *285*, G1028-1036.
- Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J. Invest. Dermatol* *127*, 2525-2532.
- Nieuwenhuijs, V. B., Verheem, A., van Duijvenbode-Beumer, H., Visser, M. R., Verhoef, J., Gooszen, H. G., et Akkermans, L. M. (1998). The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann. Surg* *228*, 188-193.
- Nishi, S., et North, R. A. (1973). Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *The Journal of Physiology* *231*, 471-491.
- Olsson, C., et Holmgren, S. (2001). The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* *128*, 479-501.
- Ono, S., Karaki, S.-ichiro, et Kuwahara, A. (2004). Short-chain fatty acids decrease the frequency of spontaneous contractions of longitudinal muscle via enteric nerves in rat distal colon. *Jpn. J. Physiol* *54*, 483-493.
- Orihata, M., et Sarna, S. K. (1994). Inhibition of nitric oxide synthase delays gastric emptying of solid meals. *J. Pharmacol. Exp. Ther* *271*, 660-670.

- Orloff, S. L., Bunnett, N. W., Walsh, J. H., et Debas, H. T. (1992). Intestinal acid inhibits gastric acid secretion by neural and hormonal mechanisms in rats. *Am. J. Physiol* 262, G165-170.
- Ouellette, A. J., et Bevins, C. L. (2001). Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm. Bowel Dis* 7, 43-50.
- Pappas, T. N., Debas, H. T., Chang, A. M., et Taylor, I. L. (1986). Peptide YY release by fatty acids is sufficient to inhibit gastric emptying in dogs. *Gastroenterology* 91, 1386-1389.
- Paton, W. D., et Vane, J. R. (1963). Analysis of the responses of the isolated stomach to electrical stimulation and to drugs. *J. Physiol. (Lond.)* 165, 10-46.
- Patsos, G., et Corfield, A. (2009). Management of the human mucosal defensive barrier: evidence for glycan legislation. *Biol. Chem* 390, 581-590.
- Paul, D. R., Kramer, M., Rhodes, D. G., et Rumpler, W. V. (2005). Preprandial ghrelin is not affected by macronutrient intake, energy intake or energy expenditure. *J Negat Results Biomed* 4, 2.
- Paupe, J., et Meyer, B. (1969). [Immunoglobulins in the fetus and the newborn infant. I. General development: immunoglobulins of maternal origin]. *Pathol. Biol.* 17, 87-96.
- Petit, V., Arnould, L., Martin, P., Monnot, M.-C., Pineau, T., Besnard, P., et Niot, I. (2007). Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *J. Lipid Res* 48, 278-287.
- Phillips, R. J., et Powley, T. L. (2001). As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol* 434, 358-377.
- Phillips, T. E., Phillips, T. H., et Neutra, M. R. (1984). Regulation of intestinal goblet cell secretion. IV. Electrical field stimulation in vitro. *Am. J. Physiol* 247, G682-687.
- Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E. J., Huang, S. P., Saarma, M., Hoffer, B. J., et al. (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 73-76.
- Picó, C., Sánchez, J., Oliver, P., et Palou, A. (2002). Leptin production by the stomach is up-regulated in obese (fa/fa) Zucker rats. *Obes. Res.* 10, 932-938.
- Pilichiewicz, A. N., Little, T. J., Brennan, I. M., Meyer, J. H., Wishart, J. M., Otto, B., Horowitz, M., et Feinle-Bisset, C. (2006). Effects of load, and duration, of duodenal lipid on antropyloroduodenal motility, plasma CCK and PYY, and energy intake in healthy men. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 290, R668-677.
- Plaisancié, P., Barcelo, A., Moro, F., Claustre, J., Chayvialle, J. A., et Cuber, J. C. (1998). Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am. J. Physiol* 275, G1073-1084.

