

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

École Doctorale de " Biologie Santé "

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

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

**DEVELOPPEMENT POSTNATAL ET CIBLAGE  
NUTRITIONNEL DU SYSTEME NERVEUX  
ENTERIQUE :  
ETUDE CHEZ LE RATON NOUVEAU-NE**

**THÈSE DE DOCTORAT**

Discipline : Biologie – Santé – Médecine  
Spécialité : Biologie cellulaire

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Philine de VRIES**

*Le 31 mai 2013, devant le jury ci-dessous*

*Président*

*Rapporteurs*

Pr SEKSIK Philippe : PUPH, Service de gastro-entérologie, CHU Saint Antoine, PARIS

Pr MISERY Laurent : PUPH, Service de dermatologie, CHRU de BREST

*Examineur*

Pr SARNACKI Sabine : PUPH, Service de chirurgie pédiatrique, CHU Necker, PARIS

Pr ROZE Jean Christophe : PUPH, Service de néonatalogie, CHU Nantes

*Directeurs de thèse*

Dr NEUNLIST Michel, Directeur de Recherche INSERM U913, Nantes

Dr HELOURY Yves, Co-directeur de recherche, Université de MELBOURNE, Australie

# REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement :

Michel Neunlist de m'avoir accueillie, guidée et soutenue tout au long de ce travail. Vous avez accompagné la maturation et le développement de mon raisonnement scientifique, patiemment, mais énergiquement et avec une grande rigueur, recentrant les idées éparpillées de mon cerveau principal autour du second cerveau, objectif principal de cette thèse.

Yves Heloury d'avoir initié ma migration vers le laboratoire U913, organisé, soutenu et encadré les premiers pas de ce travail. Votre esprit visionnaire a su assurer la pérennité de cette entreprise malgré votre propre migration, me permettant de mener à son terme cette étude, je vous remercie de votre confiance.

Philippe Seksik et Laurent Misery d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail.

Sabine Sarnacki d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur d'être membre du jury. Vous avez guidé mes premiers pas sur les chemins tortueux de la recherche, qui nous ont rapproché lorsque je me suis éloignée.

Jean Christophe Roze d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur d'être membre du jury.

Rodolphe mon binôme, Laurianne, Raphael pour votre soutien au quotidien, puis à la semaine, et enfin plus sporadiquement, au laboratoire et en dehors. Merci pour ces soirées chaleureuses. Qui s'amuse bien, travaille bien, je vous souhaite une longue vie de recherche et surtout de découvertes.

Etienne pour ton efficacité et pour ton aide à la continuité de cette étude.

Philippe, Julien, Mandy, Thibaud, Tanguy, Anaïs, Naziha, Hind, Bernard, Margarida, Maddalena, Maxime, Sébastien, Pascal, Kalyane, Damien, François et toute l'équipe U913, pour vos conseils et votre soutien qui m'ont permis d'apprendre le

métier, de réaliser ce travail, de le compléter et de le mener à terme, et pour l'ambiance...

Sabine, Nathalie

Emmanuel Coron, Stanislas Bruley des Varannes, Jean Paul Galmiche, Arnaud Boureille qui m'offrez sur le tube digestif un point de vue tout à fait différent.

Caroline Linard pour ta présence, nos fous rires et ton soutien de périnée sans compromis. Et ta précieuse aide à la gestion du quotidien hospitalier.

Isabelle Germouty, chasseuse es-fautes d'orthographe, Catherine Le Rouzic, Bertrand Fenoll, Romain Pecquery, Pierre Neagoe, d'avoir accepté mes absences et soutenu ce travail jusqu'au bout. *L'éternité c'est long, surtout vers la fin (Woody Allen)*.

Tous les internes du service de chirurgie pédiatrique de Brest, de 2007 à nos jours, qui suppléent en permanence à mes absences, et permettent la continuité des soins lorsque je suis Nantaise.

L'équipe d'accueil 4685 pour son accueil.

Séverine Loisel et l'équipe de l'animalerie, qui a pris soin de mes ratons, de leurs mamans et de mon moral.

Pascale Marcoelles et toute son équipe de m'avoir apporté un petit coup de pouce local, juste quand je m'essoufflais.

Edith pour ton aide *sommaire* mais indispensable.

Tous les copains et les copines pour le soutien caféiné ou téléphonique. Stéphanie, Adeline, Frédérique, Lucile, Nathalie, Arnaud, Lucie, Béatrice... Et tous ceux que j'oublie.

Mes patients et leurs patients parents.



Phiphou : « ça fait un petit peu peur, quand même », de se retourner sur le passé, toutes ces aventures, de Paris à Brest, en passant par Langrune. Si j'en suis là, c'est sûrement de ta faute, d'avoir voulu jouer au Ping-pong avec des formules biochimiques, pour ne pas te laisser tout seul ! Bon, ben merci...

A papa, qui de loin suis de si près chacun de mes pas

A maman qui est si loin

A Aalderik, qui ne m'a jamais laissée tomber

A Yvette, pour l'intendance, la bonne humeur, ta présence chaleureuse et bienveillante, ton aide précieuse et indéfectible

A Lila et Victor, mes petits amours, ma vraie motivation

A Eric, mon Amour, cette thèse te revient autant qu'à moi. Ta présence à mes côtés a rendu mes absences moins pesantes. Sans ton soutien permanent et absolu, mille fois j'aurais laissé tomber. Et tellement plus que ça, tout le reste...

*Et quelques ratons... laveurs*

# SOMMAIRE

# SOMMAIRE

---

Liste des abréviations .....	9
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>10</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>14</b>
1. Trouble des fonctions digestives chez le nouveau-né et le prématuré.....	15
2. Description et développement du tube digestif et de ses fonctions	
2.1 <i>Le tube digestif</i> .....	16
2.1.1 <i>Embryologie</i> .....	17
2.1.2 <i>Anatomie descriptive</i> .....	18
2.1.3 <i>Histologie</i> .....	22
2.1.4 <i>Fonctions du tube digestif</i> .....	24
2.2 <i>Le Système Nerveux Entérique (SNE)</i> .....	27
2.2.1 <i>Découverte du SNE</i> .....	27
2.2.2 <i>Anatomie du SNE</i> .....	28
2.2.3 <i>Développement et colonisation du SNE</i> .....	32
2.2.4 <i>Chronologie du développement du SNE</i> .....	37
2.2.5 <i>Histologie du SNE</i> .....	40
2.2.6 <i>Neuromédiateurs du SNE</i> .....	42
2.3 <i>Contrôle de la motricité colique par le SNE</i> .....	44
2.4 <i>Contrôle de la perméabilité intestinale par le SNE</i> .....	47
3. Facteurs intervenants dans la maturation du tube digestif et de ses fonctions .....	48
3.1 <i>Le microbiote</i> .....	48
3.1.1 <i>Définition</i> .....	48
3.1.2 <i>Mise en place du microbiote chez le nouveau-né</i> .....	48
3.1.3 <i>Fermentation bactérienne</i> .....	50
3.1.4 <i>Rôle du microbiote dans la mise en place des fonctions digestives</i> .....	51
3.2 <i>Le butyrate en physiologie digestive</i> .....	53
3.2.1 <i>Rôle du butyrate sur les fonctions de barrière du tube digestif</i> .....	53

3.2.2 Rôle du butyrate sur les fonctions motrices digestives .....	55
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> .....	<b>57</b>
<b>PUBLICATIONS</b> .....	<b>59</b>
Article 1 : Maturation postnatale du phénotype neurochimique du plexus myentérique et corrélation avec l'évolution de la réponse motrice colique chez le raton nouveau-né .....	60
Article 2 : Les lavements de butyrate chez le raton nouveau-né accélèrent le développement phénotypique cholinergique et nitreurgique du plexus myentérique et le transmission neuromusculaire.....	72
Article 3 : L'antibiothérapie néonatale induit des dysfonctions de la barrière intestinale chez le raton (article en cours de rédaction).....	83
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>101</b>
<b>ANNEXE</b> .....	<b>108</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>112</b>

# LISTE DES ABREVIATIONS

# Liste des abréviations

---

**5-HT** : sérotonine  
**ACh** : Acétyl Choline  
**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**AGCC** : Acides Gras à Chaines Courtes  
**AH** : After Hyperpolarisation  
**Alpha-SMA** : Alpha Smooth Muscle Actin  
**ATP** : Adénosine TriPhosphate  
**BEI** : Barrière Epithéliale Intestinale  
**CGE** : Cellules Gliales Entériques  
**CGRP** : Calcitonin Gene-Related Peptide  
**ChAT** : AcétylCholine Transférase  
**CIC** : Cellules Interstitielles de Cajal  
**CMM** : **MMC** : Complexe Moteur Migrant  
**CMMC** : Complexe Moteur Migrant Colique  
**CCN** : Cellules de la Crête Neurale  
**DCC** : Deleted in Colorectal Cancer  
**EDN3** : Endothelin-3  
**EDNRB** : Endothelin Receptor type B  
**EFS** : Stimulation Electrique  
**ENCC** : Cellules Entériques Dérivées de la Crête Neurale.  
**EPAN** : Neurones Afférents Extrinsèques Primaires  
**FG** : Fore Gut  
**FOS** : Fructo-OligoSaccharides  
**GALT** : Gut-Associated Lymphoid Tissue  
**GFR $\alpha$ 1** : GDNF family receptor alpha 1  
**GFAP** : Glial Fibrillary Acidic Protein  
**GDNF** : Glial-Derived Neurotrophic Factor  
**HDAC** : Histones-DésAcétylase  
**HG** : Hind Gut  
**IgA** : Immunoglobuline A  
**IPAN** : Neurones Afférents Intrinsèques Primaires  
**LPS** : LipoPolySaccharide  
**MG** : Mid Gut  
**MP** : Plexus Myentérique  
**NO** : Nitric Oxyde  
**NOS** : Nitric Oxyde Synthase  
**PA** : potentiel d'action  
**S** : neurones de type Synaptic  
**SA** : Semaine d'Aménorrhée  
**SMP** : Plexus Sous Muqueux  
**SNC** : Système Nerveux Central  
**SNE** : Système Nerveux Entérique  
**SOM** : SOMatostatine  
**SOX-10** : SRY (sex determining)-box containing gene 10  
**SP** : Substance P  
**PCGRP** : Pro-Calcitonin Gene-Related Peptide  
**TD** : Tube Digestif  
**TTX** : TétrodoToXine  
**VIP** : VasoIntestinal Peptide

# INTRODUCTION

*« Le nouveau-né humain est à l'évidence complètement immature, bien plus que celui des autres primates du même âge. Tout suggère qu'il est né bien avant le terme normal pour cette espèce. On a pu estimer que la gestation d'un singe de notre taille et de nos caractéristiques serait vraisemblablement de l'ordre de douze mois. Il semble que la nôtre se soit raccourcie, donnant naissance à un enfant qui est dans ses premiers mois un fœtus inachevé. »* La fabrique de l'homme. Jean-Paul Levy.

La période périnatale est un moment clé de la vie de tout organisme vivant. L'organisme jusqu'alors immergé dans l'utérus maternel ou son milieu nutritif, doit s'adapter à une nouvelle forme de vie aérobie, et est soumis en quelques instants à l'influence de facteurs environnementaux multiples. Toutes les fonctions vitales vont subir des métamorphoses et devoir s'adapter à de nouvelles conditions. Le tube digestif, en particulier, va présenter une maturation postnatale permettant à l'enfant d'abord allaité et très dépendant de sa mère, de se diversifier et de s'autonomiser. Cette immaturité, constitutionnelle chez les espèces altriciales<sup>\*</sup>, est exacerbée chez l'enfant né prématurément (<35SA), dont l'adaptation à la vie extra utérine pose de nombreux problèmes de prise en charge. L'hospitalisation est alors nécessaire, et est souvent compliquée de troubles digestifs rudimentaires, à type de ralentissement du transit, retardant de quelques jours la mise en place d'une alimentation normale, ou complexes, dont l'entérocolite ulcéro-nécrosante est la forme la plus grave. La morbidité et la mortalité des enfants prématurés sont devenus un enjeu de santé publique, à la fois par l'augmentation de l'incidence des accouchements avant terme, et aussi par l'amélioration de la prise en charge en réanimation permettant la survie d'enfants grands prématurés et hypotrophes. Cette prise en charge nécessite le recours à des moyens de haute technicité non dénués de complications, dont les troubles du transit sont souvent pourvoyeurs en retardant l'autonomisation alimentaire. En particulier, le recours à une alimentation parentérale augmente le risque de complications infectieuses nosocomiales, et de cirrhose hépatique souvent fatale.

Parmi les fonctions du tube digestif en cause dans l'apparition de ces désordres intestinaux, la motricité et l'action protectrice de la barrière intestinale jouent certainement un rôle capital. Ces fonctions continuent leur maturation après la naissance (Berseth 1996). Des études chez la souris ont montré le développement de la motricité et en particulier du complexe moteur migrant, dans les jours qui suivent la naissance (Roberts, Murphy et al. 2007). D'autres fonctions, telle que la réponse immunitaire digestive, ainsi que la barrière

---

<sup>\*</sup> **ALTRICIAL** : Se dit des jeunes vertébrés qui ont besoin des soins de leurs parents après la naissance



épithéliale intestinale, subissent différentes étapes de maturation post-natale conduisant au développement et à l'acquisition de la tolérance (Bailey and Haverson 2006).

L'ensemble de ces fonctions du tube digestif est régulé par différents systèmes humoraux et nerveux. En particulier, la complexité des fonctions digestives a nécessité, d'un point de vue évolutionnaire, le développement de son propre système nerveux intégré en son sein, i.e. le système nerveux entérique (SNE) (Schemann and Neunlist 2004). Bien que ce système nerveux soit en relation avec le SNC via son innervation sympathique et parasympathique, il est un système nerveux intégratif, composé de 2 plexus principaux, myentérique et sous muqueux. Les neurones myentériques contrôlent plus particulièrement la motricité et le péristaltisme (Kunze and Furness 1999) tandis que les neurones sous muqueux sont plus impliqués dans le contrôle des fonctions d'absorption et de protection (Neunlist, Van Landeghem et al. 2012). L'importance du rôle du SNE dans la régulation des fonctions digestives est illustrée par le fait que de nombreuses pathologies digestives sont associées ou dues à des lésions du SNE. En effet, chez le nouveau-né, les atteintes du SNE jouent un rôle central dans des pathologies motrices. Ceci est illustré clairement dans la maladie de Hirschsprung (Heanue and Pachnis 2007; Roberts, Bornstein et al. 2008), mais aussi dans d'autres pathologies motrices telles le laparoschisis (Santos, Tannuri et al. 2003), ou encore l'atrésie du grêle (Khen, Jaubert et al. 2004; Khen et al. in press)

En outre, le tube digestif est aussi soumis à l'influence de différents facteurs environnementaux extérieurs à notre organisme. Cette exposition est particulièrement importante lors de la naissance quand notre tube digestif passe d'une situation « stérile » à une situation « contaminée », et dont la flore est sous l'effet de nombreux facteurs, qu'ils soient le mode d'accouchement, l'environnement du lieu de naissance, le type d'alimentation et l'administration de médicaments. Chacun de ces facteurs socioculturels peuvent impacter le développement du SNE et des fonctions digestives. Par ailleurs, les patients nés prématurément et nécessitant de longues hospitalisations sont sujets à de multiples risques infectieux, qu'ils soient liés à l'immaturité du patient ou nosocomiaux. Dès lors le recours à une antibiothérapie est nécessaire, or ces molécules peuvent elles-mêmes être à l'origine de perturbation de la flore intestinale.

Parmi les facteurs extrinsèques influençant le développement du tube digestif, l'alimentation et le microbiote sont les plus étudiés. De manière intéressante ces facteurs sont incriminés non seulement dans le développement à court terme du tube digestif mais sont

aussi capables d'induire une empreinte nutritionnelle à long terme, bénéfique ou délétère, qui pourrait être, dans ce dernier cas, à l'origine du développement de pathologies chroniques ou se déclarant à distance de la naissance. Par exemple, l'alimentation, comme le choix d'un allaitement maternel ou d'un lait maternisé, est actuellement incriminée. Ainsi, chez le cochon, une alimentation maternelle riche en acides gras polyinsaturés modifie le développement de la régulation par le SNE de la perméabilité intestinale du porcelet, sans qu'un effet rémanent ait été démontré (De Quelen, Chevalier et al. 2010). Parallèlement, le microbiote est impliqué dans la survenue de nombreuses pathologies digestives, en particulier inflammatoires (Sokol and Seksik, 2010).

Dans ce contexte scientifique, suggérant un rôle central de la période postnatale dans le développement du tube digestif à court terme (enfance-adolescence), mais aussi de ses conséquences à long terme sur son fonctionnement, il est important de mieux caractériser le développement physiologique du SNE et ses répercussions fonctionnelles sur les fonctions digestives. En outre, l'identification de facteurs environnementaux, en particulier d'origine nutritionnelle, capables de moduler ce développement, reste aussi à approfondir.

Ces connaissances pourront initier des travaux ultérieurs, afin de mieux appréhender l'impact d'agents stressants environnementaux durant cette période, et leurs conséquences à long terme sur le SNE et sur les fonctions digestives. En particulier, il est de plus en plus reconnu que l'antibiothérapie chez le nouveau-né est à haut risque d'entraîner des pathologies ultérieures. Or, en raison de la sensibilité du nourrisson aux infections, les antibiotiques sont les médicaments les plus utilisés en période néonatale. Néanmoins, les conséquences de ces traitements sur les fonctions digestives et sur le SNE, ainsi que sur la susceptibilité à développer des pathologies inflammatoires restent inconnues.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette première partie se divise en quatre grands thèmes. Après avoir décrit les troubles digestifs des enfants prématurés, nous détaillerons le tube digestif et son système nerveux d'un point de vue descriptif : embryologie, histologie, anatomie, physiologie et fonctions. Ensuite, nous exposerons le rôle du système nerveux entérique dans le contrôle de la motricité et de la perméabilité colique. Enfin, nous décrirons les facteurs exogènes qui influencent ces fonctions, et surtout la mise en place des fonctions intestinales dans les premiers jours de vie extra-utérine.

# **1 Troubles des fonctions digestives chez le nouveau-né et le prématuré**

Le nouveau-né humain naît à 41,5 semaines d'aménorrhée (SA). La prématurité se définit par une naissance avant la fin de la 36<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée révolue et représente un problème de santé publique. En effet, l'incidence de la prématurité en France aurait augmenté de 25 % depuis 1995 selon l'AUDIPOG (réseau sentinelle des maternités françaises). Elle toucherait 50 000 nouveau-nés par an, soit 7% des naissances. L'incidence des complications est inversement proportionnelle au terme et au poids de naissance (Wen, Smith et al. 2004; Robertson, Watt et al. 2009 ). L'extrême prématuré (né avant 28 SA) et le prématuré hypotrophe (poids de naissance de moins de 1 000 g), sont particulièrement à risque de complications. Tous les appareils et leurs fonctions sont immatures : le système cardio-respiratoire garde une vascularisation fœtale et son canal artériel reste perméable. Le poumon poursuit son développement alvéolaire et présente un défaut de synthèse du surfactant. Le système nerveux central présente une fragilité importante des capillaires, source d'hémorragie intra-ventriculaire et de leucomalacie péri-ventriculaire.

Et, bien sûr, le tube digestif présente une immaturité globale et sa fonction principale, la motricité, est défaillante. Dans la partie supérieure du tube digestif, les troubles de synchronisation des phénomènes de succion-déglutition et la gastroparésie expliquent les difficultés à établir une alimentation orale (Ramirez, Wong et al. 2006; Bingham 2009 ). Dans la partie basse du tube digestif, l'hypomotilité globale se traduit cliniquement par un iléus fonctionnel, le retard d'émission du méconium et l'augmentation du temps de transit (Amodio, Berdon et al. 1986; Arnoldi, Leva et al.). La stase digestive, et la pullulation microbienne qui en découle, représentent des facteurs prédisposant à l'entérocolite ulcéro-

nécrosante. A cela s'ajoute également une immaturité du rôle de barrière et du système de défense du tube digestif. L'intolérance alimentaire retarde la mise en place d'une alimentation entérale compatible avec un développement adéquat de l'enfant (Moore and Wilson, 2011). Il en résulte la nécessité de mettre en place une nutrition parentérale prolongée dont la morbidité propre reste importante : troubles métaboliques, hépatopathie, septicémie.

Chez le nouveau-né à terme, l'immaturité digestive est encore présente, comme le montrent les nombreuses pathologies se traduisant par une symptomatologie digestive transitoire : l'hypothyroïdie, la mucoviscidose, les infections materno-fœtales, les accouchements difficiles ou les souffrances néonatales ischémiques, ainsi que le microcolon gauche lié au diabète maternel.

Par ailleurs, toujours chez le nouveau-né à terme, le rôle du SNE a été objectivé dans plusieurs pathologies digestives organiques (Newgreen and Young, 2002). La plus étudiée est sans doute la maladie de Hirschsprung, où l'interruption de la colonisation du tube digestif par le SNE entraîne une hypertonie d'aval. Dans l'atrésie intestinale, il a également été montré un retard de maturation du SNE qui pourrait expliquer le délai observé avant la reprise du transit après le rétablissement de la continuité digestive (Khen *et al.* 2004). L'implication du SNE dans les troubles moteurs du laparoschisis a été étudiée par MM Santos. Dans cette pathologie, où l'absence de fermeture de la paroi intestinale entraîne une extériorisation du tube digestif dans le liquide amniotique durant toute la grossesse, l'hypomotilité intestinale post-opératoire est liée à une immaturité des neurones intestinaux (Santos, Tannuri *et al.* 2003).

## **2 Description et développement du tube digestif et de ses fonctions**

### **2.1 Le tube digestif**

L'appareil digestif est l'ensemble des organes et des fonctions qui permettent de transformer les aliments en substances utilisables. Il est composé d'un tube : cavité buccale, œsophage, estomac, duodénum, intestins, colon et rectum ainsi que d'organes associés : glandes salivaires, foie, pancréas et vésicule biliaire. Ses fonctions sont multiples : propulsion, digestion, sécrétion, absorption, protection.

### 2.1.1 Embryologie

Le développement du tube digestif humain se fait en trois étapes : 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> délimitations, et croissance en espace restreint.

Jusqu'à la quatrième semaine de gestation, les cellules s'organisent en un disque embryonnaire plat tridermique.

Dès lors, les trois feuillets (mésoderme, endoderme et ectoderme) se différencient pour constituer les ébauches des différents appareils organiques. Dans le même temps, le disque embryonnaire subit un enroulement qui transforme le disque plat en une structure à trois dimensions.

L'enroulement commence au 22<sup>ème</sup> jour dans les régions céphalique et latérales de l'embryon et affecte la région caudale au 23<sup>ème</sup> jour. La lécithocèle (future lumière intestinale) semble s'invaginer, englobée dans les structures environnantes qui poussent en s'enroulant autour.

Au terme de cette modification, les bords céphalique, latéraux et caudal du disque embryonnaire se rapprochent les uns des autres, sur la ligne médio ventrale. Les feuillets entoblastique, mésoblastique et endoblastique du disque embryonnaire fusionnent avec leurs homologues controlatéraux, donnant naissance à un être en trois dimensions.

L'invagination à l'intérieur de l'embryon d'une partie de la lécithocèle forme l'intestin primitif et laisse dans les annexes embryonnaires la vésicule vitelline reliée par le canal vitellin. C'est la première délimitation.

L'intestin primitif est constitué d'une partie antérieure (craniale), moyenne, et postérieure (caudale). Par convention, les intestins antérieur, moyen et postérieur sont individualisés sur la base de leur apport artériel.

**L'intestin antérieur** forme la portion de l'intestin pharyngien jusqu'au duodénum. Le foie, les voies biliaires et le pancréas ont la même origine craniale et sont vascularisés par le tronc cœliaque.

**L'intestin moyen** s'allonge rapidement, plus rapidement que ne grandit la cavité abdominale. Il réalise un pli dorso-ventral, en épingle à cheveux, appelé anse intestinale primitive. Le sommet de cette anse est attaché via le canal vitellin à la vésicule vitelline, qui

s'oblitére à la 5<sup>ème</sup> semaine. Il sera à l'origine des différentes portions intestinales du 3<sup>ème</sup> duodénum au colon transverse. Sa vascularisation est mésentérique supérieure. De la 6<sup>ème</sup> à la 10<sup>ème</sup> semaine, l'intestin moyen se développe presque entièrement en dehors de la cavité abdominale, dans le cœlome du cordon : c'est la hernie physiologique, à droite des éléments vasculaires. A la 10<sup>ème</sup> semaine, survient la deuxième délimitation qui réintègre l'intestin dans la cavité abdominale. Le mécanisme à l'origine de cette réintégration est inconnu, mais il pourrait résulter de l'accroissement relatif de la cavité abdominale car il survient au moment où la croissance du foie et des reins ralentit, et probablement au moment de la fermeture des ceintures à la 8<sup>ème</sup> semaine qui amène les grands droits sur la ligne médiane. La poursuite de la croissance en espace restreint conduit alors à la mise en place du mésentère dans sa disposition adulte.

**L'intestin postérieur** s'étend du tiers distal du colon transverse jusqu'aux deux tiers supérieurs de l'anus. Il est vascularisé par l'artère mésentérique inférieure, ou caudale. La partie terminale débouche sur la membrane cloacale qui s'ouvre à 9 semaines. La maturation sphinctérienne anale, ou la formation du méconium pourraient expliquer dans un deuxième temps l'absence d'extériorisation du contenu digestif au delà de 18 semaines.

La disposition anatomique du mésentère adulte présente un duodénum en cadre antihoraire, autour du pancréas, et un colon en cadre horaire, avec le caecum en fosse iliaque droite. Cette disposition était auparavant mise sur le compte de multiples rotations autour de l'axe vasculaire (Tuchmann-Duplessis H, 2005). De récentes observations suggèrent que la réintégration de l'anse primitive, dans une cavité abdominale en restriction de volume, force le croisement du caecum devant le duodénum en croissance. Le méso primitif unique et continu s'en trouve obligatoirement replié, en différents segments (mésentère et mésocôlon) en position finale (Grange G 2012).

Dés lors, l'intestin a réintégré entièrement la cavité abdominale, au prix d'une adaptation qui modifie complètement son orientation initiale. Certaines portions se rapprochent de la paroi abdominale postérieure, par la présence de méso plus ou moins longs.

### **2.1.2 Anatomie descriptive**

L'appareil digestif est composé des éléments de la cavité buccale, du tube digestif et des glandes annexes.

La cavité buccale comprend les lèvres, les dents, la langue et le pharynx.

Le tube digestif à proprement parler comprend l'œsophage, l'estomac et les intestins. L'intestin grêle a trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le gros intestin est également divisé en trois parties : le caecum et son appendice, le côlon (ascendant, transverse, descendant et sigmoïde) et le rectum se terminant par l'anus.

Les glandes annexes comprennent les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas.

L'anatomie et la répartition de ces organes varient d'une espèce animale à l'autre, par exemple, certains animaux ont des estomacs à plusieurs chambres. Nous détaillerons uniquement ici celui de l'homme, qui nous intéresse en premier lieu et celui du rat, chez qui ont été réalisées les expérimentations de cette thèse.

#### - **Le tube digestif de l'homme**

L'ensemble du tube digestif, excepté l'œsophage, est situé dans l'abdomen. (Figure 1)

L'estomac, sous la coupole diaphragmatique gauche, est en forme de J. Délimité par le cardia, qui le sépare de l'œsophage en amont, et le pylore en aval, il forme une poche recevant les aliments mâchés. Il peut contenir jusqu'à 4 litres.

Le duodénum est la première portion de l'intestin grêle. Situé sous et en arrière du foie, il est fixé à la paroi postérieure de l'abdomen et encadre le pancréas. Sa deuxième portion reçoit les canaux biliaires et pancréatiques.

L'angle de Treitz fait la jonction entre le duodénum et le jéjunum. En règle générale, il est situé sous l'estomac, à gauche de la colonne vertébrale, et traverse le méso-colon.

Le jéjunum et l'iléon semblent libres dans l'abdomen, depuis l'angle de Treitz jusqu'à la valvule iléo-caecale, reliés à la paroi postérieure par un méso lâche. Ils mesurent, chez l'homme adulte entre 2 et 8 mètres.

La valvule iléo-caecale ou valve de Bauhin s'abouche à la face interne du caecum, en fosse iliaque droite. Formée d'une fente entre deux valves, elle a pour rôle principal d'empêcher le contenu colique de retourner dans l'iléon.

La distance entre l'angle de Treitz et la valvule iléo-caecale, représente la racine mésentérique. C'est l'éloignement de ces deux points d'attache qui assure la stabilité de



l'intestin humain. Leur position respective peut varier, représentant les différentes positions de mésentère incomplet.

Enfin, le colon est disposé en cadre dans la cavité abdominale. Il mesure environ 1,5 mètre, et passe en avant des structures digestives précédemment décrites, à l'exception du rectum. Certaines de ses parties semblent fixées par un méso plus court. C'est le cas du colon ascendant, de l'angle droit, l'angle gauche, et du colon descendant. Le caecum, le colon transverse et le sigmoïde présentent des méso lâches. Le colon transverse et son méso séparent la cavité abdominale en étage sus-mésocolique (au dessus), et sous-mésocolique (en dessous).

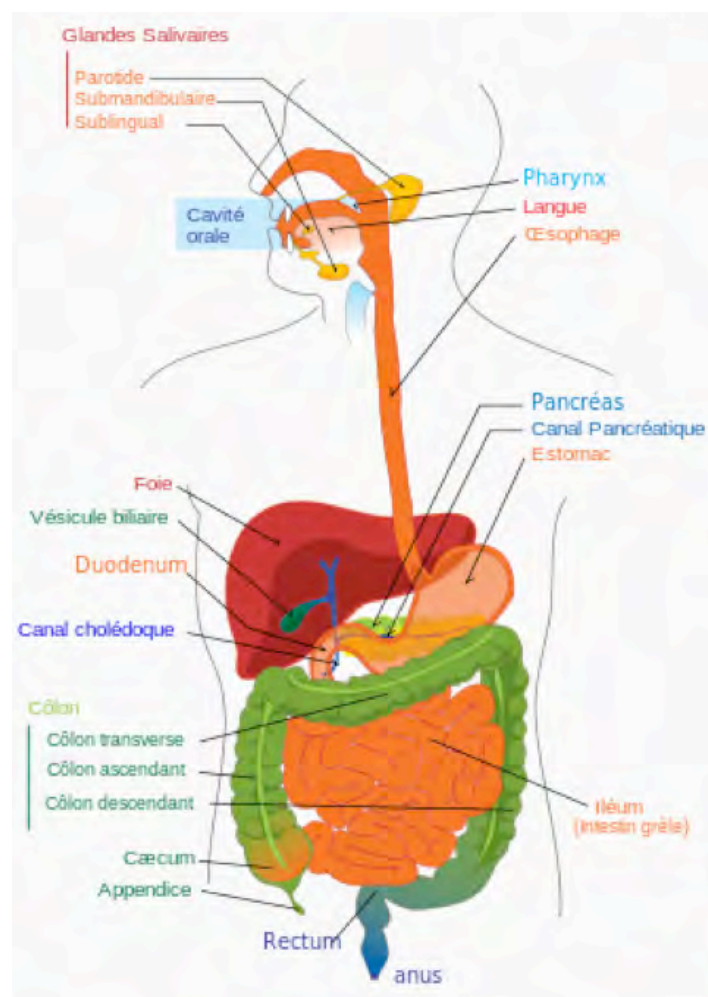


Figure 1 : Anatomie du tube digestif humain

## - Le tube digestif du rat

Le système digestif du rat comprend les mêmes structures que celui de l'homme, à l'exception de la vésicule biliaire. Il a les mêmes fonctions. Nous ne détaillerons que les différences descriptives majeures. (Figures 2 et 3)

Le duodénum, est placé à droite de l'estomac, et descend verticalement, presque droit. Les voies biliaires et pancréatiques s'y abouchent. L'absence de vésicule biliaire, et donc de réservoir, est à rapprocher des habitudes alimentaires de ce rongeur qui mange peu mais fréquemment.

Les intestins sont disposés en position de mésentère commun, il n'y a pas de compartimentation de l'abdomen par le méso-colon.

Le plus notable est le caecum, c'est un organe à part entière, volumineux, et non vestigial, comme chez l'homme. L'iléon y débouche à angle droit. Les aliments non encore digérés à ce niveau s'y accumulent et y subissent une fermentation grâce aux micro-organismes, qui permettent à l'animal de digérer la cellulose.

Le colon part du caecum, son diamètre est peu différent de celui du grêle. La partie postérieure se reconnaît aux matières en formation. On distingue uniquement le côlon proximal, et le colon distal, qui ne sont pas séparés par une structure individualisable.

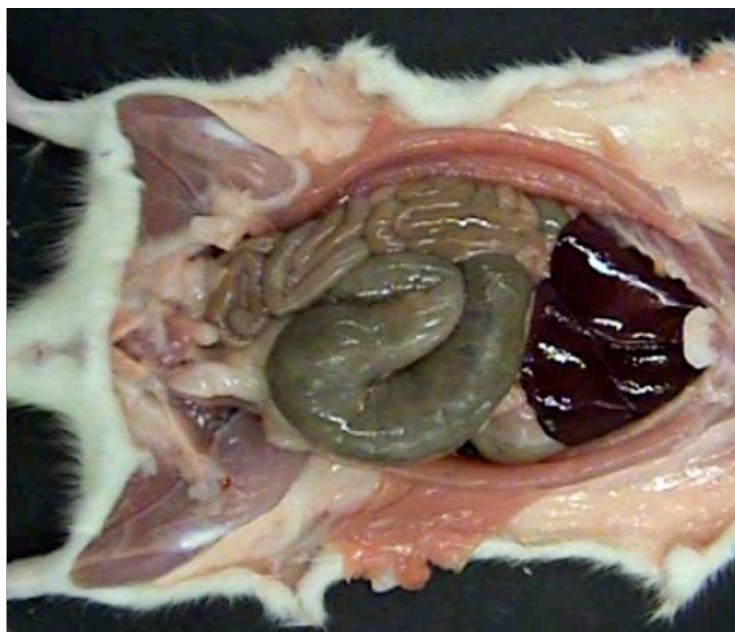


Figure 2 : Appareil digestif du rat in situ : Photos de J.P. Airoldi © 2006

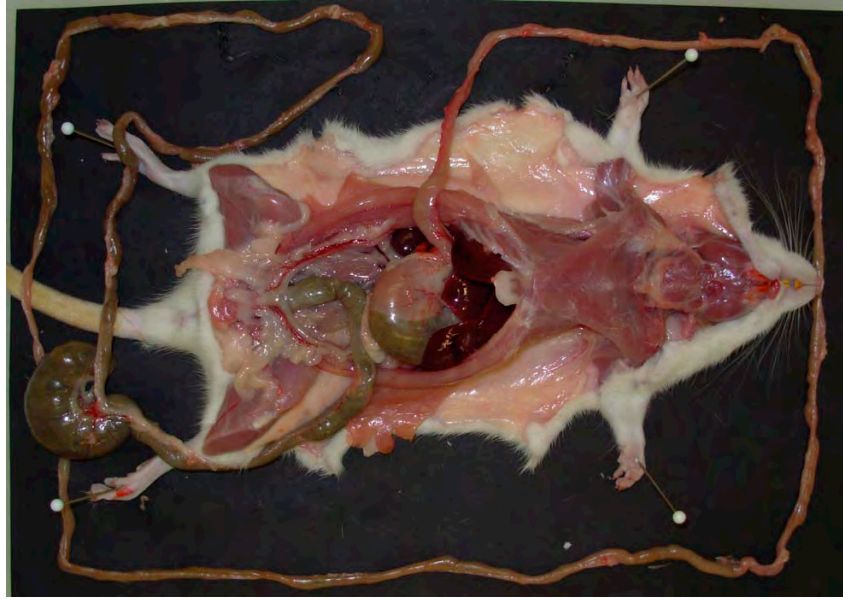


Figure 3 : Appareil digestif étalé : Longueur du corps du rat, (sans la queue) : 21 cm, longueur du tube digestif : 150 cm : Photos de J.P. Airolodi © 2006

### 2.1.3 Histologie

D'après l'atlas d'histologie fonctionnelle de Weather (Young B 2006).

Le tractus gastro-intestinal présente des caractéristiques structurales communes de l'œsophage à l'anus. Il se présente sous la forme d'un cylindre musculaire tapissé d'une muqueuse.

Il est constitué de 4 couches fonctionnelles distinctes :

La **muqueuse** comprend un épithélium, le chorion encore appelé lamina propria (couche de tissu conjonctif de soutien), et la musculaire muqueuse, fine couche de muscle lisse, responsable des mouvements locaux et des replis de la muqueuse. En 4 points du tractus digestif, la muqueuse subit une transition structurale brutale : aux jonctions œsogastrique, gastroduodénale, iléocœcale et anorectale. L'épithélium est polarisé et constitué d'une monocouche de cellules. Un pool de cellules pluripotentes présent au niveau des cryptes se différencie en 4 types cellulaires résumés dans la figure 4.

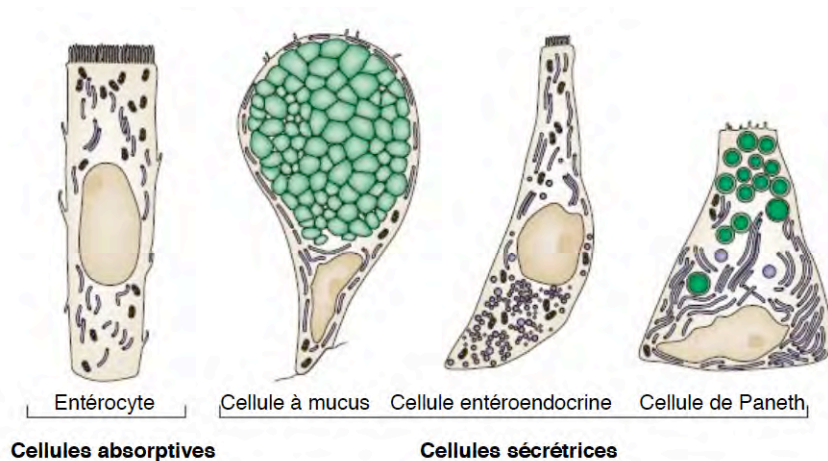


Figure 4 : Les cellules différenciées de l'intestin grêle : Les cellules souches intestinales donnent naissance à quatre types cellulaires différenciés. Les cellules absorbatives, ou entérocytes, sont majoritaires. Les cellules sécrétrices, à mucus, entéro-endocrines et de Paneth, migrent au fond des cryptes et sont absentes dans le côlon.

La **sous muqueuse** est constituée de tissu collagène lâche. Elle soutient la muqueuse et contient de gros vaisseaux sanguins, des lymphatiques et des nerfs.

La **musculeuse**, réelle paroi musculaire, est constituée de muscles lisses, disposés en une couche circulaire interne, et une couche longitudinale externe. Ces deux couches perpendiculaires entre elles, sont responsables de la contraction péristaltique.

L'**adventice** est une couche externe conjonctive lâche, qui forme le tissu de soutien des gros vaisseaux et des nerfs. Elle contient une quantité variable de tissu adipeux. Dans la cavité péritonéale, l'adventice se confond avec la séreuse, et est revêtue d'un épithélium pavimenteux. Ailleurs, l'adventice se confond avec les tissus rétro-péritonéaux.

Si la disposition des couches principales reste relativement constante tout au long du tube digestif, il existe quelques variations en fonction de la localisation.

Dans le colon, plus particulièrement étudié au cours de ce travail de thèse, les fonctions principales de la muqueuse sont l'absorption d'électrolytes et la protection. De ce fait, la muqueuse se présente sous forme de **glandes** tubulaires droites ou **cryptes**, serrées les unes contre les autres. La muqueuse présente des replis à l'état relâché, mais ne forme pas de plis circulaires distincts comme dans l'intestin grêle. Les glandes sont revêtues de cellules absorbantes spécialisées dans l'absorption de l'eau et de cellules caliciformes mucosécrétantes, sécrétant du mucus lubrifiant le passage des fèces. Au fur et à mesure que les fèces progressent dans le tube digestif, en se déshydratant, le mucus devient plus abondant afin de protéger la muqueuse des traumatismes. La musculaire muqueuse est une structure

importante dans le colon. Elle présente des contractions rythmiques qui empêchent l'obstruction des glandes et accélèrent l'expulsion du mucus.

La paroi musculaire colique quand à elle, est relativement épaisse, et capable d'une activité péristaltique puissante. Comme dans le reste du tractus, elle est constituée d'une couche circulaire interne et d'une couche longitudinale externe. Chez l'homme, la couche longitudinale externe est formée de trois bandes longitudinales séparées, appelées *taenia coli*.

#### **2.1.4 Fonctions du tube digestif**

Le tube digestif permet à l'organisme d'assimiler des aliments afin d'assurer un apport hydrique, nutritif et énergétique permanent. Pour cela, il doit propulser les aliments, les dégrader en nutriments, les absorber, tout en maintenant un équilibre hydro-électrolytique et en assurant la défense de l'organisme contre les éléments agressifs (d'après Physiologie Humaine de Sherwood 2006).

Il présente donc classiquement cinq fonctions principales, lui permettant de mener à bien ses missions : la motricité, la sécrétion, la digestion, l'absorption et la protection (ou réponse immune).

La **motricité** résulte de l'action des muscles lisses. Elle comporte trois variétés principales : la segmentation ou brassage, la propulsion et le complexe moteur migrant (MMC) (Furness 2012).

La *segmentation*, qui est la principale modalité de motilité pendant le repas, mélange et propulse lentement le chyme. Elle consiste en contractions annulaires, oscillantes, du muscle lisse circulaire tout le long de l'intestin grêle. Les régions relâchées, situées entre les anneaux de contraction, contiennent une petite quantité de chyme. Les anneaux de contraction sont distants de quelques centimètres et donnent à l'intestin grêle l'apparence d'un chapelet. Ils ne progressent pas le long de celui-ci comme une onde péristaltique : à la différence de celle-ci, les segments contractés se relâchent et les segments antérieurement relâchés se contractent. De ce fait, le chyme contenu dans les segments initialement au repos est poussé dans les deux sens : oral et anal. L'alternance de contraction et de relâchement recommence, de sorte que le chyme est fragmenté, malaxé et bien mélangé. Ceci permet d'une part de mélanger les aliments aux sucs digestifs, et d'autre part, d'améliorer l'absorption en favorisant le contact intime entre le contenu et la surface absorbante. La vitesse de

progression est adaptée au rôle du segment digestif. Ainsi dans l'œsophage, qui permet la traversée du thorax, la progression est plus rapide que dans l'intestin grêle qui absorbe.

La *propulsion* assure la propagation des aliments le long du tube digestif dans le sens oral et anal.

Le *complexe moteur migrant* (CMM) est une succession de faibles contractions péristaltiques qui progressent sur une courte distance le long de l'intestin avant de s'effacer. Elles commencent à l'estomac et migrent dans le sens aboral, le long de l'intestin, c'est à dire que chaque nouvelle onde péristaltique commence un peu en aval de la précédente. Le CMM parcourt l'intestin grêle en 100 à 150 mn et s'arrête à l'extrémité de l'iléon. Une fois celle-ci atteinte, le cycle recommence et ceci jusqu'au repas suivant, chez l'humain approximativement toutes les 90 mn. Son rôle semblerait être la vidange de l'intestin après que le repas a été digéré, éliminant les résidus non digérés, les cellules épithéliales, le mucus, et réduisant ainsi le risque d'accumulation et de pullulation bactérienne dans l'intestin grêle (Vantrappen, Janssens et al. 1977).

Chez les animaux qui s'alimentent occasionnellement, comme l'homme et le chien, la segmentation et la propulsion ont lieu durant les « repas » et les CMM entre les phases de digestion. Chez les animaux qui s'alimentent en permanence, comme le rat ou le mouton, les CMM se produisent également pendant les phases de digestions (Kunze, Clerc et al. 1999).

La motricité du colon, fait également intervenir la segmentation et la propulsion. La présence de complexe moteur migrant colique (CMMC) a été retrouvée chez la souris et le cochon d'Inde. Sa présence chez l'homme reste controversée (Heredia, Dickson et al. 2009).

La **sécrétion** est assurée tout au long du tube digestif par les glandes exocrines. Elle commence dès la bouche, grâce aux glandes salivaires, et se poursuit dans l'estomac et les intestins, par l'intermédiaire des sécrétions gastriques, pancréatiques, biliaires et intestinales. Elle réalise de nombreux échanges hydriques et électrolytiques (Na, K, Cl, HCO<sub>3</sub>...). Mais elle permet également la fabrication des substances organiques indispensables aux différentes fonctions : les enzymes (assurant la digestion), le mucus (protégeant les cellules épithéliales), les immunoglobulines (en particulier les IgA), les facteurs de croissances (assurant le renouvellement cellulaire du tube digestif), les acides biliaires et la bilirubine, les phospholipides et le cholestérol.

La **digestion** siège principalement dans l'intestin grêle. Elle débute dès la bouche grâce à la mastication et à la salive, et se poursuit dans l'intestin. Il existe trois niveaux de digestion :

- Intraluminal, sous la dépendance des enzymes salivaires, gastriques et pancréatiques
- Membranaire : via la bordure en brosse des entérocytes. Elle fait également intervenir des enzymes digestives
- Intra-entérocytaire

Les grosses molécules ingérées sont converties par étapes successives en petites molécules absorbables au cours de la progression des aliments dans le tube digestif : les glucides en monosaccharides, les protéines en acides aminés, et enfin les lipides en acides gras libres et mono glycérides.

L'**absorption** des nutriments se situe essentiellement dans l'intestin grêle, celle de l'eau a lieu essentiellement dans le côlon. La totalité des produits de la digestion des glucides, des lipides et des protéines, ainsi que les électrolytes, les vitamines et l'eau sont absorbés par l'intestin grêle. Cependant l'absorption est souvent achevée avant l'iléon terminal.

Seule celle du fer et du calcium est ajustée au besoin de l'organisme : ainsi, plus il y a d'aliments ingérés, plus il en sera digéré et absorbé.

L'absorption résulte de flux permanents et abondants d'eau et de substances dissoutes, de la lumière digestive vers le milieu extracellulaire, et inversement, permettant la régulation du milieu intérieur. L'absorption para-cellulaire est faible. L'essentiel de l'absorption se fait à travers les cellules, par pinocytose, par diffusion passive ou via des transporteurs. Les transporteurs font intervenir des phénomènes actifs, nécessitant de l'énergie, ou la diffusion facilitée, indépendante de l'énergie.

Le tube digestif a également un rôle **protecteur**. La barrière intestinale est soumise en permanence à des agressions chimiques, mécaniques et infectieuses. Plusieurs facteurs intriqués assurent ce rôle :

- le renouvellement et l'homéostasie de la barrière intestinale : l'épithélium est remplacé intégralement tous les 4 à 5 jours chez l'homme. Environ 10 milliards de cellules sont produites chaque jour (Bullen, Forrest et al. 2006).
- La production de salive, l'acidité gastrique et la fabrication des substances organiques et des enzymes contribuent à l'extermination de nombreux agents pathogènes
- Le système GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) comprend les plaques de Peyer, l'appendice, des nodules lymphoïdes isolés, des cellules lymphoïdes isolées, des IgA sécrétoires (Nagler-Anderson 2001).
- Le microbiote, système symbiotique contribue également à la protection de l'organisme, par un phénomène de compétition entre les agents microbiens « bénéfiques » et les agents microbiens « pathogènes ». Ce sujet fera l'objet d'un chapitre à part entière.

Toutes les fonctions du tube digestif sont contrôlées par le système nerveux entérique.