- Pompolo, S., et Furness (1993). Origins of synaptic inputs to calretinin immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine. *J. Neurocytol* 22, 531-546.
- Ponter, A. A., Salter, D. N., Morgan, L. M., et Flatt, P. R. (1991). The Effect of Energy Source and Feeding Level on the Hormones of the Entero-Insular Axis and Plasma Glucose in the Growing Pig. *British Journal of Nutrition* 66, 187-197.
- Potten, C. S. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am. J. Physiol* 273, G253-257.
- Potten, C. S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 353, 821-830.
- Prochnow, N., et Dermietzel, R. (2008). Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem. Cell Biol* 130, 71-77.
- de Quelen, F., Chevalier, J., Rolli-Derkinderen, M., Mourot, J., Neunlist, M., et Boudry, G. (2011). N-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the post-natal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *J Physiol*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21746785> [Consulté août 16, 2011].
- Raybould, H. E., et Hölzer, H. H. (1993). Duodenal acid-induced inhibition of gastric motility and emptying in rats. *Am. J. Physiol* 265, G540-546.
- Read, N. W., McFarlane, A., Kinsman, R. I., Bates, T. E., Blackhall, N. W., Farrar, G. B., Hall, J. C., Moss, G., Morris, A. P., et O'Neill, B. (1984). Effect of infusion of nutrient solutions into the ileum on gastrointestinal transit and plasma levels of neurotensin and enteroglucagon. *Gastroenterology* 86, 274-280.
- Reichardt, F., Krueger, D., et Schemann, M. (2011). Leptin excites enteric neurons of guinea-pig submucous and myenteric plexus. *Neurogastroenterol. Motil* 23, e165-170.
- Reiche, D., Pfannkuche, H., Michel, K., et Schemann, M. (1998). Structural and functional organization of the enteric nervous system in the stomach. *DTW. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr* 105, 461-465.
- Resnick, M. B., Colgan, S. P., Patapoff, T. W., Mrsny, R. J., Awtrey, C. S., Delp-Archer, C., Weller, P. F., et Madara, J. L. (1993). Activated eosinophils evoke chloride secretion in model intestinal epithelia primarily via regulated release of 5'-AMP. *J. Immunol* 151, 5716-5723.
- Rindi, G., Leiter, A. B., Kopin, A. S., Bordi, C., et Solcia, E. (2004). The « normal » endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1014, 1-12.
- Roberts, R. R., Murphy, J. F., Young, H. M., et Bornstein, J. C. (2007). Development of colonic motility in the neonatal mouse-studies using spatiotemporal maps. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G930-938.

- Robertson, M. D., Henderson, R. A., Vist, G. E., et Rumsey, R. D. E. (2004). Plasma ghrelin response following a period of acute overfeeding in normal weight men. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* 28, 727-733.
- Rodrigues, D. M., Li, A. Y., Nair, D. G., et Blennerhassett, M. G. (2011). Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil* 23, e44-56.
- Rothman, T. P., Tennyson, V. M., et Gershon, M. D. (1986). Colonization of the bowel by the precursors of enteric glia: studies of normal and congenitally aganglionic mutant mice. *J. Comp. Neurol* 252, 493-506.
- Rotondo, A., Amato, A., Baldassano, S., Lentini, L., et Mulè, F. (2011). Gastric relaxation induced by glucagon-like peptide-2 in mice fed a high-fat diet or fasted. *Peptides* 32, 1587-1592.
- Rühl, A. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol. Motil* 17, 777-790.
- Rühl, A., Nasser, Y., et Sharkey, K. A. (2004). Enteric glia. *Neurogastroenterology & Motility* 16, 44-49.
- Rühl, A., Trotter, J., et Stremmel, W. (2001). Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol. Motil* 13, 95-106.
- Sabb, J. E., Godfrey, P. M., et Brannon, P. M. (1986). Adaptive Response of Rat Pancreatic Lipase to Dietary Fat: Effects of Amount and Type of Fat. *The Journal of Nutrition* 116, 892 -899.
- Sagher, F. A., Dodge, J. A., Johnston, C. F., Shaw, C., Buchanan, K. D., et Carr, K. E. (1991). Rat Small Intestinal Morphology and Tissue Regulatory Peptides: Effects of High Dietary Fat. *British Journal of Nutrition* 65, 21-28.
- Saito, S., Ogawa, T., Saito, H., Ishimaru, K., Oshima, I., et Sonaka, Y. (1980). Regulation of motilin secretion in the postprandial state in man. *Endocrinol. Jpn* 27 *Suppl* 1, 157-162.
- Santer, R. M. (1994). Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst* 49, 115-121.
- Santer, R. M., et Baker, D. M. (1988). Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst* 25, 59-67.
- Savidge, T. C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., et Sofroniew, M. V. (2007). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132, 1344-1358.
- Sayegh, A. I., Covasa, M., et Ritter, R. C. (2004). Intestinal infusions of oleate and glucose activate distinct enteric neurons in the rat. *Auton Neurosci* 115, 54-63.