## **2.2. Le système nerveux entérique**

Le tube digestif diffère des autres organes périphériques du fait de la présence en son sein d'un système nerveux intrinsèque extensif : le système nerveux entérique.

Longtemps considéré comme un simple relais post ganglionnaire du système nerveux parasympathique, son statut de système nerveux autonome et intégratif a été bien établi par les travaux réalisés ces trente dernières années. Bien qu'étroitement lié au système nerveux central (SNC) via le système nerveux sympathique et parasympathique, le SNE peut contrôler les fonctions intestinales lorsqu'il est totalement déconnecté du SNC. Cette aptitude lui a valu le surnom de « the second brain », le second cerveau. Composé de 400 à 600 millions de cellules, neurones et cellules gliales, chez l'homme, il possède plus de cellules que les systèmes sympathique et parasympathique réunis, et autant que la moelle épinière.

L'importance du SNE est aussi soulignée par la vaste gamme des neuropathies entériques qui sont liées à un dysfonctionnement d'une ou plusieurs de ses fonctions.

### **2.2.1 Découverte du SNE**

En 1857 et 1864, G. Meissner et L. Auerbach décrivent la présence de neurones dans la paroi intestinale. Le premier mît en évidence les neurones du plexus sous-muqueux, le second les neurones plus profonds formant le plexus myentérique.



R.Y. Cajal en 1893 montra que les neurones étaient des entités cellulaires séparées par de fins espaces (nommées synapses par Sherrington). Puis grâce à des marquages argentiques, il établit la présence de plusieurs types neuronaux. A.S Dogiel en réalisa la classification selon leur microarchitecture. En 1920, J.N. Langley initia la compréhension des caractéristiques neurochimiques du SNE en cartographiant le système nerveux autonome.

Parallèlement, en 1899, W. M. Bayliss et E. H. Starling ont publié les premiers travaux décrivant le rôle fonctionnel du système nerveux entérique (SNE) (Bayliss and Starling 1900). Ils ont défini la « loi de l'intestin » : « *Local stimulation of the gut produces excitation above and inhibition below the excited spot. These effects are dependent on the activity of the local nervous mechanism.* » En effet, en isolant des anses intestinales chez le chien, ils ont observé que la propulsion du contenu endoluminal s'accompagnait d'une contraction d'amont et d'une relaxation d'aval. Ils ont montré que ces contractions péristaltiques étaient des réflexes coordonnés, induits par une stimulation mécanique de l'intestin et conduits par le système nerveux local (intrinsèque) indépendamment du système nerveux périphérique. Leurs travaux ont été complétés par J. N. Langley qui montra que cette contraction persistait après dégénérescence des afférences nerveuses, prouvant le caractère intrinsèque de ce réflexe (Langley and Magnus 1905). Cependant, le SNE est resté longtemps considéré comme un simple relais post-ganglionnaire du système nerveux autonome (Hansen 2003). Ce n'est qu'à partir des années 1970 que les travaux de Gershon, Costa, Furness, Wood et North permirent un plein essor de la caractérisation du SNE et de ses rôles, grâce au développement, d'une part des techniques d'immunohistochimie et de traçage neuronal, et d'autre part de celles d'électrophysiologie et de neuropharmacologie.

### **2.2.2 Anatomie du SNE**

Le SNE regroupe plus de 100 millions de neurones (Goyal and Hirano 1996) et plus de 400 millions de cellules gliales (Ruhl, Nasser et al. 2004). Il est présent dans la totalité du TD, de l'œsophage jusqu'au rectum. Le SNE est composé principalement de plexus organisés en ganglions, contenant les neurones et les CGE. Il est constitué schématiquement de 2 plexus majeurs : le plexus myentérique (Auerbach) et le plexus sous muqueux (Meissner). Les plexus majeurs sont organisés en ganglions. Le plexus sous muqueux est situé sous la muqueuse et n'est présent que dans l'intestin grêle et le colon, il est absent dans l'estomac. Le plexus myentérique est situé entre les couches musculaires lisses longitudinale externe et circulaire interne. Il est présent depuis l'œsophage jusqu'à l'anus. (Figure 5)

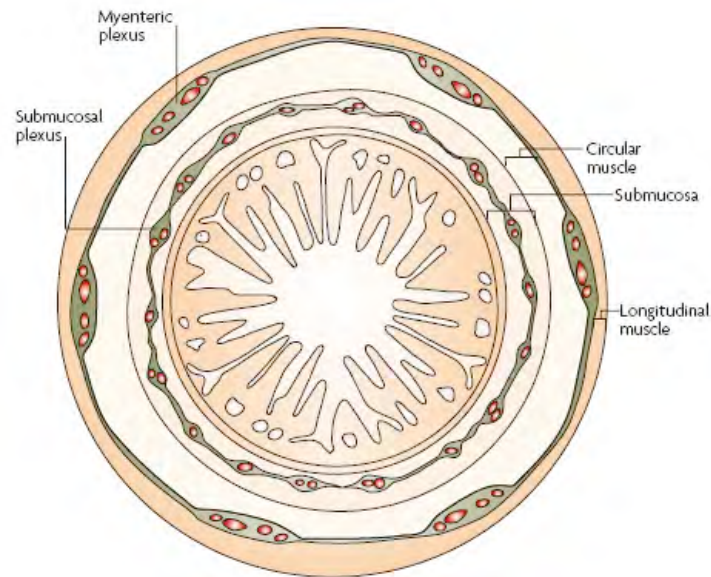


Figure 5 : représentation schématique d'une coupe transversale de l'intestin Le système nerveux entérique est constitué de ganglions organisés en deux plexus principaux : le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach situé entre la couche musculaire circulaire et la couche musculaire longitudinale ; et le plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner situé à proximité de la muqueuse. D'après (Heanue and Pachnis 2007)

Les plexus diffèrent entre eux par leur topographie, leur morphologie et le phénotype neurochimique de leurs neurones : le plexus myentérique présente une densité de neurones plus importante que le plexus sous muqueux (Wedel, Roblick et al. 1999; Furness 2000).

Le nombre et l'organisation des plexus varient selon les espèces, reflétant une adaptation du SNE lors de l'évolution. Ainsi, chez le cobaye, il n'existe qu'un seul plexus sous-muqueux, tandis que chez le porc, on distingue 2 plexus sous-muqueux : le plexus de Meissner, localisé dans la sous-muqueuse proche de la couche muscularis mucosae et le plexus de Schabadash, reposant sur la couche musculaire lisse circulaire. Chez l'homme, on distingue en outre un 3<sup>ème</sup> plexus sous-muqueux, le plexus intermédiaire, localisé entre le plexus de Meissner, et le plexus de Schabadash (Timmermans, Adriaensen et al. 1997). (Figure 6)

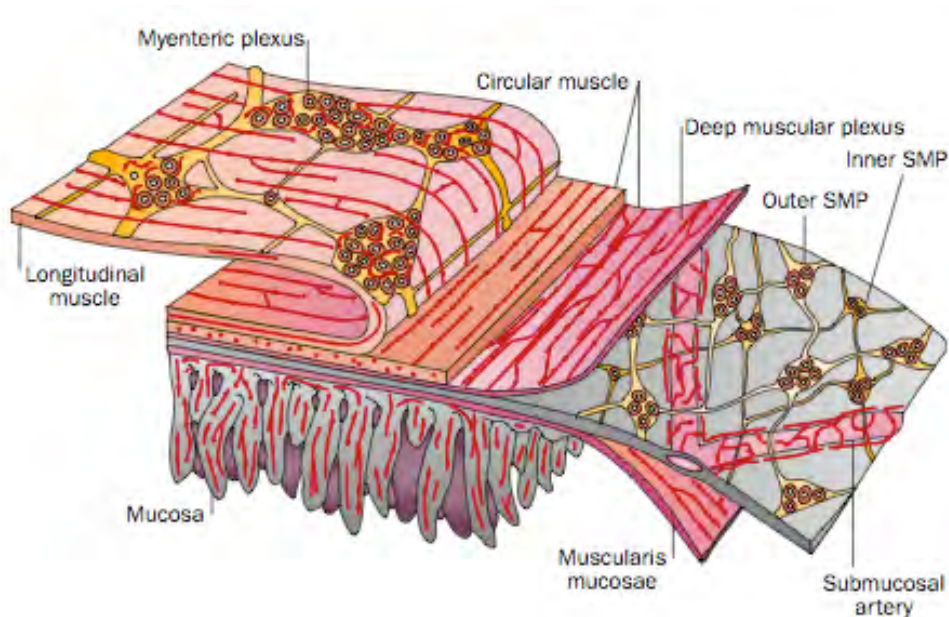


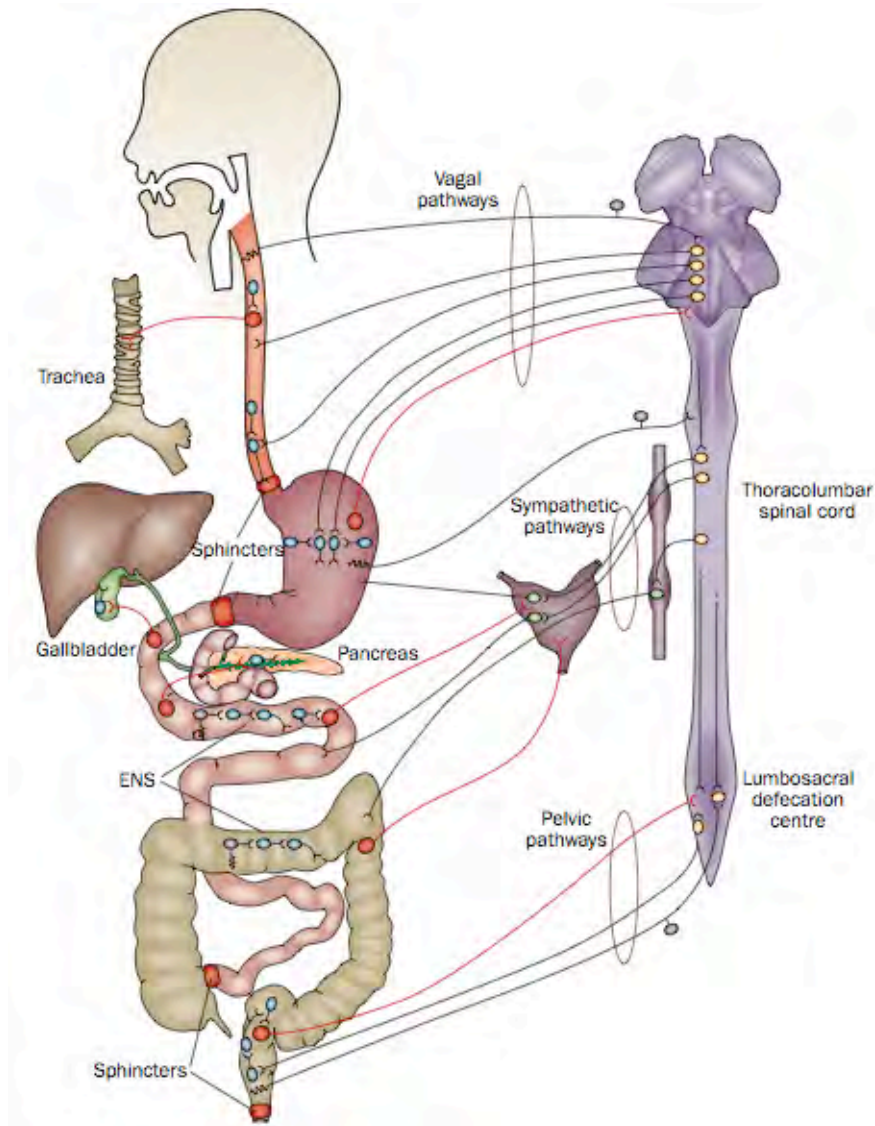
Figure 6 : Organisation du SNE des humains et des moyens et grands mammifères. Le SNE possède des plexus ganglionnaires : le plexus myentérique (*myenteric plexus*) entre les couches musculaires lisses externes longitudinales et circulaires (*longitudinal muscle et circular muscle*) ; et le plexus sous-muqueux ayant lui-même une composante externe et interne (*Outer et inner SMP*). Les faisceaux de fibres nerveuses relient les ganglions, mais aussi forment des plexus innervant les muscles longitudinaux et circulaires, la muscularis mucosae, les artères intrinsèques et la muqueuse. Il existe également des connexions avec les cellules endocrines et les ganglions coeliaques et mésentériques, non représentées ici (Furness 2012).

Les cellules nerveuses entériques envoient des prolongements vers l'ensemble des constituants cellulaires de l'intestin : les muscles de la paroi intestinale, l'épithélium, les vaisseaux sanguins et les cellules intrinsèques endocrines du pancréas (figure 7).

Ces plexus entretiennent des connexions entre eux, mais le SNE se projette également vers les ganglions coeliaques, mésentériques et sympathiques, et innerve des organes tels le pancréas (Anglade, Michel et al. 1987) et la vésicule biliaire (Mawe and Gershon 1989).

Le tube digestif contient les circuits neuronaux constitués de neurones sensitifs, interneurons et neurones moteurs. Ainsi, le SNE possède un circuit nerveux capable de générer des réflexes et ainsi constitué de types cellulaires lui permettant de recevoir une information sensorielle, de traiter l'information et d'exécuter une réponse. Néanmoins, cette activité est régulée par le SNC. Les informations du tractus intestinal voyagent vers l'extérieur via les neurones intestinofuges vers le SNC, les ganglions sympathiques, la vésicule et le pancréas. Les neurones des ganglions paravertébraux sympathiques reçoivent des informations du SNC et du SNE. Les informations sensorielles se dirigent d'une part vers les autres composants du SNE via les IPAN : neurones afférents intrinsèques primaires, et d'autre part vers le SNC, via les EPAN : neurones afférents extrinsèques primaires suivant les circuits afférents spinaux et vagues. Les informations en provenance du SNC atteignent le

SNE et les effecteurs digestifs par l'intermédiaire des systèmes vagal, sympathique et pelvien (Furness 2012).



**Figure 7** : L'innervation du tube digestif : les connexions nerveuses entre le système nerveux entérique (SNE) et le système nerveux central (SNC), ainsi que les connexions nerveuses entre les différents organes intestinaux sont complexes. Le tube digestif contient les circuits neuronaux complets du SNE (neurones moteurs et interneurons bleus, neurones sensitifs mauves). Les informations du tractus intestinal voyagent vers l'extérieur via les neurones intestinofuges (rouges) vers le SNC (neurones en jaune), les ganglions sympathiques, la vésicule et le pancréas. Les neurones des ganglions paravertébraux sympathiques (verts) reçoivent des informations du SNC et du SNE. Les informations sensorielles se dirigent d'une part vers le SNE via les IPAN : neurones afférents intrinsèques primaires (mauves), et d'autre part vers le SNC, via les EPAN : neurones afférents extrinsèques primaires (mauves) suivant les circuits afférents spinaux et vagues. Les informations en provenance du SNC atteignent le SNE et les effecteurs digestifs par l'intermédiaire des systèmes vagal, sympathique et pelvien (Furness 2012).

### 2.2.3 Développement et colonisation du SNE

Toutes les cellules neuronales et gliales entériques dérivent des cellules de la crête neurale (CNN) qui migrent le long et à travers le tube digestif en développement durant les premiers jours de vie embryonnaire.

La majorité des CNN naissent du segment vagal de la crête neurale et vont coloniser l'intestin antérieur (Yntema and Hammond 1954 ; Le Douarin and Teillet 1973) (futur œsophage et estomac) puis migrer et coloniser tout le tractus gastro-intestinal **dans le sens rostro-caudal** (Young and Newgreen 2001). Cependant, des cellules du segment rostro-troncal participent également à la colonisation de l'œsophage et de la partie supérieure de l'estomac, tandis que des cellules du segment sacré participent à la colonisation du segment intestinal post-ombilical. Ces CNN sacrées ont en plus la particularité de réaliser leur colonisation **dans le sens caudo-rostral**. (Heanue and Pachnis 2007) (Burns and Douarin 1998) (Figure 7).

Une fois dans le tractus gastro-intestinal, les CCN sont appelées cellules entériques dérivées de la crête neurale (ENCC). La différenciation en neurones ou en cellules gliales commence dès le début de la migration, avant que les ENCC aient atteint la partie anale terminale (Young, Ciampoli et al. 1999). Et ces neurones différenciés existent sur la totalité du tube colonisé, y compris au niveau du front de migration. Dans la paroi digestive, les ENCC vont intégrer les différents plans histologiques, de façon centripète ou centrifuge, selon les espèces (Burns and Douarin 1998).

La colonisation complète du tube digestif requiert une coordination complexe de la **migration**, de la **prolifération**, de la **survie**, et de la **différenciation** des ENCC. Ces évènements sont régulés par (i) des facteurs solubles libérés par le mésenchyme intestinal ; (ii) l'expression de molécules de la matrice extra cellulaire ; (iii) l'expression de récepteurs membranaires sur les ENCC ; (iv) l'expression de facteurs de transcription par les ENCC, qui vont réguler les évènements en aval. (Un tableau récapitulatif des molécules impliquées et de leur impact sur les ENCC est proposé en annexe 1.)

#### ○ **MIGRATION :**

Les ENCC migrent en chaînes, et les interactions entre cellules sont importantes pour réguler ce comportement (Druckenbrod and Epstein 2005). Lorsque les systèmes de

signalisation sont perturbés, des changements de comportement ont été observés (Druckenbrod and Epstein 2009).

Deux principales voies de signalisation sont impliquées dans la colonisation du tube digestif : le facteur **Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)** et ses récepteurs **Ret** et **GFR $\alpha$ 1**, ainsi que l'**endothéline-3** et son récepteur B (**endothelin receptor B**) jouent un rôle important dans la migration et le développement du SNE (Baynash, Hosoda et al. 1994 ; Hosoda, Hammer et al. 1994).

Le GDNF est sécrété par le mésenchyme digestif selon un gradient de concentration rostro-caudal (Figure 8) précédant le front de migration des cellules de la crête neurale (Natarajan, Marcos-Gutierrez et al. 2002), et les ENCC expriment les récepteurs Ret et GFR $\alpha$ 1.

Ainsi, l'absence de GDNF, de **Ret** ou de **GFR $\alpha$ 1**, chez la souris conduit à une aganglionose entérique étendue et à une agénésie rénale (Schuchardt, D'Agati et al. 1994). Tandis que l'absence de l'endothéline-3 ou de son récepteur B conduit à une aganglionose terminale (Baynash, Hosoda et al. 1994 ; Hosoda, Hammer et al. 1994). Chez l'homme, dans la maladie de Hirschsprung, des mutations du gène Ret sont associées à des formes de mégacôlon (Romeo, Ronchetto et al. 1994; Hofstra, Landsvater et al. 1994; Newgreen and Young 2002). De même, la mutation des récepteurs au GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) ou de l'endothélin-3 induirait l'inhibition de la prolifération et/ou l'accélération de la différenciation des cellules des crêtes (Iwashita, Kruger *et al.* 2003, Serra *et al.* 2009).



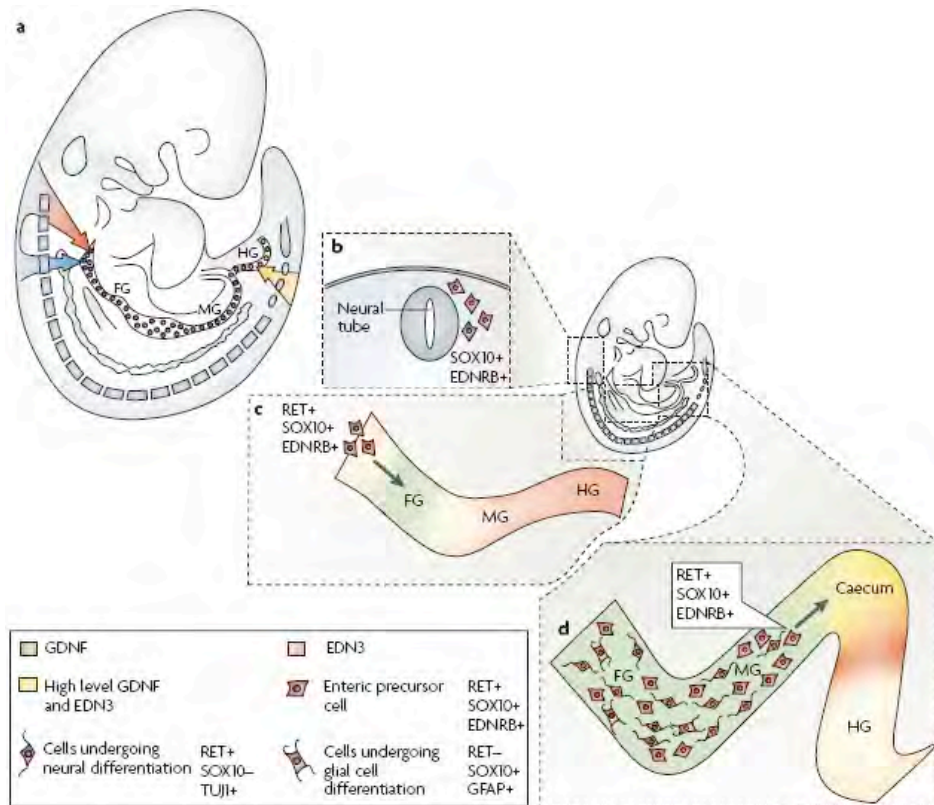


Figure 8 : ontogénèse du système nerveux entérique : colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale, migration et contrôle génétique.

(a) au stade E 8,5 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-troncral 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 colon.

(b) Les NCC d'origine vagale expriment Soxbeta10 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 cæcum (high level GDNF and EDN3) (jaune). Les cellules en aval du front de migration commencent progressivement à se différencier en neurones ou en cellules gliales (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 and Pachnis 2007).

## ○ PROLIFERATION ET SURVIE

La prolifération des ENCC est capitale pour assurer la production d'un nombre suffisant de cellules pour coloniser tout l'intestin. Les ENCC se multiplient tandis qu'elles

migrent le long de l'intestin, mais aussi tandis qu'elles pénètrent ses différentes épaisseurs (Barlow, Wallace et al. 2008). Young et al. ont également montré en 2004 que la densité de cellules sur le front de migration avait un impact direct sur leur comportement et sur la distance colonisée. (Young, Bergner et al. 2004).

Sur des modèles *in vitro*, d'expansion frontale sur des intestins en culture, Simpson et al. (Simpson, Zhang et al. 2007) ont montré un gradient de prolifération des ENCC en regard du front de migration. En revanche, il n'a pas été mis en évidence de différence de densité de prolifération entre le front de migration et les zones déjà colonisées *in vivo*. Or *in vivo*, le tube digestif croît en même temps qu'il est colonisé. L'hypothèse retenue serait qu'une prolifération importante est nécessaire sur le front de migration pour la colonisation d'aval, mais qu'une prolifération considérable est tout autant nécessaire *in vivo*, pour maintenir une certaine densité cellulaire, sur le tissu digestif en extension (Simpson, Zhang et al. 2007).

Par ailleurs, la régulation de la mort cellulaire est fondamentale durant le développement du SNE (Enomoto 2009). Avant leur arrivée dans le tube digestif, les ENCC sont soumises à l'apoptose. Cette apoptose est nécessaire à la régulation de leur nombre, et l'inhibition de l'apoptose induit une hyperganglionose (Wallace, Barlow et al. 2009). En revanche, une fois dans le tube digestif, il n'a pas été mis en évidence de phénomène apoptotique, ce qui est inattendu par rapport à ce qui est observé dans les autres systèmes nerveux en développement (Wallace, Schmidt et al. 2010).

#### ○ PARTICULARITES DU CONTINGENT DES CCN SACRES

Le développement du contingent nerveux sacré reste mal compris.

- Ses cellules commencent leur migration, à partir de la crête sacré, plus tardivement que le contingent vagal, et leur colonisation débute après une pause dans le plexus pelvien chez la caille (Burns and Douarin 1998), et dans les ganglions pelviens chez la souris (Kapur 2000).
- Leur migration commence après que le contingent vagal ait atteint l'intestin postérieur proximal, mais avant qu'il ait atteint sa partie distale (elles ne se rencontrent pas immédiatement).
- Cette migration se fait dans le sens caudo-rostral, inverse des ENCC vagues.



- La colonisation commence par le bord antérieur (antimésentérique) de l'intestin et non par le bord postérieur (mésentérique) (Wang, Chan et al. 2011). Elle est essentiellement à destination du plexus myentérique (Burns and Le Douarin 2001).
- L'absence de CNN vagues n'empêche pas le développement du contingent sacré. Les neurones dérivant des CNN sacrés ne représentent que 17% des cellules nerveuses présentes dans le colon distal, et ne peuvent coloniser tout le colon, en raison d'un moindre potentiel de migration (Burns and Douarin 1998).
- L'effet physiologique de ce contingent sur la motricité colique reste inconnu.

#### ○ DIFFERENCIATION

La différenciation des cellules de la crête neurale CCN en ENCC puis en neurones entériques ou en cellules gliales entériques commence dès le début de leur migration. Contrairement au système nerveux central (SNC), pendant leur différenciation, les cellules précurtrices du SNE continuent à proliférer et expriment des marqueurs généraux neuronaux (**Hu**) ou gliaux (**S100- $\beta$** ) (Young, Turner et al. 2005). Différents facteurs de transcription tels que **Mash1** et **Sox10** contrôlent de manière spécifique la différenciation des cellules du SNE. Ainsi, le facteur de transcription Mash1 est impliqué dans la différenciation des neurones sérotoninergiques (Blaugrund, Pham et al. 1996) et Sox10 dans la différenciation des cellules gliales entériques (Kelsh 2006). Enfin, différents types de neurones sont générés séquentiellement durant la différenciation des cellules de la crête neurale, les neurones nitrenergiques et sérotoninergiques se développant de manière précoce par opposition aux neurones cholinergiques et ceux exprimant la CGRP (calcitonin gene-related peptide) (Burns, Pasricha et al. 2004). Dans le même contexte, les CGE expriment de façon précoce le marqueur glial S100- $\beta$  comparativement à la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), qui n'est exprimée que plus tardivement (Young, Turner et al. 2005).

Les neurones différenciés jouent à leur tour un rôle dans la migration et la colonisation des ENCC avec lesquelles ils cohabitent, y compris sur le front de migration, grâce aux neurotransmetteurs (Baetge and Gershon 1989), et à l'activité électrique qu'ils commencent à produire (Hao, Bornstein et al. 2012).

## ○ DEVELOPPEMENT DU PLEXUS SOUS MUQUEUX

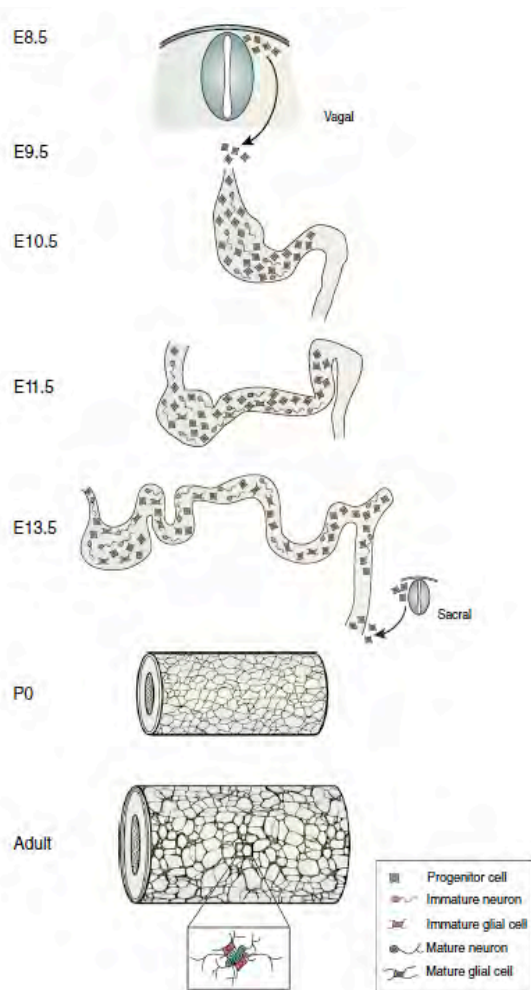
Le développement des plexus entériques est coordonné au développement musculaire et muqueux, comme l'ont montré Wallace et Burns en 1998. Ainsi, le développement des plexus peut il être centripète ou sembler centrifuge (Burns and Douarin 1998).

Dans l'intestin grêle de poulet et de souris, la migration des ENCC, est d'abord périphérique, formant le futur plexus myentérique. Une seconde vague de migration centripète à partir du plexus myentérique conduit à la formation du futur plexus sous muqueux (Gershon, Epstein et al. 1980; Pham, Gershon et al. 1991). Cette seconde migration est sous la dépendance de la voie de signalisation des Netrines (exprimées par la muqueuse de l'intestin grêle en développement) et de leurs récepteurs DCC (exprimés par les ENCC) (Jiang, Liu et al. 2003). Il semblerait que GDNF soit également impliqué dans cette seconde vague de colonisation, par un effet chémo-attractant, permettant la formation du plexus sous muqueux (Uesaka and Enomoto 2012).

Dans le colon, il semblerait que le développement du plexus sous muqueux diffère selon les espèces. En effet, chez le poulet, le plexus sous muqueux est colonisé en premier car les ENCC migrent sur le bord sous muqueux de la couche musculaire circulaire de l'intestin postérieur. En revanche, chez la souris, le muscle circulaire ne se différencie pas avant la colonisation de l'intestin postérieur par les ENCC. Celles-ci se dispersent à travers la couche circulaire présumée. Lorsque le muscle commence sa différenciation au 14<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E14,5), les cellules nerveuses se condensent à la surface séreuse du muscle circulaire, formant le plexus myentérique (Burns and Douarin 1998). Les cellules sous muqueuses n'apparaissent que vers E18,5, mais sont peu nombreuses, et le plexus sous muqueux n'est formel qu'au 3<sup>ème</sup> jour après la naissance, i.e. à (P3) (McKeown, Chow et al. 2001).

### **2.2.4 Chronologie du développement**

Ainsi, la génération d'activités neuro-musculaire et neuro-épithéliale fonctionnelles dans le tractus gastrointestinal requiert le développement coordonné des neurones entériques, des cellules gliales, des muscles lisses circulaires et longitudinaux et des cellules de Cajal. La durée des événements qui aboutissent à la colonisation complète du tube digestif est variable d'une espèce à l'autre. Sasseli et al. proposaient en 2012 un schéma des différentes étapes du développement du SNE chez la souris, résumé dans la figure 9.



Etape	Evènements cellulaires
<b>E 8,5</b>	Les CNN quittent la région vagale du tube neural
<b>E 9,5</b>	Colonisation de l'intestin antérieur primitif par les CCN
<b>E 10,5</b>	Migration rostro-caudale des ENCC Prolifération des ENCC Début de la différenciation neuronale
<b>E 11,5</b>	Migration rostro-caudale des ENCC Prolifération des ENCC Différenciation neuronale Première apparition des neurotransmetteurs Début de la différenciation gliale
<b>E 13,5</b>	Achèvement de la migration rostro-caudale des ENCC vagues Invasion de l'intestin postérieur par les ENCC sacrés Prolifération des ENCC Différenciation neuronale Différenciation gliale
<b>à l'âge adulte</b>	Prolifération des ENCC Différenciation des phénotypes neuronaux matures Différenciation des phénotypes gliaux matures Gangliogénèse Formation des circuits neuronaux fonctionnel et naissance de la motricité intestinale coordonnée

Figure 9 : Le développement du SNE chez la souris nécessite la coordination de multiples évènements ( d'après Sasselli, Pachnis et al. 2012)

Chez l'homme, Wallace et Burns, grâce à des immunomarquages sur embryon de 4 à 14 semaines de grossesse, proposaient en 2005 le schéma suivant (Burns, Pasricha et al. 2004) :

Les cellules de la crête neurale, marquées par le récepteur de la neurotrophine p75<sup>nr1</sup> colonisent l'intestin antérieur à partir de 4 semaines. Les cellules du segment rostro-troncal participent à la colonisation de l'œsophage et de la partie supérieure de l'estomac et celles du segment sacré commencent leur migration plus tardivement dans le sens caudo-rostral pour coloniser l'intestin post-ombilical. Les cellules de la crête neurale vagale ont colonisé l'ensemble du tube digestif (TD) dès la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation.

Au départ, ces cellules sont faiblement réparties dans le mésenchyme intestinal, et fusionnent ultérieurement pour former des ganglions selon le gradient rostro-caudal de maturation. Le plexus myentérique se forme initialement dans l'intestin antérieur, puis moyen et enfin postérieur. Le développement du plexus sous muqueux suit son développement à 3 semaines d'intervalle, dans le même ordre. Il résulterait de la migration centripète du plexus myentérique à travers la couche musculaire circulaire.

La différenciation du muscle lisse suit la colonisation de l'intestin par les CCN à quelques semaines près, comme cela a été démontré par la mise en évidence des récepteurs à l'Alpha-SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin). Elle se fait également dans un sens rostro-caudal, avec mise en évidence dès la 8<sup>ème</sup> semaine d'un marquage d'alpha-SMA sur l'œsophage, et à la 11<sup>ème</sup> semaine d'un marquage dans l'intestin postérieur. Le muscle lisse circulaire se développe avant le muscle longitudinal.

Les cellules interstitielles de Cajal émergent du mésenchyme à la 9<sup>ème</sup> semaine, entourant puis enveloppant les ganglions myentériques à la 11<sup>ème</sup> semaine.

A partir de la 14<sup>ème</sup> semaine, l'intestin est composé de cellules nerveuses, de couches musculaires lisses longitudinales, circulaires et muscularis mucosae, et d'un réseau de cellules interstitielles de Cajal qui donnent au tube digestif fœtal l'apparence d'un intestin mature.

Conjointement, les fonctions de l'intestin vont se mettre en place, par la maturation progressive des différentes composantes cellulaires, notamment du système nerveux entérique, et nous le décrirons plus loin.

### **2.2.5 Histologie du SNE**

#### **Classifications neuronales**

Les différents types de neurones composant le SNE ont été classés en fonction de leur morphologie, de leur propriétés électrophysiologiques ou de leur codage neurochimique. Ces

classifications "historiques" sont aujourd'hui peu utilisées et sont remplacées par des classifications "fonctionnelles" en neurones sensitifs, interneurons ou neurones moteurs (excitateurs, inhibiteurs).

La **première classification** des neurones entériques est **descriptive** (Figure 10). Elle a été initiée il y a plus d'un siècle par Dogiel, qui décrivit les différentes formes de neurones entériques dans les plexus myentériques et sous-muqueux chez l'homme, le cobaye, le lapin, le rat, le chien et le chat (Dogiel 1899). Il a décrit 3 types de neurones nommés Dogiel I, II et III. Par la suite cette classification a été complétée par les travaux de Stach et Furness, ainsi que de Timmermans, identifiant 4 autres types neuronaux, qui seront classés de I à VII (Timmermans, Adriaensen et al. 1997, Furness, Bornstein et al. 1988) (Figure 4). Cependant la majorité des neurones entériques appartiennent aux types I, II et III (Hansen 2003).

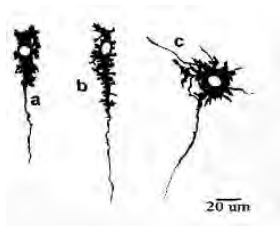
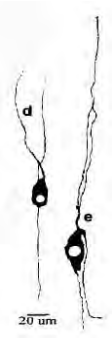
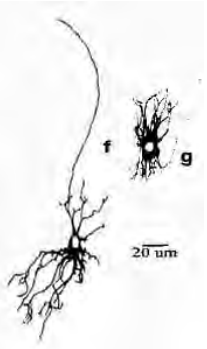
Morphologie selon la classification de Dogiel	Type I	Type II	Type III
			
Caractéristiques électrophysiologiques	Type S "Synaptic"	Type AH "After Hyperpolarisation"	Type S "Synaptic"
Effet TTX	Bloqué par la TTX	Insensible à la TTX	Bloqué par la TTX
Types neuronaux	Neurones moteur	IPAN (Intrinsic primary afferent neurons)	Interneurones

Figure 10: Principaux types morphologiques de la classification Dogiel des neurones entériques de l'intestin grêle chez le cobaye. a-c : neurones de type I, uniaxonaux et multidendritiques (courtes et lamellaires). d-e : neurones de type II, multiaxonaux et adendritiques. f : neurones de type III, uniaxonaux et multidendritiques (longues). g : neurones filamenteux TTX : tétraodontoxine (Timmermans, Adriaensen et al. 1997).

Les neurones de type Dogiel I sont caractérisés par une forme aplatie légèrement allongée et présentent un seul axone et plusieurs dendrites courtes et lamellaires. Ce groupe

est relativement vaste et il reste difficile à déterminer un rôle fonctionnel précis de ces neurones. Les neurones de type Dogiel II sont multiaxonaux et se caractérisent par un corps cellulaire rond ou ovale de taille assez large et une absence de dendrite. L'ultrastructure de ces neurones est caractérisée par la présence d'un nombre important de mitochondries et de lysosomes (Pompolo and Furness 1988). Enfin, les neurones de type III sont uniaxonaux avec des dendrites très longues (Stach 1982).

La **deuxième classification** des neurones entériques, plus précise, est basée sur leurs **caractéristiques électrophysiologiques** (Lomax and Furness 2000). Les premiers enregistrements intracellulaires, permettant la description des propriétés électriques des neurones entériques, ont été rapportés dans les années 70 (Nishi and North 1973 ; Hirst, Holman et al. 1974 ; Wood and Mayer 1978). Ces premières études avaient initialement décrit trois types de neurones entériques. Cependant, le troisième type qui était non excitable, correspondait en fait aux cellules gliales. Les neurones entériques sont donc à présent classés en deux catégories : les neurones de type S ou "Synaptic" et les neurones de types AH ou "After Hyperpolarisation" dans l'intestin de cobaye (Hirst, Holman et al. 1974).

Les neurones de type S présentent des potentiels d'action (PA) brefs, suivis d'un potentiel d'hyperpolarisation de courte durée allant de 20 à 100 ms. Ces PA sont bloqués par la tétródotoxine (TTX). Les neurones de type S présentent une morphologie de type Dogiel I et III (uniaxonal).

Les neurones AH se caractérisent par un large potentiel d'hyperpolarisation suivant le PA (amplitude 75 à 110 mV). Ils présentent une inflexion dans la phase descendante de repolarisation et sont normalement suivis de deux phases séparées d'hyperpolarisation : une première phase précoce et une seconde plus tardive et longue (20 - 30 sec) et médiée par les canaux potassiques activés par le calcium (KCa<sup>+</sup>) (Hirst, Holman et al. 1974). De plus, les neurones AH sont insensibles à la TTX et ont une morphologie de type Dogiel II (Furness, Robbins et al. 2004).

La stimulation des fibres inter-ganglionnaires n'induit pas de potentiel post-synaptique excitateurs rapides dans ces neurones, mais en revanche peut induire des potentiels post-synaptiques excitateurs lents (Wood and Mayer 1978).

## 2.2.6. Neuromédiateurs du SNE

Les neurones entériques produisent et libèrent une trentaine de substances chimiques différentes, les neurotransmetteurs ou neuromédiateurs, qui permettent de communiquer entre eux et avec les cellules cibles effectrices (McConalogue and Furness 1994) (Figure 11). Ces neurotransmetteurs ou neuromédiateurs peuvent être classés en fonction de leur action excitatrice ou inhibitrice sur leurs cellules cibles (Tableau 1).

Stimulation	Inhibition
Ach, Adénosine, 5-HT, Histamine, NeurokinineA, SP, CCK, GRP, Motiline, bombésine, opioïdes, TRH, PGE2	NO, VIP, Somatostatine, GABA, CGRP, NPY, Galanine, Glucagon, Neurotensine, PACAP, PHI, PYY, sérotonine, Dopamine

**Tableau 1** : Principaux neurotransmetteurs et substances neurohumorales. 5-HT, sérotonine ; GRP, gastrin releasing polypeptide ; NO, nitric oxide ; PGE2, prostaglandine E2 ; TRH, thyrotropin-releasing hormone ; CGRP, calcitonin gene-regulated peptide ; GABA, gamma butyric acid ; NPY, neuropeptide Y ; PACAP, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide ; PHI, peptide histidine isoleucine ; PYY, peptide YY ; SP, substance P ; VIP, vasoactive intestinal polypeptide. (D'après Hansen 2003)

Onze molécules différentes ont pu être détectées dans un même neurone (Schemann and Neunlist 2004). Ces substances sont de petites molécules telles que l'acétylcholine (Ach), le monoxyde d'azote (NO) ou l'adénosine triphosphate (ATP), ou encore des peptides comme la sérotonine (5-HT) et le vasointestinal peptide (VIP). De nombreuses études associant des techniques d'immunohistochimie, de traçage neuronal, couplées à des études fonctionnelles et pharmacologiques, ont permis de corrélérer le codage neurochimique du neurone à sa fonction.

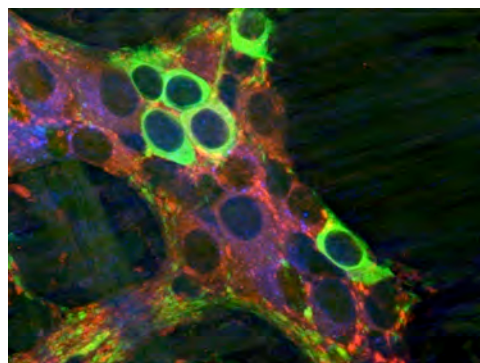


Figure 11 : **Ganglion myentérique de souris** : Photographie de microscopie à fluorescence couplé à un apotome. Les corps des neurones sont visualisés avec différents anticorps dirigés contre nNOS (vert), VIP (violet), ChAT (rouge), (X63). (INSERM U913).

Les neurotransmetteurs contrôlent les différentes fonctions digestives. Furness en 2012 a récapitulé les neurotransmetteurs retrouvés dans chaque type de neurones entériques, selon leurs rôles et leurs fonctions (tableau 2).

**Table 1 | Multiple transmitters of neurons that control digestive function\***

Type of neuron	Primary transmitter	Secondary transmitters, modulators	Other neurochemical markers	Study
Enteric excitatory muscle motor neuron	ACh	Tachykinin, enkephalin (presynaptic inhibition)	Calretinin, $\gamma$ -aminobutyric acid	Brookes <i>et al.</i> (1991); <sup>76</sup> Holzer & Holzer Petsche (1997); <sup>77</sup> Grider (2003) <sup>78</sup>
Enteric inhibitory muscle motor neuron	Nitric oxide	VIP, ATP or ATP-like compound, carbon monoxide	PACAP, opioids	Fahrenkrug <i>et al.</i> (1978); <sup>79</sup> Costa <i>et al.</i> (1992); <sup>80</sup> Sanders & Ward (1992); <sup>81</sup> Xue <i>et al.</i> (2000) <sup>82</sup>
Ascending interneuron	ACh	Tachykinin, ATP	Calretinin, enkephalin	Brookes <i>et al.</i> (1991) <sup>83</sup>
ChAT, NOS descending interneuron	ATP, ACh	ND	Nitric oxide, VIP	Young <i>et al.</i> (1995); <sup>84</sup> Brookes (2001) <sup>85</sup>
ChAT, 5-HT descending interneuron	ACh	5-HT, ATP	ND	Furness & Costa (1982); <sup>86</sup> Monro <i>et al.</i> (2002); <sup>87</sup> Gwynne & Bornstein (2007) <sup>88</sup>
ChAT, somatostatin descending interneuron	ACh	ND	Somatostatin	Gwynne & Bornstein (2007); <sup>88</sup> Portbury <i>et al.</i> (1995) <sup>89</sup>
Intrinsic sensory neuron	ACh, CGRP, tachykinin	ND	Calbindin, calretinin, IB4 binding	Grider (2003); <sup>78</sup> Gwynne & Bornstein (2007); <sup>88</sup> Li & Furness (1998); <sup>90</sup> Johnson & Bornstein (2004) <sup>91</sup>
Interneurons supplying secretomotor neurons	ACh	ATP, 5-HT	ND	Suprenant (1984); <sup>92</sup> Monro <i>et al.</i> (2004) <sup>93</sup>
Noncholinergic secretomotor neuron	VIP	PACAP	NPY (in most species)	Cassuto <i>et al.</i> (1981); <sup>94</sup> Banks <i>et al.</i> (2005) <sup>95</sup>
Cholinergic secretomotor neuron	ACh	ND	Calretinin	Brookes <i>et al.</i> (1991); <sup>83</sup> Keast <i>et al.</i> (1985) <sup>96</sup>
Motor neuron to gastrin cells	GRP, ACh	ND	NPY	Holst <i>et al.</i> (1987); <sup>97</sup> Weiget <i>et al.</i> (1997) <sup>98</sup>
Motor neurons to parietal cells	ACh	Potentially VIP	ND	Nilsson <i>et al.</i> (1972); <sup>99</sup> Feldman <i>et al.</i> (1979) <sup>100</sup>
Sympathetic neurons, motility inhibiting	Noradrenaline	ND	NPY in some species	Finkleman (1930); <sup>101</sup> Macrae <i>et al.</i> (1986) <sup>102</sup>
Sympathetic neurons, secretion inhibiting	Noradrenaline	Somatostatin (in guinea pig)	ND	Costa & Furness (1984) <sup>103</sup>
Sympathetic neurons, vasoconstrictor	Noradrenaline, ATP	Potentially NPY	NPY	Dresel & Wallentin (1966); <sup>104</sup> Furness (1971); <sup>105</sup> Furness <i>et al.</i> (1983) <sup>106</sup>
Intestinofugal neurons to sympathetic ganglia	ACh	VIP	Opioid peptides, CCK, GRP	Crowcroft <i>et al.</i> (1971); <sup>107</sup> Dalsgaard <i>et al.</i> (1983); <sup>108</sup> Love & Szurszewski (1987) <sup>109</sup>

\*This field continues to advance as improved pharmacological and other tools are developed. Some of the information provided here will therefore undoubtedly be superseded in the future. Further details of postsynaptic receptors have been described elsewhere.<sup>2,58</sup> Abbreviations: 5-HT, 5-hydroxytryptamine; ACh, acetylcholine; CCK, cholecystokinin; ChAT, choline acetyltransferase; CGRP, calcitonin gene-related peptide; GRP, gastrin releasing peptide; ND, not determined; NPY, neuropeptide Y; NOS, nitric oxide synthase; PACAP, pituitary adenylyl-cyclase activating peptide; VIP vasoactive intestinal peptide.

**Tableau 2 :** les neurotransmetteurs des neurones qui contrôlent les fonctions digestives, d’après Furness 2012 (Furness 2012)

## 2.3 Contrôle de la motricité colique par le SNE

Les différents travaux de ces trente dernières années, ont permis d’étudier en détail le circuit nerveux entérique contrôlant le péristaltisme.

Tout d’abord, il a été montré que le bol alimentaire fonctionnait comme un stimulus mécanique dans la lumière intestinale, déclenchant un réflexe nerveux. Ce réflexe entraîne une relaxation en amont et une contraction en aval du bol alimentaire. Ce stimulus mécanique se répétant de façon séquentielle le long de l’intestin, permet la progression du bol alimentaire (Bayliss and Starling 1900). Ce réflexe persiste après dénervation extrinsèque – travaux de



Langley en 1905 –, il est donc intrinsèque au tube digestif (Langley and Magnus 1905). Par la suite, il a été montré que le SNE contient tous les éléments nécessaires à la mise en place de ce réflexe : des neurones sensitifs, des interneurones et des neurones moteurs.