- Schemann, M., et Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil* 16 Suppl 1, 55-59.
- Schemann, M., Schaaf, C., et Mäder, M. (1995). Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *J. Comp. Neurol* 353, 161-178.
- Schubert, M. L., et Peura, D. A. (2008). Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology* 134, 1842-1860.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., et Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367, 380-383.
- Schwartz, G. J., Berkow, G., McHugh, P. R., et Moran, T. H. (1993). Gastric branch vagotomy blocks nutrient and cholecystokinin-induced suppression of gastric emptying. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 264, R630 -R637.
- Scoaris, C. R., Rizo, G. V., Roldi, L. P., de Moraes, S. M. F., de Proença, A. R. G., Peralta, R. M., et Natali, M. R. M. (2010). Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition* 26, 312-320.
- Sepple, C. P., et Read, N. W. (1989). Gastrointestinal correlates of the development of hunger in man. *Appetite* 13, 183-191.
- Sherwood, L. (2006). *Physiologie humaine (De Boeck Supérieur)*.
- Shuttleworth, C. W., Xue, C., Ward, S. M., de Vente, J., et Sanders, K. M. (1993). Immunohistochemical localization of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon: responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience* 56, 513-522.
- Sidebotham, E. L., Woodward, M. N., Kenny, S. E., Lloyd, D. A., Vaillant, C. R., et Edgar, D. H. (2002). Localization and endothelin-3 dependence of stem cells of the enteric nervous system in the embryonic colon. *Journal of Pediatric Surgery* 37, 145-150.
- Singh, A., Balint, J. A., Edmonds, R. H., et Rodgers, J. B. (1972). Adaptive changes of the rat small intestine in response to a high fat diet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 260, 708-715.
- Sobhani, I., Bado, A., Vissuzaine, C., Buyse, M., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Attoub, S., Lehy, T., Henin, D., Mignon, M., et al. (2000). Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 47, 178-183.
- Sobhani, I., Buyse, M., Goïot, H., Weber, N., Laigneau, J.-P., Henin, D., Soul, J.-C., et Bado, A. (2002). Vagal stimulation rapidly increases leptin secretion in human stomach. *Gastroenterology* 122, 259-263.

- Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J. P., et Neunlist, M. (2010). Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats. *Gastroenterology* 138, 1772-1782.e4.
- de Souza, R. R., Moratelli, H. B., Borges, N., et Liberti, E. A. (1993). Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. *Gerontology* 39, 183-188.
- Spannagel, A. W., Nakano, I., Tawil, T., Chey, W. Y., Liddle, R. A., et Green, G. M. (1996). Adaptation to fat markedly increases pancreatic secretory response to intraduodenal fat in rats. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 270, G128 -G135.
- Stremmel, W., Lotz, G., Strohmeyer, G., et Berk, P. D. (1985). Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J. Clin. Invest.* 75, 1068-1076.
- Strohmeier, G. R., Lencer, W. I., Patapoff, T. W., Thompson, L. F., Carlson, S. L., Moe, S. J., Carnes, D. K., Mrsny, R. J., et Madara, J. L. (1997). Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J. Clin. Invest* 99, 2588-2601.
- Sturm, A., et Dignass, A. U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol* 14, 348-353.
- Sutherland, L. N., Capozzi, L. C., Turchinsky, N. J., Bell, R. C., et Wright, D. C. (2008). Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 295, E1076-1083.
- Suzuki, T., et Hara, H. (2010). Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond)* 7, 19.
- Symes, A., Lewis, S., Corpus, L., Rajan, P., Hyman, S. E., et Fink, J. S. (1994). STAT proteins participate in the regulation of the vasoactive intestinal peptide gene by the ciliary neurotrophic factor family of cytokines. *Molecular Endocrinology* 8, 1750 - 1763.
- Szurszewski, J. (1969). A migrating electric complex of canine small intestine. *Am. J. Physiol* 217, 1757-1763.
- Szurszewski, J., Ermilov, L., et Miller, S. (2002). Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* 51, i6-i10.
- Tack, J., et Janssen, P. (2010). Gastroduodenal motility. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 647-655.
- Takahashi, T., Qoubaitary, A., Owyang, C., et Wiley, J. W. (2000). Decreased expression of nitric oxide synthase in the colonic myenteric plexus of aged rats. *Brain Res* 883, 15-21.

- Tamura, C. S., et Ritter, R. C. (1994). Intestinal capsaicin transiently attenuates suppression of sham feeding by oleate. *Am. J. Physiol* 267, R561-568.
- Tanabe, K., Nishimura, K., Dohi, S., et Kozawa, O. (2009). Mechanisms of interleukin-1beta-induced GDNF release from rat glioma cells. *Brain Res* 1274, 11-20.
- Tang, V. W., et Goodenough, D. A. (2003). Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys. J* 84, 1660-1673.
- Thomas, P. A., Akwari, O. E., et Kelly, K. A. (1979). Hormonal control of gastrointestinal motility. *World J Surg* 3, 545-552.
- Thomson, A. B., Keelan, M., Clandinin, M. T., et Walker, K. (1986). Dietary fat selectively alters transport properties of rat jejunum. *J. Clin. Invest* 77, 279-288.
- Thrasivoulou, C., Soubeyre, V., Ridha, H., Giuliani, D., Giaroni, C., Michael, G. J., Saffrey, M. J., et Cowen, T. (2006). Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. *Aging Cell* 5, 247-257.
- van Tilbeurgh, H., Sarda, L., Verger, R., et Cambillau, C. (1992). Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature* 359, 159-162.
- Timmermans, J. P., Adriaensen, D., Cornelissen, W., et Scheuermann, D. W. (1997). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol* 118, 331-340.
- Tosetti, C., Corinaldesi, R., Stanghellini, V., Pasquali, R., Corbelli, C., Zoccoli, G., Di Febo, G., Monetti, N., et Barbara, L. (1996). Gastric emptying of solids in morbid obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 20, 200-205.
- Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Laboisse, C. L., Galmiche, J.-P., et Jarry, A. (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol. Motil* 15, 239-242.
- Travagli, R. A., Hermann, G. E., Browning, K. N., et Rogers, R. C. (2006). Brainstem circuits regulating gastric function. *Annu. Rev. Physiol* 68, 279-305.
- Tschöp, M., Wawarta, R., Riepl, R. L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R., et Folwaczny, C. (2001). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J. Endocrinol. Invest* 24, RC19-21.
- Tsukita, S., Furuse, M., et Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2, 285-293.
- Turner, J. R. (2000). Show me the pathway!: Regulation of paracellular permeability by Na<sup>+</sup>-glucose cotransport. *Advanced Drug Delivery Reviews* 41, 265-281.