Cependant, les neurones entériques ne détectent pas directement les changements du contenu luminal. C'est l'épithélium, et en particulier les cellules entérochromaffines qui sont les cellules sensibles primaires (par analogie avec les récepteurs gustatifs). Celles-ci libèrent en particulier de la sérotonine (5-HT), en réponse à la distension intestinale, aux mouvements de distorsion mécanique (frottements dus au passage du bol alimentaire) de la muqueuse, et aux modifications chimiques du contenu intraluminal (présence d'acide gras, de carbohydrates, ou d'une hyperosmolarité). Ce neuromédiateur agit ensuite sur les terminaisons nerveuses des neurones primaires afférents intrinsèques (IPAN) (Figure 12) (Furness, Kunze et al. 1998).

Les IPAN sont connectés entre eux sur toute la circonférence et tout le long du TD afin de coordonner l'activité motrice (Furness, Kunze et al. 1998). Ils établissent des connexions avec les interneurones ascendants et descendants, dont les axones se projettent respectivement vers le côté oral et vers le côté anal. Ils sont alors en contact avec les neurones moteurs ascendants ou excitateurs (vers l'amont) et les neurones moteurs inhibiteurs ou descendants (vers l'aval) (Furness, Kunze et al. 1998). Dans l'intestin grêle de cobaye, les neurones moteurs excitateurs représentent 10% et les neurones moteurs inhibiteurs 12% des neurones myentériques totaux (Costa, Brookes et al. 1996).

Les IPAN possèdent une morphologie Dogiel de type II et un comportement électrophysiologique de type AH. Les interneurones possèdent une morphologie Dogiel de type I et un comportement électrophysiologique de type S ou AH. Les neurones moteurs possèdent une morphologie Dogiel de type I et un comportement électrophysiologique de type S (Furness, Clerc et al. 2000).

Chaque type de neurones possède un ou un groupe de neurotransmetteurs (tableau 2). Pour ce qui est des circuits contrôlant la motricité, il est possible de schématiser ainsi :

- Les interneurones ascendants sont immunoréactifs pour la ChAT, la SP, et la calrétinine (Brookes 1997). La transmission entre ces neurones est médiée par l'ACh se fixant sur les récepteurs nicotiques (nAChR). La transmission synaptique vers les

neurones excitateurs est assurée par l'ACh et les tachykinines (récepteurs NK3) (Bornstein, Costa et al. 2004).

Les neurones moteurs excitateurs contiennent des substances comme l'ACh et les tachykinines, notamment la Substance P, la neurokinine A et l'enképhaline, et possèdent des projections longues et courtes (Holzer, Schluet et al. 1993; Lippi, Santicioli et al. 1998; Furness, Alex et al. 2003).

- Les interneurones descendants sont répartis en trois groupes. Les interneurones descendants ChAT/NOS, ChAT/5-HT et ChAT/SOM (somatostine). La transmission synaptique vers les neurones inhibiteurs est assurée essentiellement par l'ACh et par l'ATP via les récepteurs P2X.
- Les neurones moteurs inhibiteurs, contiennent de l'ACh, et du VIP, leurs médiateurs sont l'ATP, le NO ou le VIP (Furness 2000).

Ainsi, la contraction d'amont est-elle essentiellement sous le contrôle de l'ACh, des tachykinines. L'activation de ces neurones moteurs excitateurs entraîne une dépolarisation et une contraction du muscle. Cette activité est bloquée par des antagonistes des récepteurs muscariniques (atropine) et aux tachykinines. Tandis que la relaxation d'aval est sous le contrôle du NO, du VIP et de l'ATP. L'activation des neurones moteurs inhibiteurs induit une hyperpolarisation et la relaxation du muscle lisse intestinal. Dans la plupart des espèces, cette réponse utilise des composantes rapides, médiées par l'ATP, ou le NO, ou tardives médiées par le VIP (Figure 10) (Hansen 2003). Le NO est produit par la NO-synthase (NOS), dont l'activité est bloquée par le N(G)-nitro-L-Arginine-Méthyl Ester (L-NAME).

Par ailleurs, parmi les trois types d'interneurones descendants, dont l'axone se projette dans la direction anale, le groupe d'interneurones ChAT/NOS/VIP est impliqué dans le réflexe péristaltique tandis que le groupe ChAT/SOM est impliqué dans la propagation des complexes myoélectriques migrants dans l'intestin grêle (Furness 2000).

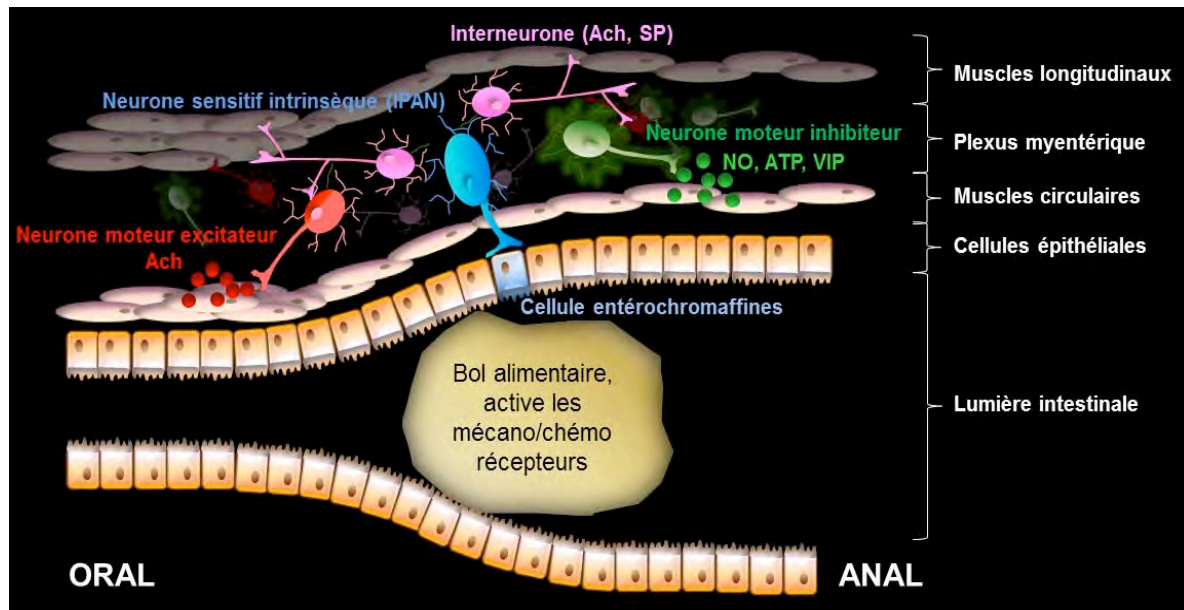


Figure 12 : Schéma du réflexe péristaltique dans l'intestin grêle :

La stimulation de la muqueuse induit la libération de sérotonine par les cellules entérochromaffines vers les IPAN (les IPAN possèdent des récepteurs 5-HT<sub>1P</sub>, 5-HT<sub>3</sub> et 5-HT<sub>4</sub>) et vers les afférences vagales et spinales extrinsèques (qui possèdent des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>). Les IPAN libèrent alors de la SP (de la substance P), de l'ACh (acétylcholine), et du CGRP (Calcitonin Gene-Regulated Peptide) vers les interneurons ascendants et descendants. Les interneurons ascendants, excitateurs, libèrent de la SP et de l'ACh en amont, vers les motoneurons excitateurs. Tandis que les interneurons descendants libèrent de la 5-HT et de l'ACh en aval vers les motoneurons inhibiteurs. Les motoneurons excitateurs libèrent de l'ACh et de la SP vers les muscles. Les motoneurons inhibiteurs libèrent du NO, du VIP (vasointestinal peptide) et de l'ATP vers les muscles (**Hansen 2003**).

Enfin, les cellules interstitielles de Cajal (CIC) jouent aussi un rôle déterminant dans le contrôle neuronal de la contraction musculaire. Dans la plupart des régions du TD, un réseau de CIC est localisé dans l'espace inter-musculaire, au niveau du plexus myentérique, entre le muscle circulaire et le muscle longitudinal (Ward, Sanders et al. 2004). Elles jouent un rôle de « pacemaker » en générant des ondes lentes de propagation de la motricité intestinale. En effet, une mutation de c-kit, un facteur clé dans le développement des CIC, entraîne une perte de l'activité de pacemaker (Ward, Sanders et al. 2004; Torihashi, Ward et al. 1995). Ces cellules sont innervées par les neurones moteurs entériques et sont capables de répondre à différents neurotransmetteurs (Ward, Sanders et al. 2004). Des données récentes montrent que la transmission nerveuse motrice implique peu de connexions directes entre les neurones et les muscles, mais impliquent principalement des connexions entre les neurones et les CIC, couplées aux muscles par des jonctions communicantes (Ward, Sanders et al. 2004).

## **2.4 Contrôle de la perméabilité intestinale par le SNE**

Plusieurs études ont suggéré l'implication de voies nerveuses dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire de la barrière épithéliale intestinale BEI. Ainsi, Crowe a observé que l'augmentation de la perméabilité chez des rats allergiques à l'ovalbumine était inhibée par la TTX (Crowe, Soda et al. 1993). De même, le jeûne du porcelet entraîne une augmentation de la perméabilité au niveau du jéjunum, qui est bloquée par la TTX et par des antagonistes des récepteurs cholinergiques (Hayden and Carey 2000). Le rôle direct du SNE dans le contrôle de la perméabilité a été montré dans un système de co-culture composé de sous-muqueuse humaine et de la lignée épithéliale colique HT-29 clone 16E. Dans ce modèle, la stimulation électrique des neurones sous-muqueux diminue la perméabilité de l'épithélium et augmente l'expression de Zonula occludens-1 (ZO-1), molécule-clé des jonctions serrées. Cet effet passe par l'activation de voies VIPergiques (Neunlist, Barouk et al. 2003). De plus, il a été montré qu'un stress aigu active les voies cholinergiques qui induisent la sécrétion pancréatique exocrine de trypsine. Cette sécrétion de trypsine altère la perméabilité paracellulaire colique chez la souris (Demaude, Leveque et al., 2009)

L'effet direct de neuromédiateurs sur la perméabilité de la BEI a montré, sur des lignées épithéliales coliques humaines (Caco-2, HT-29 clone 19A), que le VIP diminue la perméabilité tandis que l'Ach l'augmente (Blais, Aymard et al. 1997). Les travaux de Hällgren ont également montré que la neurokinine A augmente la perméabilité dans le duodénum de rat, effet qui est inhibé par le VIP (Hallgren, Flemstrom et al. 1998). Ces résultats suggèrent que le VIP a des effets protecteurs de la BEI notamment vis-à-vis d'agents pathogènes (Conlin, Kaltenbach et al. 2010).

# **3 Facteurs intervenants dans la maturation du tube digestif et de ses fonctions**

## **3.1 Le microbiote**

### **3.1.1 Définition**

Le microbiote intestinal est l'ensemble des bactéries qui vivent dans le tube digestif. C'est un écosystème microbien, vivant en symbiose avec son hôte. Il est constitué de 100 000 milliards de bactéries, ce qui représente 10 fois plus de micro-organismes que le corps humain adulte ne compte de cellules, répartis en plus de 500 espèces différentes. Son génome possède également 100 fois plus de gènes que le génome humain. Le microbiote humain représente une biomasse estimée à 1 kg de bactéries. (Goulet and Joly, 2010) Le microbiote est doté de plusieurs fonctions physiologiques, ce qui en fait, pour certains un « organe caché » (Goulet and Joly, 2010).

L'étude du microbiote a commencé en 1900 (Tissier, 1900) et a été effectuée par des méthodes de culture. Depuis l'avènement récent de techniques moléculaires modernes, fondées sur l'ARN ribosomique 16S comme marqueur phylogénétique, et leur capacité à identifier un grand nombre d'espèces qui ne peuvent être cultivées, une évaluation plus complète et plus rapide de l'écosystème gastro-intestinal a été réalisée ces dernières années (Guaraldi and Salvatori, 2012).

### **3.1.2 Mise en place du microbiote chez le nouveau-né**

Le tube digestif, stérile *in-utero*, est rapidement colonisé dès les premières heures de vie. La colonisation bactérienne de l'intestin est influencée par les caractéristiques maternelles, le mode d'accouchement, l'environnement du lieu de naissance, l'administration de médicaments et le type d'alimentation. Si le sujet a été très étudié, la littérature contradictoire reflète la prise en compte de conditions de naissance, de pratiques alimentaires et d'environnements socio-culturels extrêmement diversifiés (Kononen 2000; Fallani, Young et al. 2010). Le microbiote est implanté le long du tube digestif, selon un gradient oro-anal, mais il prédomine au niveau du colon, en particulier le colon droit.

L'étude de la microflore fécale de nouveau-nés a montré une séquence d'implantation et de relais en dominance de divers genres bactériens issus initialement de la microflore fécale et vaginale de la mère, puis ultérieurement de la microflore buccale et cutanée. Les entérobactéries et streptocoques sont les premiers colonisateurs.

Après 2 à 3 jours à vie, le niveau de population atteint  $10^9$  à  $10^{11}$  bactéries par gramme de selles et la microflore se diversifie avec l'apparition d'anaérobies en dominance.

A 6 semaines de vie, le genre *Bifidobacterium* est prédominant (40% en moyenne des bactéries détectables), suivi de *Bacteroïdes* (11,4%) et des entérobactéries (7,5%). Les pays du Nord ont été associés à une plus grande proportion de bifidobactéries dans les selles du nourrisson, alors qu'une flore plus variée avec plus de bactéroïdes caractérisait les pays du Sud. De plus, les bifidobactéries dominent le microbiote des nourrissons allaités au sein, alors que les bébés nourris au lait maternisé montraient des proportions beaucoup plus élevées de *Bacteroïdes*, des membres des groupes de *Clostridium* coccoïdes et de *Lactobacillus*. Les nouveau-nés nés par césarienne ou par des mères traitées avec des antibiotiques pendant la période périnatale présentaient de plus faibles proportions de *Bacteroïdes* et des membres du groupe *Atopobium*. (Fallani, Young et al., 2010). Il en résulte que la succession ne peut être décrite qu'en termes de tendances : la microflore est dominée par les bifidobactéries chez la majorité des nouveau-nés nourris au lait maternel, tandis que l'alimentation au lait de vache maternisé s'accompagne d'une diversification très précoce avec l'apparition en dominance de genres bactériens de la microflore d'adulte. Le seul genre bactérien prédictif de l'alimentation au lait maternel est *Clostridium*, dont les espèces sont toujours moins représentées dans ce cas. Il existerait également une différence qualitative dans la diversité d'espèces retrouvées chez le nouveau-né et l'adulte (Jost, Lacroix et al., 2012). Indépendamment de l'alimentation et des facteurs environnementaux entourant la naissance (Fallani, Young et al., 2010), l'immunité d'origine maternelle et la maturation du système immunitaire du nouveau-né joueraient un rôle sur la colonisation (Jost, Lacroix et al., 2012).

Ensuite, l'acquisition d'une microflore d'adulte peut prendre plusieurs mois et l'on ignore encore les mécanismes qui dirigent cette succession. Cependant, le projet européen MetaHIT, coordonné par l'INRA, en 2008 portant sur la caractérisation de la flore humaine dans 39 populations différentes, réparties sur au moins 3 continents, a mis en évidence l'existence d'« entérotypes », Les entérotypes sont de véritables « signatures bactériennes intestinales », ils sont spécifiques de chaque individu et indépendant de l'origine géographique

(pays, continent, etc.), de l'âge et de l'état de santé de l'individu. Ils sont définis par l'abondance de certains types bactériens et par leur « potentiel génétique (c'est-à-dire par les fonctions que leurs gènes codent) ». Trois principaux entérotypes ont été identifiés : le type 1 est caractérisé par de hauts niveaux de bacteroides, le type 2 a peu de bacteroides mais beaucoup de prevotella, alors que le type 3 a un haut niveau de ruminococcus. Cette étude a également mis en évidence 19 000 fonctions différentes de cette flore : désagrégation de substances que notre propre système est incapable de démanteler, par exemple les cartilages et les molécules de cellulose ; fonctions immunitaires ; synthèse de substances indispensables, par exemple la vitamine K, qui joue un rôle essentiel dans la coagulation sanguine. Cette étude ouvre la porte à de nombreuses questions, et une analyse plus approfondie à l'avenir pourra peut-être faire apparaître un lien direct entre un entérotype et certaines pathologies (Arumugam, Raes et al., 2011).

### **3.1.3 Fermentation bactérienne**

L'influence principale de la microflore sur le métabolisme de l'hôte provient du métabolisme bactérien des composés présents dans le côlon et en particulier du métabolisme des sucres et des protéines. Les produits terminaux des fermentations bactériennes digestives sont très divers mais les métabolites majeurs sont : les AGCC (les acides gras à chaînes courtes), les gaz comme l'hydrogène, le gaz carbonique, le méthane, et l'ammoniac. Les substrats présents dans le côlon proviennent soit des aliments non digérés dans l'intestin grêle (les fibres alimentaires et amidons résistants) soit des sécrétions digestives (mucus surtout et enzymes).

Les AGCC principaux sont l'acétate (chaîne à deux carbones C2), le propionate (C3) et le butyrate (C4). Rapidement absorbés par la muqueuse colique, ils exercent des fonctions physiologiques majeures au niveau colique (C4) et même hépatique (C2, C3) et général (C2).

Ils apportent de l'énergie et stimulent l'absorption colique de sodium. L'acétate passe dans le sang et fournit de l'énergie à l'ensemble de l'organisme. Le propionate a des propriétés hypocholestérolémiantes, au moins chez certains animaux. Le butyrate est le principal nutriment des colonocytes ; il exerce des propriétés d'immuno-modulation locale, influence la prolifération cellulaire et semble diminuer la cancérogenèse colique.

L'hydrolyse des protéines et la fermentation des acides aminés produit de l'ammoniaque, des acides gras branchés ainsi que des phénols, indoles, skatoles (gaz

odorants) et amines. Les gaz produits au cours de la fermentation sont soit excrétés soit transformés. L'excrétion se fait soit par les émissions de gaz rectaux soit par voie pulmonaire.

L'hydrogène peut aussi être métabolisé par certaines bactéries de la microflore pour produire du méthane (méthanogenèse) ou de l'acétate (acétogenèse) ou des sulfites odorants (sulfatoréduction).

Il est difficile de déterminer quelle espèce bactérienne produit quel métabolite car de nombreuses espèces bactériennes interagissent dans un environnement complexe où les prélèvements sont difficiles.

### **3.1.4 Rôle du microbiote dans la mise en place des fonctions digestives**

Pour étudier le rôle de la flore sur les fonctions digestives et leur développement deux approches principales ont été utilisées : l'étude d'animaux axéniques (sans germe) ou la perturbation de la flore. La flore peut être artificiellement modifiée par l'utilisation d'antibiotiques ou de probiotiques.

#### **○ Données issues de l'étude des animaux axéniques et gnotoxéniques**

Des différences ont été mises en évidence entre des animaux axéniques et des animaux conventionnels : les animaux axéniques présentent une vascularisation de l'intestin plus faible, des activités enzymatiques digestives réduites, ainsi qu'une couche de mucus plus importante, une susceptibilité aux infections augmentée ou encore une dépense énergétique supérieure de 20 à 30 % par rapport aux animaux conventionnels (Shanahan 2002). De même, le renouvellement de l'épithélium colique apparaît ralenti en l'absence du microbiote. La vitesse de production de cellules par crypte est ainsi réduite et peut aboutir à une différence de production quotidienne d'environ cinquante cellules, le nombre de cellules par crypte étant diminué d'environ 20 % (Alam, Midtvedt et al. 1994).

L'inoculation de différentes espèces bactériennes chez des souris axéniques a par ailleurs montré que les profils d'expression génique de la muqueuse intestinale différaient en fonction de la bactérie testée (Hooper, Wong et al. 2001).

Une autre étude, menée à l'aide de souris initialement axéniques, a permis de mettre en évidence l'importance du microbiote intestinal dans l'angiogénèse intestinale. Les réseaux de vaisseaux sanguins des villosités intestinales de souris adultes axéniques et



conventionnelles ont été comparés, montrant que ce réseau est deux fois moins dense chez des souris axéniques en raison d'un développement stoppé prématurément chez ces dernières (Stappenbeck, Hooper et al. 2002).

#### ○ **Rôle du microbiote dans la mise en place de la motricité intestinale**

Le rôle du péristaltisme dans la composition et le maintien d'un équilibre du microbiote a été étudié depuis longtemps. En effet, grâce à la présence d'une motricité normale, telle que décrite précédemment (péristaltisme et complexes moteurs migrants), et à l'action antibactérienne de l'acidité gastrique, 33% des sujets sains ont une culture négative dans le jéjunum. La relation entre la motricité intestinale et le maintien d'une homéostasie florale a été décrite pour la première fois en 1977 (Vantrappen, Janssens et al. 1977).

Cependant, le rôle du microbiote dans la mise en place de la motricité intestinale commence également à émerger dans les publications récentes (Quigley 2011). En effet, les interactions entre le microbiote et la motricité intestinale semblent évidentes dès les premiers jours de vie. Parallèlement à la colonisation du tube digestif par une flore spécifique, à la naissance, dans les premiers jours de vie, lors du sevrage puis à l'âge adulte, se mettent en place les fonctions digestives motrices avec leurs schémas moteurs, et leur physiologie neuromusculaire (Berseth 1996). Les liens entre la maturation du microbiote et la maturation des phénomènes moteurs sont particulièrement illustrés par des études réalisés chez des animaux axéniques (Barbara, Stanghellini et al. 2005). Chez des souris axéniques, il a été montré des anomalies morphologiques (Wostmann and Bruckner-Kardoss 1959; Abrams 1977) et des dysfonctions motrices en lien avec la mise en place d'une flore anormale comme le temps de vidange gastrique, et un ralentissement du temps de transit (Abrams and Bishop 1967; Iwai, Ishihara et al. 1973). Il semblerait alors, que des perturbations de la flore commensale puissent jouer un rôle dans le développement d'une motricité altérée et donc dans l'apparition des maladies comme le syndrome de l'intestin irritable (Verdu and Collins 2004).

Des études récentes ont suggéré que la perturbation du microbiote chez le nouveau-né pourrait entraîner des conséquences permanentes. Ce serait le cas, par exemple de l'utilisation d'antibiotiques dans la petite enfance et du développement des maladies inflammatoires chroniques intestinales (Virta, Auvinen et al., 2012). Par ailleurs, des études récentes ont montré que l'utilisation d'antibiotiques à large spectre chez des rattes gestantes modifiait la colonisation bactérienne chez les rats nouveau-nés, et de ce fait certaines propriétés de la

barrière intestinale (Fak, Ahrne et al. 2008). Chez l'enfant né prématurément, l'administration d'antibiotiques prophylactiques dans les suspicions d'infections materno-foetales serait un facteur de risque supplémentaire de développer une entérocolite ulcéronécrosante (Kuppala, Meizen-Derr et al., 2011; Schumann, Nutten et al. 2005; Claud and Walker 2008). Les antibiotiques habituellement utilisés en néonatalogie sont la vancomycine (actif contre les germes gram +), les aminosides (actif contre les germes gram -) et le métronidazole (actif contre les germes anaérobies).

Le microbiote intestinal influencerait également la croissance et la différenciation des cellules épithéliales de l'intestin. Il jouerait un rôle central nutritif, sur les fonctions métaboliques, immunologiques et de protection de la barrière intestinale (O'Hara and Shanahan 2006).

### **3.2 Le butyrate en physiologie digestive**

La nature exacte des bactéries produisant les AGCC, en particulier le butyrate, reste discutée. Les principales souches pourraient appartenir, entre autres, aux genres *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* ou *Butyrivibrio* (Louis, Scott et al. 2007). La production de butyrate pourrait être indirecte, impliquant d'abord la production de lactate par une flore lactique, suivie d'une conversion du lactate en butyrate par des bactéries utilisatrices de lactate (Bourriaud, Robins et al. 2005). En résumé, la proportion des différents AGCC produits dépend de la flore elle-même, de la nature des glucides fermentés et du temps de transit intestinal.

Parmi les AGCC, le butyrate semble jouer le rôle physiologique le plus important au niveau de la muqueuse intestinale.

#### **3.2.1. Rôles du butyrate sur les fonctions de barrière du tube digestif**

Les AGCC, absorbés par la muqueuse intestinale, peuvent participer à des degrés divers au métabolisme énergétique. Leur importance dans la trophicité de l'épithélium intestinal ainsi que leur rôle dans l'intégrité de la barrière intestinale, à travers leurs effets prolifératifs, différenciateurs, et immunomodulateurs, a été souligné. Du fait de leurs nombreuses propriétés biologiques, leur emploi est actuellement envisagé dans différentes situations cliniques ainsi qu'en nutrition préventive.

- Absorption d'eau et d'ions :

Les AGCC et en particulier le butyrate sont activement absorbés par la muqueuse intestinale et ce processus est responsable du transport de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  par différents mécanismes, principalement par une stimulation de l'activité parallèle des échangeurs  $\text{Cl}^-$ /butyrate et  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et secondairement par augmentation de l'expression des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) et  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (Kunzelmann and Mall 2002). De plus, le butyrate est capable de limiter la sécrétion de  $\text{Cl}^-$ , en inhibant l'activité du co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (Matthews, Hassan et al. 1998; Resta-Lenert, Truong et al. 2001; Vidyasagar and Ramakrishna 2002). Enfin, plusieurs études ont montré le rôle stimulant des AGCC et particulièrement du butyrate sur l'absorption de l'eau (Bowling, Raimundo et al. 1993).

#### ○ Perméabilité intestinale

L'effet du butyrate sur la perméabilité intestinale dépend de sa concentration et du modèle ou des espèces utilisées :

À de faibles concentrations (jusqu'à 2 mM), le butyrate induirait une diminution dose-dépendante de la perméabilité dans des lignées de cellules Caco-2 et HT-29 (Mariadason, Barkla et al. 1997; Peng, He et al. 2007). Sur la muqueuse de côlon distal de rat montée en chambre de Ussing, le butyrate augmenterait la perméabilité paracellulaire à la concentration 10mM, mais pas à 1 ou 5 mM (Mariadason, Kiliyas et al. 1999). *In vivo*, chez des rats nourris avec un régime enrichi en fructo-oligosaccharides (FOS) dont la fermentation conduit à une augmentation des concentrations coliques d'AGCC, il y aurait une augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale (Ten Bruggencate, Bovee-Oudenhoven et al. 2005). Cependant, chez l'homme, la supplémentation quotidienne de 20 g de FOS n'a pas augmenté la perméabilité intestinale (Ten Bruggencate, Bovee-Oudenhoven et al. 2006). A l'inverse, il a été montré que le butyrate réduisait la perméabilité paracellulaire de cellules épithéliales intestinales en stimulant l'expression des protéines des jonctions serrées (ZO-1, cinguline, occludine) et l'assemblage des jonctions serrées (Bordin, D'Atri et al. 2004; Peng, Li et al. 2009)

#### ○ Prolifération et différenciation cellulaire

Les effets du butyrate sur un épithélium colique normal, *in vivo*, sont à l'opposé de ceux observés sur des cellules cancéreuses *in vitro* : stimulation de la prolifération et de la survie cellulaire versus arrêt de la croissance et induction de l'apoptose. Ces effets

contradictaires ont conduit au concept que les anglo-saxons ont nommé le « butyrate paradox ».

Sur une muqueuse colique saine, le butyrate stimule la prolifération des cellules situées à la base des cryptes (compartiment prolifératif) et favorise la survie des cellules différenciées du haut des cryptes (compartiment de maturation). Paradoxalement donc, le butyrate a une action anti-proliférative et pro-apoptotique sur les cellules cancéreuses par des mécanismes dépendants mais aussi indépendants de la transcription des gènes (Wilson, Chueh et al. 2010; Heerdt, Houston et al. 2003).

#### ○ Effets anti-inflammatoires

Le butyrate a des effets anti-inflammatoires et immuno-modérateurs suggérant un rôle important dans la régulation de l'immunité intestinale (Bohmig, Krieger et al. 1997). Ces effets impliquent l'inhibition de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Inan, Rasoulpour et al. 2000; Segain, Raingeard de la Bletiere et al. 2000). En effet, l'expression et la production de TNF $\alpha$  sont diminuées dans des biopsies coliques inflammatoires provenant de patients atteints de la maladie de Crohn, cultivées en présence de butyrate (Segain, Raingeard de la Bletiere et al. 2000). Dans les monocytes, le butyrate inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B induite par le lipopolysaccharide (LPS) (Segain, Raingeard de la Bletiere et al. 2000). Cet effet proviendrait de l'inhibition de la dégradation de l'inhibiteur cellulaire de NF- $\kappa$ B, I- $\kappa$ B *via* le blocage du protéasome (Yin, Laevsky et al. 2001).

### **3.2.2 Rôle du butyrate sur les fonctions motrices digestives**

Les effets potentiels des AGCC sur la motricité digestive des espèces non ruminantes n'ont été suggérés que vers la fin des années 80. L'interaction entre les AGCC et la motricité digestive semble différente selon la partie du TD considérée et selon les concentrations d'AGCC employées.

Dans l'estomac, les AGCC ont un effet plutôt inhibiteur de la vidange gastrique. La perfusion d'AGCC induit la relaxation du sphincter inférieur de l'œsophage (Piche, Barbara et al. 2009). Cet effet est également retrouvé après infusion iléale (Cuhe and Malbert 1999; Cuhe, Cuber et al. 2000) et après instillation colique (Ropert, Cherbut et al. 1996). Dans l'iléon, les AGCC ont une action stimulante sur la contraction musculaire (Kamath, Hoepfner et al. 1987; Kamath, Phillips et al. 1988). Dans le colon, les effets restent controversés. Chez

le chien, ils ont une action stimulante des fibres musculaires longitudinales coliques à des concentrations physiologiques. (Kamath, Hoepfner et al. 1987 ; McManus, Michel et al. 2002). Chez l'homme, aux mêmes concentrations, il n'a été retrouvé aucun effet (Champ, Molis et al. 1998). Chez le rat, le traitement de segment musculaire colique avec une solution d'AGCC à des taux de 10 à 100mM abolissent, *in vitro*, l'activité contractile spontanée (Squires, Rumsey et al. 1992). Par ailleurs, des travaux menés ces dernières années dans le laboratoire, ont mis en évidence l'action spécifique du butyrate sur l'augmentation de la proportion des neurones cholinergiques dans le plexus myentérique mais pas dans le plexus sous-muqueux, entraînant une augmentation du transit colique (Soret, Chevalier et al. 2010).

# OBJECTIFS DE L'ETUDE

Un nombre croissant d'études identifie la période post natale comme une période clef dans le développement et la maturation des fonctions digestives. Parmi les acteurs probablement impliqués dans le développement post natal des fonctions digestives est le SNE. Néanmoins à ce jour, l'évolution de son phénotype et les conséquences fonctionnelles restent encore mal connues. De plus, la période post natale est aussi caractérisée par de profondes modifications environnementales au sein du tube digestif (nutritionnelles ; colonisation du microbiote). La participation de ces facteurs environnementaux dans la régulation du développement du SNE, et de manière ultime dans son contrôle des fonctions digestives, reste aussi mal connue.

Dans ce contexte, les objectifs de la thèse étaient :

- 1/ Caractériser le développement postnatal du phénotype neurochimique du SNE, et l'impact de ce développement sur les fonctions motrices du colon de rats nouveau-nés.
- 2/ Caractériser les effets du butyrate sur le phénotype neurochimique du SNE, et sur les fonctions motrices du colon de rats nouveau-nés.
- 3/ Caractériser les conséquences d'une modification du microbiote (via traitement antibiotique) durant la période postnatale sur les fonctions digestives et le SNE chez des rats nouveau-nés

Ce travail de thèse est présenté sous la forme de trois articles (un publié en premier auteur, un publié en deuxième auteur et un en préparation).

# PUBLICATIONS



# ARTICLE 1

# **Article 1: Maturation postnatale du phénotype neurochimique du plexus myentérique et corrélation avec l'évolution de la réponse motrice colique chez le raton nouveau-né**

**Post natal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon**

**de Vries P<sup>(1-4)</sup>, Soret R<sup>(1-3)</sup>, Suply E<sup>(1-3,5)</sup>, Heloury Y<sup>(2,3,5)</sup>, Neunlist M<sup>(1-3)</sup>**

<sup>1</sup> INSERM, U913, Nantes, F-44093, France.

<sup>2</sup> Université Nantes, Nantes, F-44093, France.

<sup>3</sup> Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Nantes, Hospital Hôtel-Dieu, Nantes, F-44093, France.

<sup>4</sup> CHU Morvan, Chirurgie pédiatrique, Brest, F-29280, France.

<sup>5</sup> CHU Nantes, Chirurgie pédiatrique, Nantes, F-44093, France.

Pour répondre à la question, l'immaturation du système nerveux entérique est-elle liée au dysfonctionnement digestif observé chez les prématurés, la première étude de cette thèse a porté sur la caractérisation en condition physiologique de la maturation du système nerveux entérique en particulier myentérique, et de la mise en place des fonctions motrices coliques. Nous avons voulu caractériser dans un modèle animal immature, le raton nouveau-né, l'évolution, au cours des premiers jours de vie, du phénotype neurochimique en particulier cholinergique et nitrergique du plexus myentérique colique, et déterminer l'impact fonctionnel de ces changements sur la réponse motrice neuro-induite.

**Méthodes :** Des rats Sprague Dawley ont été sacrifiés à J1, 3, 5, 7, 14, 21 et 36. Les colons ont été prélevés pour des études immunohistochimiques et fonctionnelles *ex vivo*. Après microdissection, les plexus myentériques ont été marqués avec des anticorps fluorescents anti-acétylcholine transférase (ChAT), -nitrique oxyde synthase (NOS) et -HuC/D (marqueur neuronal général). Dans une chambre d'organe, un segment colique était relié à un transducteur de force isométrique. La réponse contractile induite par une stimulation électrique (EFS) a été étudiée en l'absence et en présence d'inhibiteur nitrergique (L-NAME) et cholinergique (Atropine).

**Résultats :** Les études immunohistochimiques ont montré une évolution morphologique du plexus myentérique et des changements phénotypiques avec l'âge : augmentation de la proportion de neurones cholinergiques, entre J1 ( $2,5 \pm 0,6$  %) et J21 ( $11,3 \pm 1,2$  %); augmentation de la proportion de neurones nitrergiques au cours de la première semaine de vie entre J1 ( $14,2 \pm 3,0$  %) et J5 ( $19,8 \pm 2,0$  %). Parallèlement, l'analyse de la motricité colique a montré l'apparition d'une activité spontanée à partir de J5, et de contractions rythmées et reproductibles à partir de J14 dont la fréquence augmentait significativement à J21 et J36 (0,02 Hz, 0,04 Hz et 0,06 Hz respectivement). D'autre part, la réponse à l'EFS visible dès J1 était sensible à la présence d'atropine à partir de J5 et de L-NAME à partir de J21.

**Conclusion :** Des modifications postnatales importantes du phénotype neurochimique du plexus myentérique après la naissance, sont corrélées à des modifications de la réponse motrice colique à la libération de neuromédiateurs. Les facteurs induisant ces modifications restent inconnus.

## Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon

P. de Vries,<sup>1,2,3,4</sup> R. Soret,<sup>1,2,3</sup> E. Suply,<sup>1,2,3</sup> Y. Heloury,<sup>2,3,5</sup> and M. Neunlist<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U913, Nantes; <sup>2</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes; <sup>3</sup>University Hospital Nantes, Hôtel Dieu, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes; <sup>4</sup>CHU Brest, Service de Chirurgie Pédiatrique, Hôpital Morvan, Brest; and <sup>5</sup>CHU Nantes, Hôpital Mère-Enfant, Service Chirurgie Pédiatrique, Nantes, France

Submitted 3 March 2010; accepted in final form 1 June 2010

**de Vries P, Soret R, Suply E, Heloury Y, Neunlist M.** Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G539–G547, 2010. First published June 3, 2010; doi:10.1152/ajpgi.00092.2010.—Profound changes in intestinal motility occur during the postnatal period, but the involvement of the enteric nervous system (ENS), a key regulator of gastrointestinal (GI) motility, in these modifications remains largely unknown. We therefore investigated the postnatal development of the ENS phenotype and determined its functional repercussion on the neuromuscular transmission in the rat colon. Sprague-Dawley rats were euthanized at postnatal day (P) 1, P3, P5, P7, P14, P21, and P36. Whole mounts of colonic myenteric plexus were stained with antibodies against choline acetyltransferase (ChAT), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and HuC/D. Colonic contractile response induced by electrical field stimulation (EFS) was investigated in organ chambers in absence or presence of *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and/or atropine. In vivo motility was assessed by measurement of the colonic bead latency time. Randomly occurring ex vivo contractions appeared starting at P5. Starting at P14, rhythmic phasic contractions occurred whose frequency and amplitude increased over time. In vivo, bead latency was significantly reduced between P14 and P21. Ex vivo, EFS-induced contractile responses increased significantly over time and were significantly reduced by atropine starting at P14 but were sensitive to L-NAME only after P21. The proportion of ChAT-immunoreactive (IR) neurons increased time dependently starting at P14. The proportion of nNOS-IR neurons increased as early as P5 compared with P1 but did not change afterward. Our data support a key role for cholinergic myenteric pathways in the development of postnatal motility and further identify them as putative therapeutic target for the treatment of GI motility disorders in the newborn.

postnatal development; enteric nervous system; myenteric plexus; rat; motility; neonates

THE POSTNATAL PERIOD is a key period of life and is particularly sensitive to the influence of various environmental factors. This period is characterized by the maturation of various organs and in particular of the gut. Indeed, various gastrointestinal (GI) functions such as intestinal barrier function or motility continue their maturation and development after birth. This is particularly true in rodents such as rats or mice, making them good models for studying GI dysfunctions observed in preterm infants, such as constipation (2).

Among the key regulators of GI functions is the enteric nervous system (ENS). The ENS has been shown to control GI

motility and intestinal barrier functions (22). Cholinergic excitatory motor neurons [identified as choline acetyltransferase (ChAT)-immunoreactive (IR)] and often colocalized with substance P and nitrgenic inhibitory motor neurons [identified as neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-IR] and often colocalized with vasoactive intestinal polypeptide (VIP), pituitary activating cyclic AMP peptide (PACAP), or adenosine triphosphate (ATP) form two functionally distinct populations of major importance in the control of peristaltic activity (7). Although major effort has been placed to study the ENS during development and in adults, data are still scarce concerning the development of the ENS phenotype and its functional impact during the postnatal period, in particular during the period ranging from birth to weaning. The ENS originates from the vagal and sacral neural crest cells and colonizes the digestive tract during the prenatal period. The entire length of the gut is colonized by embryonic day (E) 8.5 in the chick (11, 27), E14 in the mouse (29), and E16.5 in rat (16). This development of the ENS is also associated with a time-dependent differentiation of specific neurochemically identified neuronal populations that has been described mainly in the prenatal period of mice (28). In rats, 5-HT expression appears early during the embryonic life whereas other mediators appear later such as nitric oxide (NO) by E18, VIP during the suckling period, and PACAP-27 during the weaning period (13). A recent study has also shown an increase in the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) immunoreactivity in the mouse pup, which was correlated with the development of colonic migrating motor complexes (CMMCs) (19). In guinea pig, a strong NO-dependent inhibitory component was observed in the ileal longitudinal smooth muscle in neonatal tissues (younger than 2 days postnatal), which was significantly reduced in adult tissues, presumably because of the development of a tachykinergic excitatory component (3). Interestingly, in the frog, the development of a cholinergic tone was observed later in the development (24). Similarly, in the zebrafish, the development of tetrodotoxin (TTX)-sensitive motility pattern has been described to occur in the early postfertilization period (10). However, a precise early postnatal characterization of the development of the neurochemical coding and its functional impact on neurally mediated contractile response remains largely unknown.

Therefore, the aims of our study were to analyze the development of the cholinergic and nitrgenic phenotype of colonic myenteric neurons during the early postnatal days and to determine ex vivo the functional impact on the neuronally mediated contractile response in rat colon.

Address for reprint requests and other correspondence: M. Neunlist, INSERM U913 and Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, 1, place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France (e-mail : michel.neunlist@univ-nantes.fr).

## MATERIALS AND METHODS

## Animal Model

The Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes approved all the animal studies. Pregnant Sprague-Dawley rats were obtained at 13–14 days of gestation (Janvier Laboratories). Rats were accustomed to laboratory conditions for at least 1 wk before delivery and were individually housed in cages on a 12:12-h light-dark cycle with free access to food and water. Mothers and their pups (12–16 pups/litters) were kept in the same conditions during the whole experiments. Day of birth was considered as postnatal day (P) 0. Pups were euthanized at P1, P3, P5, P7, P14, P21, and P36. Pups were killed by decapitation (P0 to P14) or were anesthetized with isoflurane (5 min; Abbot) and killed by cervical dislocation (P21 to P36).

## In Vivo and Ex Vivo Measurement of Motility and Contractile Activity

*In vivo.* Distal colon transit time was measured by a protocol adapted from studies performed on mice, as previously described (12). A 2-mm diameter glass bead (Sigma) was inserted into the distal colon of rats (5 mm from the anus) by use of a glass rod with a fire-polished end. After bead insertion, rat pups were isolated in their cage without access to food and water. Distal colonic transit was determined in a single rat at a time by monitoring the time required for the expulsion of the glass bead (bead latency) from the time of its insertion. After an hour, if the bead was not eliminated, the experiment was stopped to prevent pup isolation stress and cooling.

*Ex vivo.* Segments of rat proximal colon (1 cm starting from the cecum) were cleaned of their luminal contents with oxygenated Krebs solution containing (in mM) (117 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1.2

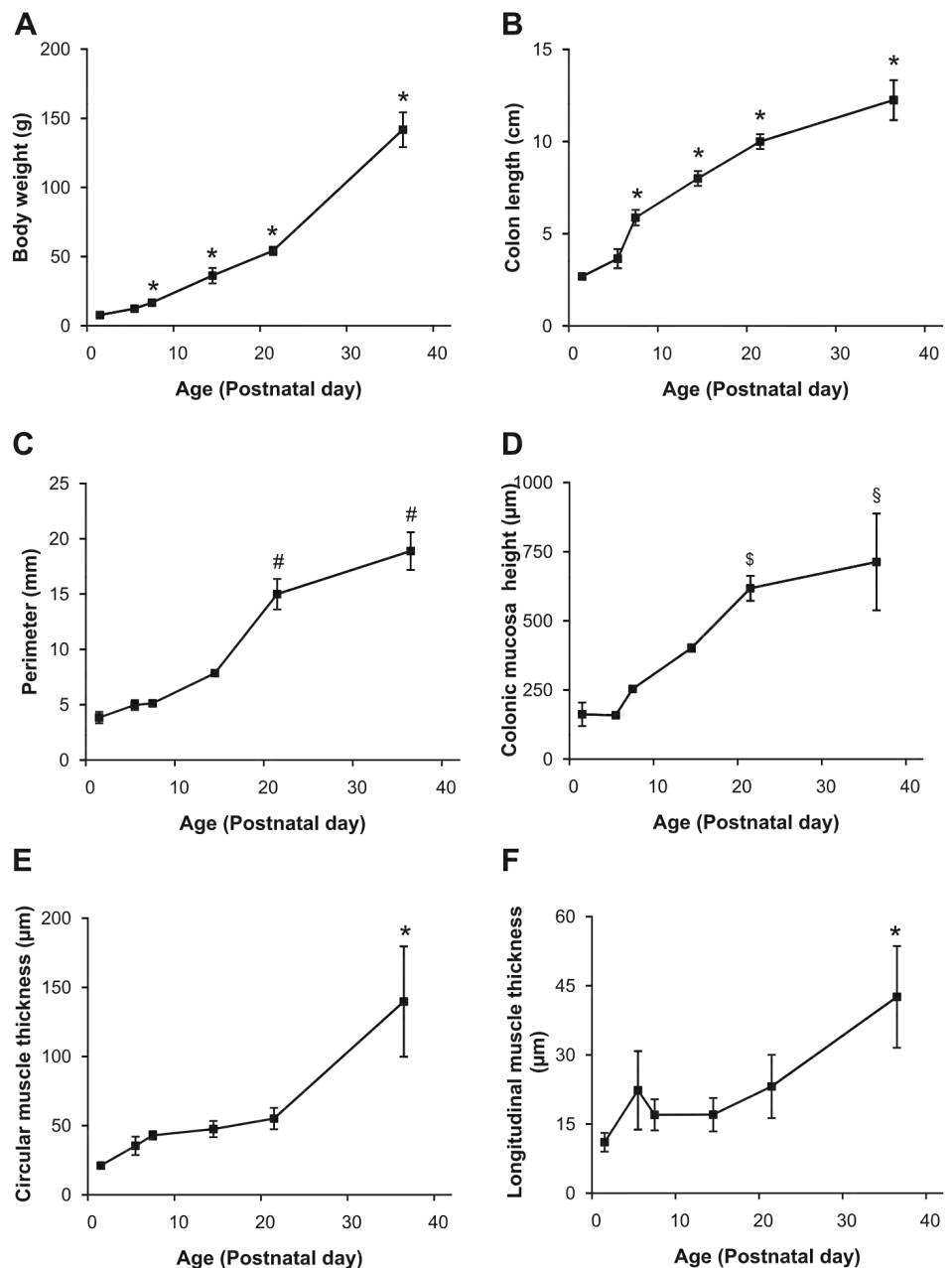


Fig. 1. Postnatal development of animal weight and colonic morphological parameters. Animal weight increased time dependently over the first 5 living weeks (A) (means  $\pm$  SE;  $n = 10$ –20; 1-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test;  $*P < 0.001$  compared with previous values). Colon length (B) and perimeter (C) increased over time [means  $\pm$  SE;  $n = 4$ –6; 1-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test;  $*P < 0.01$  compared with previous values;  $\#P < 0.001$  compared with postnatal day (P) 14 and previous]. In parallel, mucosa height (D) and circular (E) and longitudinal (F) muscle thickness increased significantly starting at 3 wk of life (means  $\pm$  SE;  $n = 4$ –6; 1-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test;  $*P < 0.05$  compared with previous values;  $\$P < 0.05$  compared with P7 value and previous values;  $\$P < 0.05$  compared with P1 value).



NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.0 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, and 11.0 glucose). Proximal colon segments were then attached in the longitudinal direction in an organ bath filled with oxygenated Krebs solution and were initially stretched with a preload of 0.2–0.8 g of tension (depending on the age of the rat) for 60 min. Neuromuscular transmission was studied following electrical field stimulation (EFS) of enteric neurons by using the following parameters: train duration 10 s, pulse frequency 20 Hz, pulse duration 300  $\mu$ s, and pulse amplitude 10 V. This procedure was repeated three times with 10-min washout periods between stimulations. The contractile response of longitudinal muscle was continuously recorded by use of isometric force transducers (Basile no. 7005, Italy), coupled to a PowerMac Performa 7100/80 computer equipped with the MacLab/4s system (ADI). To characterize the nitergic and cholinergic components of the EFS-induced contractile response, *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester (*L*-NAME) and atropine were added to the bath at a final concentration of  $5 \times 10^{-5}$  and  $10^{-6}$  M, respectively. The area under the curve (AUC) of the EFS-induced response was measured throughout the duration of the EFS (10 s). At the end of each experiment, a dose-response curve with carbachol ( $10^{-11}$  to  $10^{-4}$  M) was performed.