- Turner, J. R., et Madara, J. I. (1995). Physiological regulation of intestinal epithelial tight junctions as a consequence of Na<sup>+</sup>-coupled nutrient transport. *Gastroenterology* 109, 1391-1396.
- Tzu, J., et Marinkovich, M. P. (2008). Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 40, 199-214.
- Valenzuela, J. E. (1976). Effect of intestinal hormones and peptides on intragastric pressure in dogs. *Gastroenterology* 71, 766-769.
- Valenzuela, J. E., et Defilippi, C. (1981). Inhibition of gastric emptying in humans by secretion, the octapeptide of cholecystokinin, and intraduodenal fat. *Gastroenterology* 81, 898-902.
- Vantrappen, G., Janssens, J., Hellemans, J., et Ghoo, Y. (1977). The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J. Clin. Invest* 59, 1158-1166.
- de Vries, P., Soret, R., Suply, E., Heloury, Y., et Neunlist, M. (2010). Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 299, G539-547.
- Wade, P. R. (2002). Aging and neural control of the GI tract. I. Age-related changes in the enteric nervous system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 283, G489-495.
- Wade, P. R., et Cowen, T. (2004). Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. *Neurogastroenterol. Motil* 16 *Suppl* 1, 19-23.
- Walker, W. A., Cornell, R., Davenport, L. M., et Isselbacher, K. J. (1972). Macromolecular absorption. Mechanism of horseradish peroxidase uptake and transport in adult and neonatal rat intestine. *J. Cell Biol.* 54, 195-205.
- Walker, W. A., et Isselbacher, K. J. (1974). Uptake and transport of macromolecules by the intestine. Possible role in clinical disorders. *Gastroenterology* 67, 531-550.
- Wang, L.-H., Fang, X.-C., et Pan, G.-Z. (2004). Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 53, 1096-1101.
- Ward, S. M., McLaren, G. J., et Sanders, K. M. (2006). Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *J. Physiol. (Lond.)* 573, 147-159.
- Wedel, T., Roblick, U., Gleiss, J., Schiedeck, T., Bruch, H. P., Kühnel, W., et Krammer, H. J. (1999). Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann. Anat* 181, 327-337.
- Weems, W. A., Seidel, E. R., et Johnson, L. R. (1985). Induction in vitro of a specific pattern of jejunal propulsive behavior by cholecystokinin. *Am. J. Physiol* 248, G470-478.

- Wehkamp, J., et Stange, E. F. (2006). Paneth cells and the innate immune response. *Curr. Opin. Gastroenterol* 22, 644-650.
- Welch, I. M., Cunningham, K. M., et Read, N. W. (1988). Regulation of gastric emptying by ileal nutrients in humans. *Gastroenterology* 94, 401-404.
- Wester, T., O'Briain, D. S., et Puri, P. (1999). Notable postnatal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel. *Gut* 44, 666-674.
- Wood, J. D., et Mayer (1978). Intracellular study of electrical activity of Auerbach's plexus in guinea-pig small intestine. *Pflugers Arch* 374, 265-275.
- Worley, D. S., Pisano, J. M., Choi, E. D., Walus, L., Hession, C. A., Cate, R. L., Sanicola, M., et Birren, S. J. (2000). Developmental regulation of GDNF response and receptor expression in the enteric nervous system. *Development* 127, 4383-4393.
- Wright, R. A., Krinsky, S., Fleeman, C., Trujillo, J., et Teague, E. (1983). Gastric emptying and obesity. *Gastroenterology* 84, 747-751.
- Wu, J. J., Chen, J. X., Rothman, T. P., et Gershon, M. D. (1999). Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development* 126, 1161-1173.
- Xiao, Q., Boushey, R. P., Drucker, D. J., et Brubaker, P. L. (1999). Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology* 117, 99-105.
- Xue, J., Askwith, C., Javed, N. H., et Cooke, H. J. (2007). Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface. *Auton Neurosci* 133, 55-63.
- Yamagishi, T., et Debas, H. T. (1978). Cholecystikinin inhibits gastric emptying by acting on both proximal stomach and pylorus. *Am. J. Physiol* 234, E375-378.
- Young, H. M., Hearn, C. J., Farlie, P. G., Canty, A. J., Thomas, P. Q., et Newgreen, D. F. (2001). GDNF Is a Chemoattractant for Enteric Neural Cells. *Developmental Biology* 229, 503-516.
- Young, H. M., Turner, K. N., et Bergner, A. J. (2005). The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut. *Cell Tissue Res* 320, 1-9.
- Zahorska-Markiewicz, B., Jonderko, K., Lelek, A., et Skrzypek, D. (1986). Gastric emptying in obesity. *Hum Nutr Clin Nutr* 40, 309-313.
- Zhang, D. K., He, F. Q., Li, T. K., Pang, X. H., Cui, D. J., Xie, Q., Huang, X. L., et Gan, H. T. (2010). Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J. Pathol* 222, 213-222.