#### Paracellular Permeability of Proximal Colon in Ussing Chambers

Full-thickness segments of proximal colon were mounted in 2-mm-diameter Ussing chambers (Transcellab). Tissues were bathed on each side with 2 ml of DMEM (Invitrogen) containing 0.1% fetal calf serum (AbCys) continuously oxygenated and maintained at 37°C by gas flow (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>). After 15 min of equilibration, 200  $\mu$ l of apical medium was replaced by 200  $\mu$ l of sulfonic acid fluorescein (578 Dalton) (Invitrogen). The fluorescence level of basolateral aliquots of 200  $\mu$ l was measured every 30 min during 180 min using a fluorimeter (Thermo Electron). The slope of the change of fluorescence intensity over time was determined by using a linear regression fit.

#### Immunofluorescence Staining

Segments of colon (2 cm from the cecum and directly adjacent to the segment used for motility studies) were fixed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature for 3 h at 4°C. Whole mount of longitudinal muscle and myenteric plexus (LMMP) were obtained by removing the circular muscle by microdissection. Whole mounts of LMMP were first permeabilized with PBS-0.1% sodium azide-4% horse serum-Triton 1X for 3 h at room temperature. Tissues were then incubated sequentially with the primary antibodies for 3 h and the secondary antibodies for 1 h in the following order: goat anti-ChAT (1:200; Millipore) and anti-goat Cy3 (carboxymethylindocyanine) (1:500; Jackson ImmunoResearch); rabbit anti-nNOS (1:1,000; Alexis) and anti-rabbit Cy5 (7-amino-4-indodicarbocyanin) (1:500; Jackson ImmunoResearch) and mouse anti-HuC/HuD (1:200; Invitrogen) and anti-mouse FITC (fluorescein isothiocyanate) (1:500; Jackson ImmunoResearch). Pictures were then acquired with a digital camera (model DP71, Olympus, France) coupled to a fluorescence microscope (Olympus IX 50) and analyzed with the Cell B software (Soft Imaging System, Olympus). To determine the general neurochemical phenotype an average of 500 neurons were analyzed for each animal and condition. The data are expressed as the percent of ChAT-IR or nNOS-IR neurons normalized to the total number of Hu-IR neurons. Cell size was measured with Cell B software (Soft Imaging System, Olympus). For neuronal density measurement, we counted 500 neurons per experimental condition and animals with the objective  $\times 40$  (3–4 fields of view at age P1 to  $\sim 12$  fields of view at age P36).

#### Morphological Analysis

Pellet-free tubular segments of colon were fixed in 4% PFA and embedded in paraffin. Sections were made and were stained with

hematoxylin and eosin. Measurements of longitudinal and circular muscle thickness, colon perimeter, as well as crypt height were performed on five distinct fields of view ( $\times 10$ ) from four animals at each postnatal day. The colonic perimeter was estimated by calculating the perimeter of an ellipse using the following formula:  $2\pi \cdot [(a^2 + b^2)/2]^{1/2}$  where the minor axis *a* and the major axis *b* were measured under the microscope by use of a micrometer scale.

#### Statistical Analysis

The results were expressed as means  $\pm$  SE. Statistical differences were determined by paired *t*-test or one-way or two-way ANOVA, followed by post hoc test, as appropriate. *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

## RESULTS

### Postnatal Changes of Colonic Morphology

In a first step, we characterized the morphological changes of the colon occurring over the first 5 wk of life. The body weight of rats increased time dependently from  $7.8 \pm 0.5$  g at P1 to  $141.8 \pm 12.6$  g at P36 (Fig. 1A) and the colon length from  $2.7 \pm 0.1$  cm at P1 to  $12.3 \pm 1.1$  cm at P36 (Fig. 1B). The perimeter of the proximal colon increased significantly over time starting the third postnatal week (Fig. 1C). Furthermore, circular and longitudinal muscles thickness increased over time by factors of 6.6 and 3.8, respectively (Fig. 1, E and F). Finally, the height of the colonic mucosa (base of the crypt to surface epithelium) was increased by a factor of 4.4 (Fig. 1D) during the same time period of observation.

### Postnatal Development of Ex Vivo Paracellular Colonic Permeability

The flux of sulfonic acid (578 Da) was measured in an Ussing chamber in colonic segments. No change in sulfonic acid flux was measured between P1 and P21 (Fig. 2).

### Postnatal Development of In Vivo and Ex Vivo Motility

In vivo measurement of colonic transit revealed that bead expulsion time was longer than 1 h at P14 for all the pups. Bead expulsion time was  $438 \pm 343$  s at P17 and was

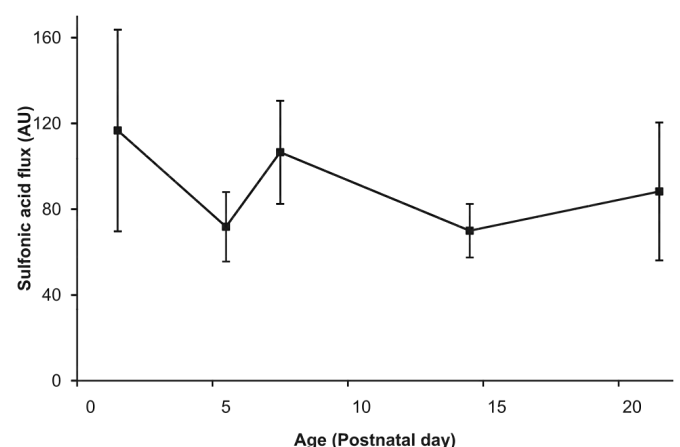


Fig. 2. Postnatal development of ex vivo paracellular permeability. The colonic permeability to sulfonic acid measured in Ussing chambers remained constant over the first 3 postnatal wk (means  $\pm$  SE; *n* = 4–6; 1-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test). AU, arbitrary units.

significantly reduced at P21 ( $371 \pm 246$  s) ( $n = 10-15$ ,  $t$ -test;  $P < 0.0001$ ).

Spontaneous basal motility patterns were assessed in longitudinal colonic muscle segments (Fig. 3A). At P1 and P3, no spontaneous contractile activity was detected in any of the tissues evaluated ( $n = 8$  and  $11$ , respectively). However, at P7, 50% of the segments exhibited randomly occurring spontaneous contraction of low amplitude. Between P14 and P21 ~80% of the segments exhibited spontaneous contractions whereas at P36 spontaneous contractions were detected in all tissues. The frequency (Fig. 3B) and amplitude (Fig. 3C) of spontaneous contractions increased significantly at P36 compared with P7.

#### Postnatal Development of Myenteric Plexus Morphology

Immunohistochemical analysis with antibodies directed against Hu was performed to define the ganglia and neurons organization and density. We first showed a time-dependent development of ganglia organization. At P1, neurons were organized in continuous rows parallel to the circular muscle and only rarely could individual ganglia be clearly identified (Fig. 4A). Starting at P7, sparse individual ganglia could be detected (Fig. 4B). At P21 and P36, the ENS was organized as a network of individual ganglia connected by interganglionic fiber strands (Fig. 4, C and D). Quantitative analysis showed a

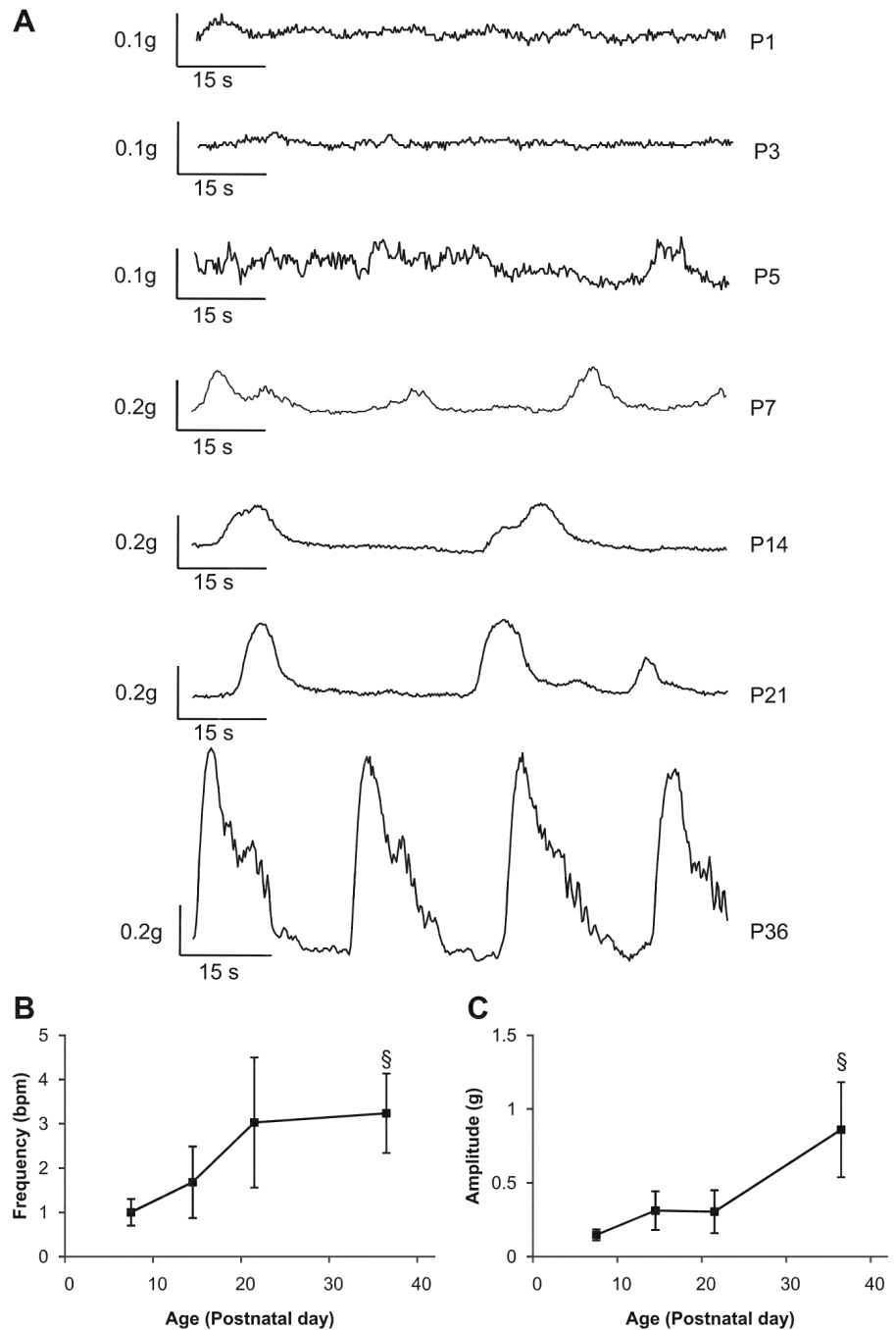


Fig. 3. Postnatal development of ex vivo spontaneous basal motility of colonic longitudinal muscle strips. At P1 ( $n = 8$ ) and P3 ( $n = 4$ ), no spontaneous contractile activity could be detected. At P5 ( $n = 12$ ) few segments and at P7 ( $n = 8$ ) 50% of the segments exhibited randomly occurring spontaneous contraction of low amplitude. At P14 ( $n = 6$ ), P21 ( $n = 10$ ), and P36 ( $n = 8$ ), segments exhibited rhythmic spontaneous contraction (A). Quantitative analysis of amplitude (B) and frequency (C) of the contractions revealed a significant increase in these parameters at P36 compared with P7 (means  $\pm$  SE; 1-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test;  $\$P < 0.05$  compared with P7).

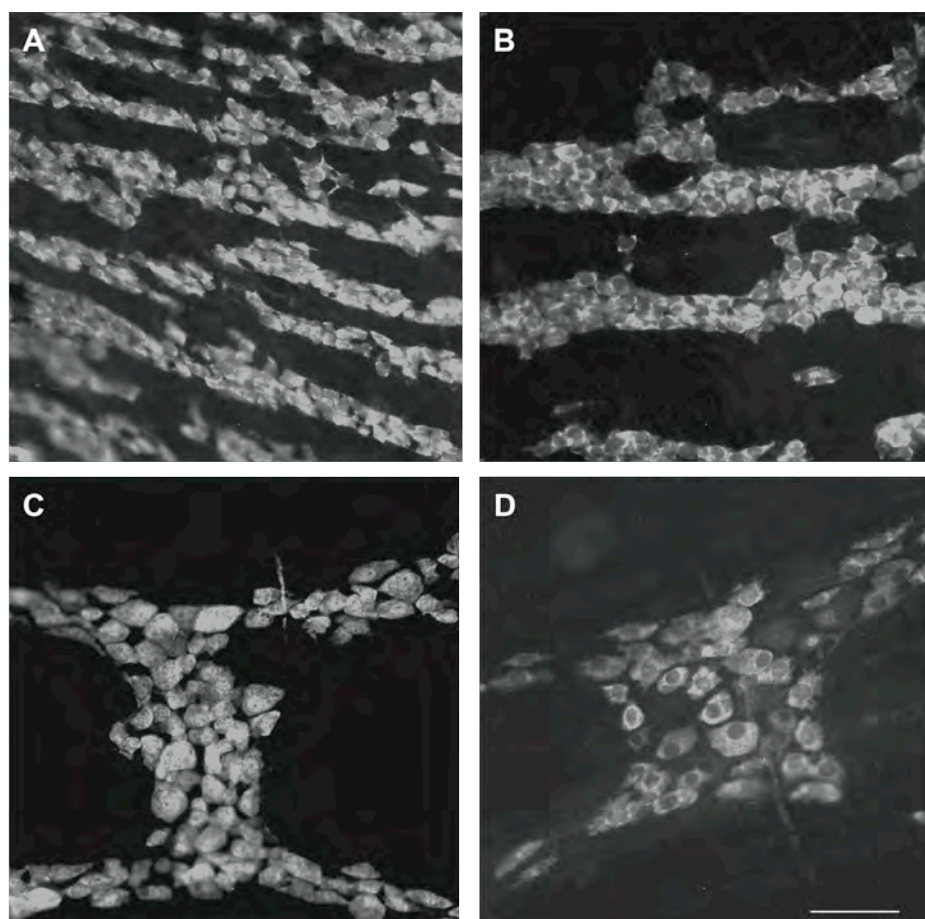
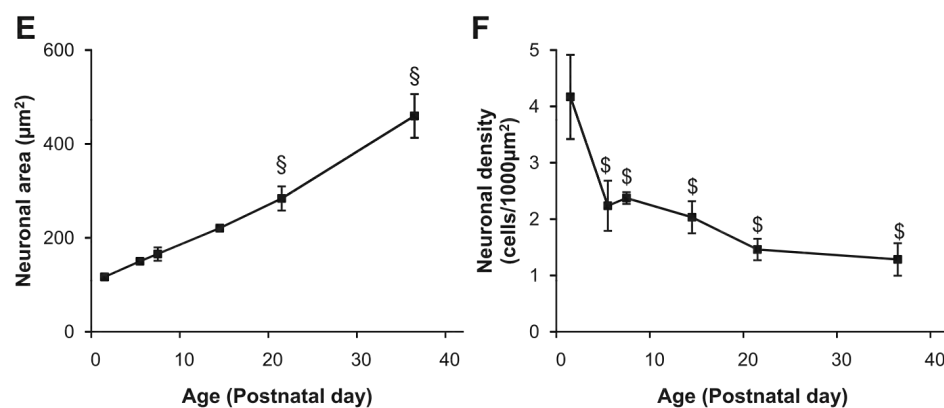


Fig. 4. Postnatal development of myenteric plexus organization and myenteric neurons morphology. Whole mount preparations of myenteric plexus of rat pup colonic specimens at P1 (A), P7 (B), P21 (C), and P36 (D) stained with a general neuronal marker Hu. At P1, neurons were organized in continuous rows parallel to the circular muscle. After P14, the enteric nervous system was organized as a network of individual ganglia connected by interganglionic fiber strands. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . Quantitative analysis showed a significant increase of neuronal surface area (E) and a decrease of cell density (F) over time (means  $\pm$  SE;  $n = 6$ ; 1-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test;  $\$P < 0.05$  compared with P7 and previous,  $\$P < 0.05$  compared with P1) (scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ).



time-dependent increase in neuronal cell surface area starting at P21 (Fig. 4E). In addition, neuronal cell density was significantly reduced as early as P7 compared with P1 (Fig. 4F).

#### Postnatal Development of Neurochemical Phenotype in Myenteric Neurons

Triple immunohistochemical staining with antibodies against Hu, ChAT and nNOS was performed on colonic samples with different postnatal age (Fig. 5, A–J). Quantitative analysis showed at P1, few neurons identified with Hu were also ChAT-IR ( $2.3 \pm 1\%$ ) (Fig. 5J). The proportion of ChAT-IR neurons remained unchanged until P7. However, at P14, the proportion of ChAT-IR

neurons was significantly increased ( $6.5 \pm 1.8\%$ ) compared with P1. At P21 and P36 this proportion was significantly larger than at P14 ( $10.9 \pm 2.6$  and  $12.7 \pm 3.4\%$ , respectively). Analysis of the nNOS-IR population revealed a time-dependent increase in the proportion of nNOS-IR neurons starting at P5 compared with P1 (Fig. 5K). However, starting at P5 the proportion of nNOS-IR neurons remained unchanged until P36.

#### Postnatal Development of EFS-Induced Contractile Response in the Colonic Longitudinal Muscle

Colonic longitudinal muscle segments were stimulated by EFS, and EFS-induced AUC was analyzed in absence or in



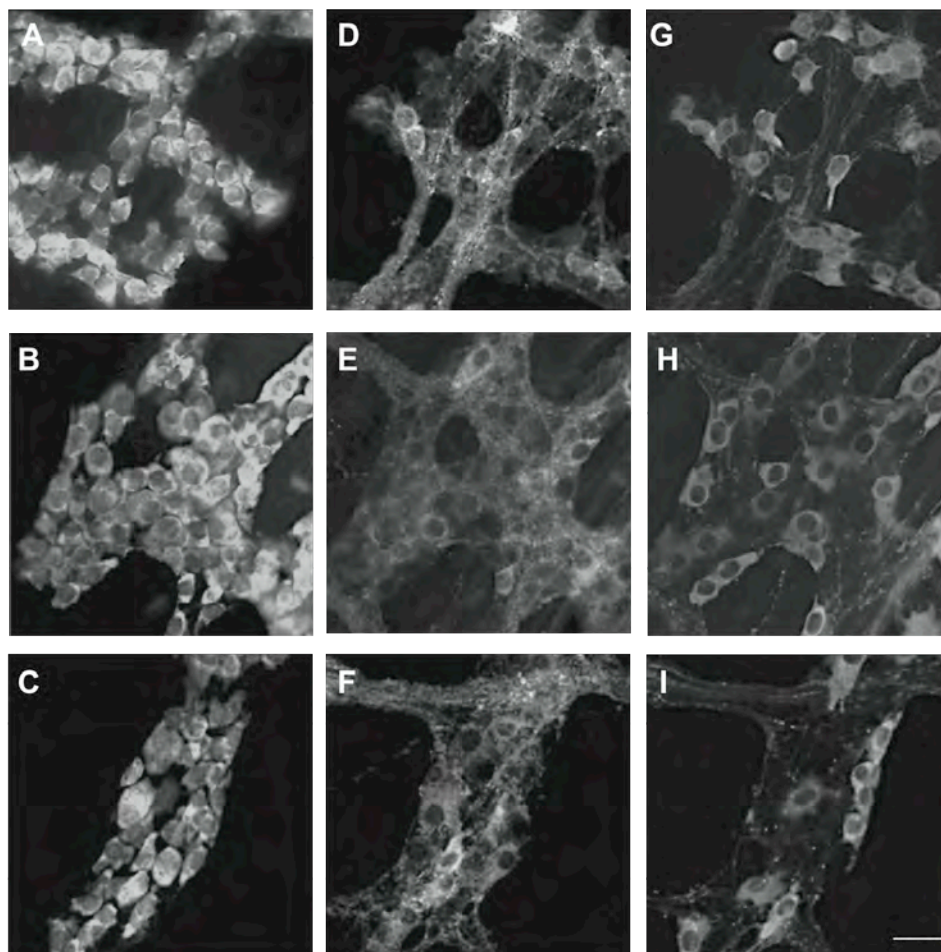
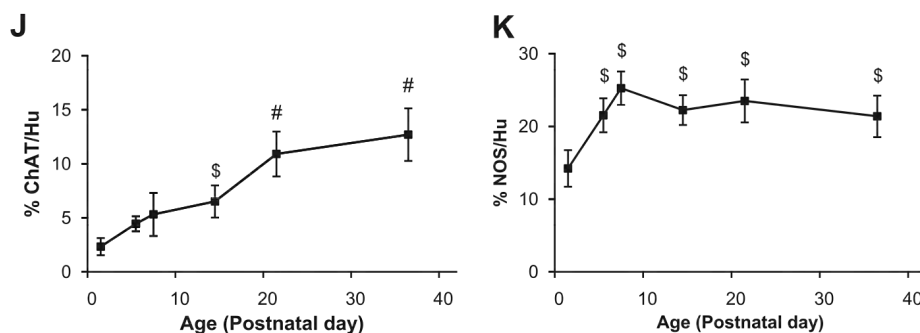


Fig. 5. Postnatal plasticity of the myenteric neurochemical phenotype. Triple immunohistochemical staining with antibodies against Hu (A, B, C), ChAT (D, E, F), and nNOS (G, H, I), on P7 (A, D, G), P14 (B, E, H), and P21 (C, F, I). Quantitative analysis showed a time-dependent increase in the proportion of ChAT-immunoreactive (IR) neurons (J) (normalized to Hu) during the postnatal period (means  $\pm$  SE;  $n = 6$ ; 1-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test;  $^{\$}P < 0.05$  compared with P1,  $^{\#}P < 0.05$  compared with P14 and previous). Quantitative analysis showed a time-dependent increase in the proportion of nNOS-IR neurons (K) only in the first postnatal week of life. (means  $\pm$  SE;  $n = 6$ ; 1-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparison test;  $^{\$}P < 0.05$  compared with P1) (scale bar = 50  $\mu$ m).



presence of L-NAME and atropine (Fig. 6A). The EFS-induced AUC increased significantly over time starting at P14 compared with P1 but remained unchanged thereafter ( $2.3 \pm 1.1$  vs.  $0.4 \pm 0.2$  g·s, respectively;  $n = 6$  and  $7$ , respectively) (Fig. 6B). In presence of L-NAME, EFS-induced AUC was significantly increased compared with control only at P36 ( $3.6 \pm 1.8$  vs.  $2.5 \pm 1.7$  g·s,  $n = 8$ ). In presence of atropine, EFS-induced AUC was significantly reduced compared with EFS-induced AUC induced in presence of L-NAME starting at P14 ( $0.4 \pm 0.3$  vs.  $1.7 \pm 1.0$  g·s,  $n = 6$ ) until P36 ( $n = 8$ ).

#### DISCUSSION

Our study revealed major modifications of gut morphology and functions, in particular colonic motility, during the early

postnatal period ranging from birth to weaning. These changes were associated with an increase in the proportion of myenteric neurons that showed NOS or ChAT immunoreactivity and ganglia organization.