**RESUME : Impact d'un régime « Western diet » sur la plasticité du système nerveux entérique et répercussions fonctionnelles.**

Le système nerveux entérique (SNE) est un système nerveux intégratif, innervant l'ensemble du tube digestif, qui contrôle les fonctions gastro-intestinales (GI). Certains facteurs nutritionnels peuvent moduler le phénotype du SNE et ainsi modifier les fonctions GI. Cependant, l'impact à long terme d'un déséquilibre nutritionnel sur le SNE reste largement inconnu. Les objectifs de ce travail étaient donc 1) d'étudier les effets du régime « Western diet » (WD), caractérisé par des apports nutritionnels excessifs en acides gras saturés et en glucides simples, sur le SNE ainsi que les répercussions fonctionnelles associées et 2) d'identifier les médiateurs responsables de ces modifications. Dans la première partie de l'étude, nous avons mis en évidence que la consommation du régime WD pendant 12 semaines prévenait la perte des neurones myentériques nitrergiques, associée à l'âge, observée dans l'antra des souris contrôles. Ces modifications du phénotype du SNE étaient associées à une augmentation de la transmission neuromusculaire nitrergique dans l'antra et à une accélération de la vidange gastrique. De plus, nous avons identifié la leptine et le GDNF comme les médiateurs impliqués dans ces effets neuroprotecteurs du régime WD. Dans la seconde partie de l'étude, nous avons observé que le régime WD entraînait une diminution de la perméabilité paracellulaire, associée à une augmentation de l'expression de la protéine de jonction serrée Claudine-1 et du peptide intestinal vasoactif (VIP) dans le jéjunum. Cette étude identifie donc le SNE comme un nouvel acteur impliqué dans les modifications des fonctions GI induites par un régime WD.

Mots-clés : système nerveux entérique, Western diet, vidange gastrique, perméabilité intestinale, leptine.

**SUMMARY: Impact of Western diet on enteric nervous system plasticity and functional repercussions.**

The enteric nervous system (ENS) is an autonomous nervous system integrated along the gut which controls major gastrointestinal (GI) functions. Some nutritional factors can modulate the ENS phenotype and consequently impact upon GI functions. However, the long-term impact of a nutritional imbalance on the ENS and its functional repercussions remain mainly unknown. Therefore, the aims of this work were 1) to characterize the effects of Western diet (WD), high in saturated fatty acids and simple carbohydrates, on the ENS and associated changes in GI functions and 2) to identify factors responsible for these modifications. In the first part of this study, we showed that consumption of WD for 12 weeks prevented the age-associated loss of myenteric nitrergic neurons observed in the antrum of control mice. These changes in the ENS phenotype were associated with an increase in nitrergic neuromuscular transmission in the antrum and an acceleration of gastric emptying. We identified leptin and GDNF as factors involved in WD-induced neuroprotective effects. In the second part of this study, we observed that WD induced a decrease in paracellular permeability, associated with increased expression of tight junction protein Claudin-1 and of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the jejunum. This study identified the ENS as a new actor involved in WD-induced changes GI functions.

Keywords: enteric nervous system, Western diet, gastric emptying, intestinal permeability, leptin.