One of the major results of this study is the identification of a postnatal increase in the myenteric cholinergic phenotype and a concomitant development of a cholinergic neuromuscular transmission. This study further reinforces the role of excitatory pathways, of cholinergic (and probably also tachykinergic) origin, in the development of motility during the postnatal period both in mammalian and nonmammalian species. Indeed, in mice, postnatal development of CMMC appeared to parallel the development of cholinergic fibers (identified with VAcHT) in the circular muscle (19). Similarly, in guinea pig neonates,

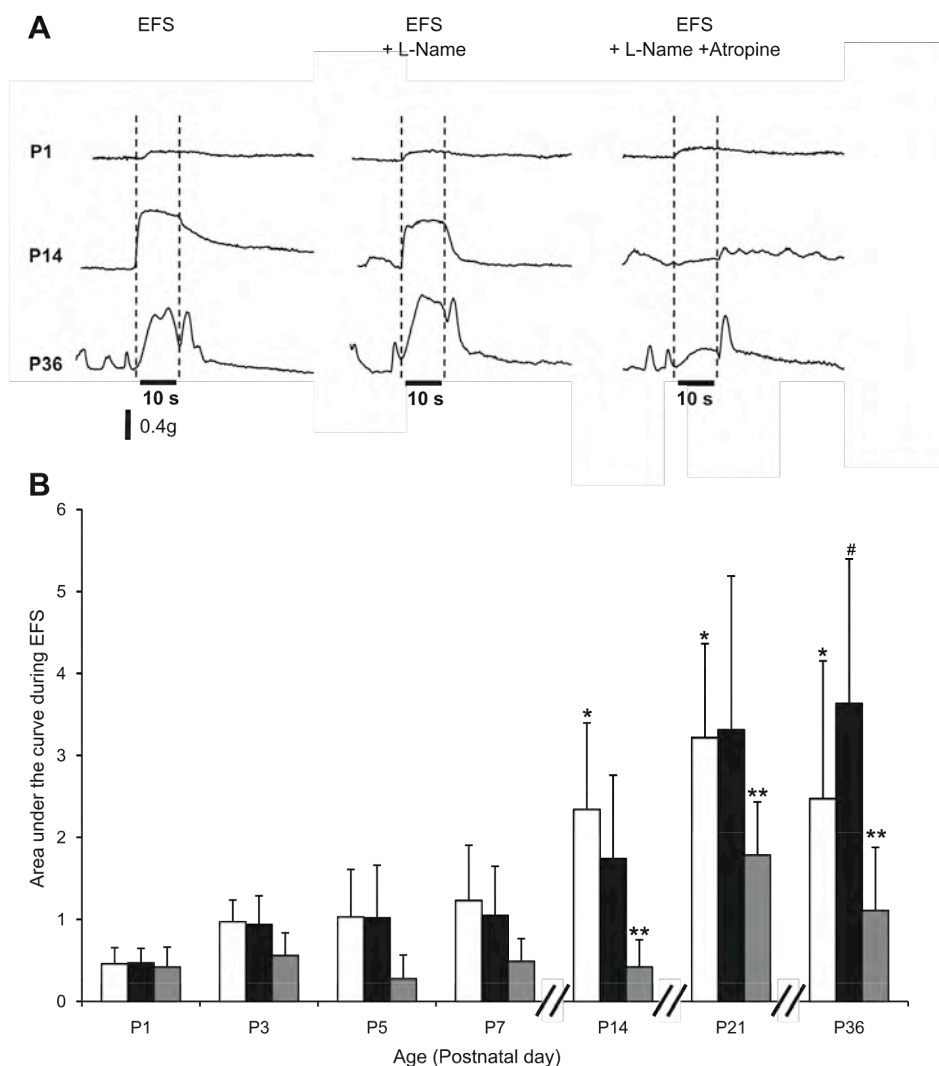


Fig. 6. Postnatal development of electrical field stimulation (EFS)-induced contractile response in the colon. Colonic longitudinal muscle strips were submitted to EFS and EFS-induced area under the curve (AUC) was analyzed in absence or in presence of *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester (L-NAME) and atropine (A). Quantitative analysis showed that the EFS-induced AUC significantly increased starting at P14 compared with P1 in control condition (B, open bars), L-NAME significantly increased EFS-induced AUC only at P36 compared with control (B, solid bars). In contrast, atropine inhibited EFS-induced AUC as early as on P14 compared with the condition in presence of L-NAME (B, shaded bars) (means  $\pm$  SE;  $n = 6-10$ ; 2-way ANOVA on repeated measures followed by Bonferroni *t*-test; \* $P < 0.05$  compared with previous AUC in control condition measures, # $P < 0.05$  compared with control condition, \*\* $P < 0.05$  compared with L-NAME condition).

excitatory tachykinergic neuromuscular transmission has also been shown to occur later in the postnatal period (3). In addition, EFS-evoked excitatory junction potentials could be evoked in the colon of late fetal (E17) mice (26). However, in these studies, the precise time course of the cholinergic phenotype apparition and functional impact on neuromuscular transmission remained largely unknown. In the present study, we identified that major changes in cholinergic phenotype and neuromuscular transmission occurs during the second and third weeks of life in rats. This period of life corresponds in rats to the weaning period (i.e., at 17–21 days after birth) (14) and therefore to a profound modification of their alimentation. Whether changes in nutritional habits are cause or consequence of the phenotypical or functional changes observed remains currently unknown but will be discussed later. Interestingly, cholinergic transmission appears also later in the development of the frog larvae and the changes occur concomitantly with the onset of feeding (24).

The absence of L-NAME-sensitive neuromuscular transmission observed in our study, although nNOS-IR neurons were present, could be due to several reasons. First, it has been shown that longitudinal muscle in the guinea pig received a

predominant cholinergic innervation in the small intestine (5) and colon (15), although a small proportion of nNOS-IR neurons also innervate colonic longitudinal muscle (15). Alternatively, L-NAME-sensitive EFS-induced relaxation could have been hard to identify, since the basal tone was maintained low at P1–P7, the tissue was fragile, and limited stretch was applied. Consistently, in the guinea pig, NO-dependent neuromuscular transmission was studied after precontraction of the longitudinal muscle with histamine (3). The absence of L-NAME sensitive response in our study is, however, probably not due to the inability of the muscle to respond to NO since the NO donor sodium nitroprusside induced relaxation in acetylcholine (ACh)-precontracted longitudinal muscle (data not shown). Conversely, the absence of atropine-sensitive neuromuscular transmission in the early postnatal days reported in this study is probably not due to an absence of sensitivity of muscle to acetylcholine since acetylcholine induced a contraction as early as P1 (data not shown). Changes in neuromuscular transmission observed in the longitudinal muscle probably also extend to the circular muscle because 1) cholinergic and nitrergic myenteric neurons innervate circular muscle and 2) a time-dependent increase in the density of VAcHT-IR terminals



was observed in the circular muscle, increasing significantly at the time when spontaneous CMMCs started to occur (19).

Another major finding of the study was the differential time-dependent development of the proportion of nNOS- and ChAT-IR neurons. Although the proportion of nNOS-IR neurons increased within the first postnatal week, it remained constant thereafter. In contrast, the proportion of ChAT-IR neurons did not change during the first postnatal week but started to increase by P14 and thereafter. A similar development of these two populations has also been reported in other species such as mice, in which nNOS-IR neurons appear by E11.5 and ChAT-IR around E18.5 (9), although ACh could be detected between E10 and E12 (20). In contrast, Vannucchi and Faussonne-Pellegrini (25) showed that the proportion of ChAT-IR cells did not change from P5 to 3 mo postnatal, suggesting that maturation occurred during the period from E18 to P5. This discrepancy could be due to the technique used to evaluate the proportion of ChAT neurons, i.e., sections compared with whole mounts in our study and also to the low number of animals studied (i.e., 2 per group). Interestingly, a similar delay in the expression of ChAT and nNOS has also been reported in zebrafish, in which nNOS expression is present as early as 4 days postfertilization (dpf) and ChAT expression is still absent by 13 dpf, although ChAT is expressed throughout the adult zebrafish intestine (17). The mechanisms responsible for this time-dependent neurochemical plasticity remain currently unknown but could associate both environmental and/or genetic factors. Although establishment of neurochemical coding has been shown to be under the control of various transcription factors such as Phox2b, Sox10, Mash1, Pax3, Hand2, and Hlx (9), the impact of environmental factors on their expression remains largely unknown. Among the putative environmental factors involved during the postnatal period are nutritional factors (related or not to the establishment of the flora). Indeed, during the postnatal period, nutritional changes can induce neuroplastic changes in enteric neurons. In particular, Gomes et al. (8) showed that protein deprivation throughout pregnancy and for 42 days postnatal decreased acetylcholine esterase staining and ChAT-IR in the small intestine compared with normally fed rat pup. Other nutritional factors such as butyrate, which is a short-chain fatty acid produced by bacterial fermentation and whose concentration increases during the early postnatal period (1), has been shown to directly increase the proportion of ChAT-IR but not nNOS-IR neurons in adult (23). Interestingly, neuronal activity that can be modulated by various environmental factors (mechanical stimuli, luminal factors) could also be involved in the postnatal neuroplastic changes observed, in particular as increasing neuronal activity in the ENS-upregulated VIP and tyrosine hydroxylase expression (6), and in E11.5 and E12.5 hindgut explants TTX reduced the number of nNOS neurons (9).

Besides changes in neurochemical phenotype, other changes have been highlighted in this study. In particular, we observed, as others (21), a time-dependent reduction of myenteric neurons density and an increase in neuronal area. These changes occurred in parallel to changes in gut morphology and in particular in colon perimeter, suggesting mechanical factor such as distension involved in the previous changes. Consistent, Brehmer et al. (4) have reported an increase in neuronal

cell body in gut hypertrophic segments. Surprisingly, we did not measure any ex vivo changes in sulfonic acid flux across the colonic mucosa in the Ussing chamber. It is tempting to speculate that this net absence of change could be due to a concomitant increase in intestinal epithelial barrier surface (observed in our study) and a reduction in paracellular permeability per surface of intestinal epithelial barrier due to a postnatal maturation of tight junction (18).

In conclusion, our study highlights the profound early postnatal changes in neurochemical phenotype and neuromuscular functions in the colon. This study further sets the basis for targeting cholinergic neurons for the treatment of dysmotility syndrome and in particular constipation in the newborn. Indeed, impaired intestinal or colonic motility is a major problem encountered in preterm newborn or in children with obstructive syndromes such as atresia or laparoschisis. Therefore, therapies aimed at enhancing the "maturation" of the cholinergic phenotype by nutritional approaches such as butyrate could be of great interest in these pathologies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the physicians of Brest pediatric surgery department, who allowed to free time for this study and the technicians of the animal nursing facility of the UTE (unité thérapeutique expérimentale) of Nantes.

#### GRANTS

Part of this work was supported by a grant of Cephalon to E. Suply. M. Neunlist is a recipient of a Contrat d'Interface Inserm. R. Soret was supported by a grant of the Pays de la Loire.

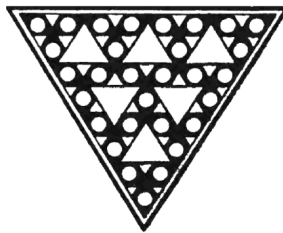
#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

#### REFERENCES

1. Barrat E, Michel C, Poupeau G, David-Sochard A, Rival M, Pagniez A, Champ M, Darmaun D. Supplementation with galactooligosaccharides and inulin increases bacterial translocation in artificially reared newborn rats. *Pediatr Res* 64: 34–39, 2008.
2. Berseth C. Gastrointestinal motility in the neonate. *Clin Perinatol* 23: 179–190, 1996.
3. Bian X, Burda JE, Carrasquillo M, Galligan JJ. Postnatal downregulation of inhibitory neuromuscular transmission to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. *Neurogastroenterol Motil* 21: 969–977, 2009.
4. Brehmer A, Gobel D, Frieser M, Graf M, Radespiel-Troger M, Neuhuber W. Experimental hypertrophy of myenteric neurons in the pig: a morphometric study. *Neurogastroenterol Motil* 12: 155–162, 2000.
5. Brookes SJ, Song ZM, Steele PA, Costa M. Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. *Gastroenterology* 103: 961–973, 1992.
6. Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P, Neunlist M. Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol* 586: 1963–1975, 2008.
7. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81: 87–96, 2000.
8. Gomes OA, Castelucci P, de Vasconcellos Fontes RB, Liberti EA. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: a quantitative morphological study. *Auton Neurosci* 126–127: 277–284, 2006.
9. Hao MM, Young HM. Development of enteric neuron diversity. *J Cell Mol Med* 13: 1193–1210, 2009.
10. Holmberg A, Olsson C, Hennig GW. TTX-sensitive and TTX-insensitive control of spontaneous gut motility in the developing zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *J Exp Biol* 210: 1084–1091, 2007.
11. Le Douarin NM, Teillet MA. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 30: 31–48, 1973.

12. **Martinez V, Wang L, Rivier JE, Vale W, Tache Y.** Differential actions of peripheral corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 611–617, 2002.
13. **Matini P, Mayer B, Faussone-Pellegrini MS.** Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. *Cell Tissue Res* 288: 11–23, 1997.
14. **Miyata T, Minai Y, Haga M.** Association of the suckling-weaning transition with development of the hypothalamic arcuate nucleus neurons in rat pups. *Exp Anim* 58: 61–66, 2009.
15. **Neunlist M, Michel K, Aube AC, Galmiche JP, Schemann M.** Projections of excitatory and inhibitory motor neurones to the circular and longitudinal muscle of the guinea pig colon. *Cell Tissue Res* 305: 325–330, 2001.
16. **Newgreen DF, Hartley L.** Extracellular matrix and adhesive molecules in the early development of the gut and its innervation in normal and spotting lethal rat embryos. *Acta Anat (Basel)* 154: 243–260, 1995.
17. **Olsson C, Holmberg A, Holmgren S.** Development of enteric and vagal innervation of the zebrafish (*Danio rerio*) gut. *J Comp Neurol* 508: 756–770, 2008.
18. **Pacha J.** Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev* 80: 1633–1667, 2000.
19. **Roberts RR, Murphy JF, Young HM, Bornstein JC.** Development of colonic motility in the neonatal mouse—studies using spatiotemporal maps. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G930–G938, 2007.
20. **Rothman TP, Gershon MD.** Phenotypic expression in the developing murine enteric nervous system. *J Neurosci* 2: 381–393, 1982.
21. **Schafer KH, Hansgen A, Mestres P.** Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat Rec* 256: 20–28, 1999.
22. **Schemann M, Neunlist M.** The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16, Suppl 1: 55–59, 2004.
23. **Soret R, Chevalier J, de Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, Segain JP, Neunlist M.** Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology* 5: 1772–1782, 2010.
24. **Sundqvist M, Holmgren S.** Ontogeny of excitatory and inhibitory control of gastrointestinal motility in the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1138–R1144, 2006.
25. **Vannucchi MG, Faussone-Pellegrini MS.** Differentiation of cholinergic cells in the rat gut during pre- and postnatal life. *Neurosci Lett* 206: 105–108, 1996.
26. **Ward SM, Harney SC, Bayguinov JR, McLaren GJ, Sanders KM.** Development of electrical rhythmicity in the murine gastrointestinal tract is specifically encoded in the tunica muscularis. *J Physiol* 505: 241–258, 1997.
27. **Yntema CL, Hammond WS.** The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol* 101: 515–541, 1954.
28. **Young HM.** Functional development of the enteric nervous system—from migration to motility. *Neurogastroenterol Motil* 20, Suppl 1: 20–31, 2008.
29. **Young HM, Ciampoli D, Hsuan J, Canty AJ.** Expression of Ret-, p75(NTR)-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut. *Dev Dyn* 216: 137–152, 1999.



# ARTICLE 2

## **Article 2 : Les lavements de butyrate chez le raton nouveau-né accélèrent le développement phénotypique cholinergique et nitrergique du plexus myentérique et la transmission neuromusculaire**

**Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon**

**Suply E<sup>(1-3,5)</sup>, de Vries P<sup>(1-4)</sup>, Soret R<sup>(1-3)</sup>, Cossais F<sup>(1-3)</sup>, Neunlist M<sup>(1-3)</sup>**

<sup>1</sup> INSERM, U913, Nantes, F-44093, France.

<sup>2</sup> Université Nantes, Nantes, F-44093, France.

<sup>3</sup> Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Nantes, Hospital Hôtel-Dieu, Nantes, F-44093, France.

<sup>4</sup> CHU Morvan, Chirurgie pédiatrique, Brest, F-29280, France.

<sup>5</sup> CHU Nantes, Chirurgie pédiatrique, Nantes, F-44093, France.

Après avoir caractérisé le SNE du raton nouveau-né, la deuxième partie de la thèse visait à évaluer l'impact de facteurs exogènes sur la maturation du SNE. Parmi les facteurs expérimentaux ayant fait la preuve de leur impact sur le phénotype neurochimique des colons de rats adultes, se trouvait le butyrate. Nous avons donc étudié l'impact de lavement de butyrate 2,5 mM sur le développement de la motricité colique *ex vivo* et *in vivo*, et sur le développement du phénotype neurochimique du plexus myentérique, en particulier cholinergique et nitreurgique chez le raton nouveau-né de la naissance au sevrage.

**Méthodes :** Des lavements coliques contenant du butyrate ont été réalisés quotidiennement de J7 à J17 de vie. La tolérance à ce traitement a été évaluée cliniquement grâce à la courbe de poids, après sacrifice sur l'aspect et la longueur du colon, puis microscopiquement sur la morphologie de la paroi intestinale. Après microdissection, les plexus myentériques ont été marqués avec des anticorps fluorescents anti-acétylcholine transférase (ChAT), -nitrique oxyde synthase (NOS) et -HuC/D (marqueur neuronal général). La motricité colique a été étudiée *in vivo* par le test à la bille et *ex vivo* en chambre d'organe. La même étude pharmacologique sur la réponse à la stimulation électrique était conduite avec le L-NAME et l'atropine.

**Résultats :** Les lavements de butyrate n'influençaient pas la croissance du raton, ni la trophicité du tissu colique. Les proportions de neurones cholinergiques et nitreurgiques étaient significativement augmentées par le traitement, tandis que la motricité colique *in vivo* était accélérée. Par ailleurs, ces résultats étaient corrélés à la réponse contractile longitudinale neuromédiée *ex vivo*. Après traitement par butyrate, la contraction spontanée était significativement plus ample (0.9 +/- 0.1 vs 0.4 +/- 0.3 mN/g de tissus; n=6; P=0.02) ainsi que la contraction induite par EFS. Les effets du L-Name et de l'atropine étaient significativement plus marqués dans le groupe traité par le butyrate.

**Conclusion :** L'apport de facteurs exogènes d'intérêt tel que le butyrate, en lavement colique, permet d'induire des modifications des fonctions digestives accompagnées d'une plasticité du phénotype neurochimique des neurones myentériques. L'utilisation à terme de ces facteurs pourrait permettre chez l'enfant prématuré d'améliorer la prise en charge digestive.



## Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon

Etienne Suply,<sup>1–5</sup> Philine de Vries,<sup>1–4,6</sup> Rodolphe Soret,<sup>1–4</sup> François Cossais,<sup>1–4</sup> and Michel Neunlist<sup>1–4</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR913, Nantes, France; <sup>2</sup>Université Nantes, Nantes, France; <sup>3</sup>Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Nantes, Hôpital Hôtel-Dieu, Nantes, France; <sup>4</sup>Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Nantes, France; <sup>5</sup>Service de chirurgie pédiatrique, Hôpital Mère-Enfant, CHU Nantes, Nantes, France; and <sup>6</sup>Service de chirurgie pédiatrique, CHU Brest, Brest, France

Submitted 24 August 2011; accepted in final form 29 March 2012

**Suply E, de Vries P, Soret R, Cossais F, Neunlist M.** Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302: G1373–G1380, 2012. First published April 5, 2012; doi:10.1152/ajpgi.00338.2011.—Postnatal changes in the enteric nervous system (ENS) are involved in the establishment of colonic motility. In adult rats, butyrate induced neuroplastic changes in the ENS, leading to enhanced colonic motility. Whether butyrate can induce similar changes during the postnatal period remains unknown. Enemas (Na-butyrates) were performed daily in rat pups between postnatal day (PND) 7 and PND 17. Effects of butyrate were evaluated on morphological and histological parameters in the distal colon at PND 21. The neurochemical phenotype of colonic submucosal and myenteric neurons was analyzed using antibodies against Hu, choline acetyltransferase (ChAT), and neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Colonic motility and neuromuscular transmission was assessed *in vivo* and *ex vivo*. Butyrate (2.5 mM) enemas had no impact on pup growth and histological parameters compared with control. Butyrate did not modify the number of Hu-immunoreactive (IR) neurons per ganglia. A significant increase in the proportion (per Hu-IR neurons) of nNOS-IR myenteric and submucosal neurons and ChAT-IR myenteric neurons was observed in the distal colon after butyrate enemas compared with control. In addition, butyrate induced a significant increase in both nitrergic and cholinergic components of the neuromuscular transmission compared with control. Finally, butyrate increased distal colonic transit time compared with control. We concluded that butyrate enemas induced neuroplastic changes in myenteric and submucosal neurons, leading to changes in gastrointestinal functions. Our results support exploration of butyrate as potential therapy for motility disorders in preterm infants with delayed maturation of the ENS.

enteric nervous system; colonic motility; postnatal period

THE PERINATAL PERIOD IS A critical period of life during which major adaptive processes occur in various organs, such as the gastrointestinal (GI) tract. Indeed, although the GI tract is established early in embryogenesis, its maturation is still ongoing after birth. In particular, the intestinal mucosa shows important structural changes after birth (6), associated with changes in intestinal barrier functions such as paracellular permeability (33, 35). Moreover maturation of the immune system occurs during the postnatal period (30). In addition, these changes observed during this period also affect GI motility, as highlighted by studies performed in preterm infants.

Address for reprint requests and other correspondence: M. Neunlist, INSERM UMR 913, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Univ. Hospital Hotel Dieu, 1, Place Alexis Ricordeau, 44093 NANTES (e-mail: michel.neunlist@univ-nantes.fr).

Preterm infants have immature GI motility patterns compared with term infants. In particular, duodenal clustered phasic contractions are more frequent, but the duration and amplitude of the clusters are smaller in preterm compared with term infants. In addition, the antroduodenal coordination is lower in preterm than in term infants (22). In the small intestine, clustered phasic contractions appear between 31 and 34 wk of gestation (WG), but only 50% of them are propagated aborally. With term, these clusters increase in duration and frequency, and a larger proportion of them are aborally propagated (4). In the colon of term infants, propulsive motor activity occurs only 24–48 h after birth, leading to meconium expulsion (3). However, the delay until the beginning of meconium expulsion and the overall duration of the meconium expulsion is larger in preterm than in term infants (3). Altogether, the whole gut transit time is increased in preterm compared with term infants (28). This reduced GI motor activity is then responsible for gastric stasis (36) and prolonged ileus (39) and is also probably involved in the pathogenesis of digestive complications observed in preterm infants such as necrotizing enterocolitis (26) and spontaneous intestinal perforation (5). In addition, severe GI motility dysfunctions observed in populations of preterm infants can prevent enteral feeding, leading to a prolonged parenteral nutrition and associated morbidity (16, 40). Therefore, approaches aiming at enhancing the maturation of GI functions, in particular colonic motility, could be of major therapeutic interest.

Among the key regulators of the GI motility is the enteric nervous system (ENS) (38). The ENS is a neuronal network organized in two major plexus locations (myenteric and submucosal plexus) located all along the gut. Myenteric neurons control GI motility and in particular peristalsis (25). Excitatory myenteric motoneurons contain acetylcholine and substance P that induce smooth muscle contraction, whereas inhibitory motoneurons contain nitric oxide (NO) and vasointestinal peptide, which induce muscle relaxation (15). Although the GI tract is fully colonized by the ENS during embryogenesis [embryonic day 9–15 in mice (9, 21), WG 4–7 in humans (13, 45)], increasing data suggest that maturation of the ENS still occurs after this colonization, even after birth (20). In particular, in rat neonates, the proportion of nitrergic myenteric neurons increases early in the postnatal life followed by a significant increase in the proportion of cholinergic neurons (44). In the human and guinea pig small intestine, a stronger nitrergic inhibitory component of the neuromuscular transmission is observed in neonates than in adults (32, 46). The maturation of the cholinergic phenotype of myenteric neurons is correlated with the development of colonic migrating motor complexes in mice (37) and colonic propulsive motility in rats



(44). However, environmental factors putatively involved in the postnatal maturation of the ENS and colonic motility remain unknown.

Among such factors, nutrients or nutrient-derived products such as short-chain fatty acids (SCFAs) could play a critical role. SCFAs are metabolites resulting from bacterial fermentation of resistant starch (43). Concentrations of SCFAs in the colon increase both in humans and rats after birth (2, 31). Fecal concentrations of SCFAs are 3.2-fold lower in infants born before 33 WG compared with infants born after (12). In rat pups, butyrate concentration in ceco-colonic content increases from 3 to 33  $\mu\text{mol/g}$  between postnatal day (PND) 18 and PND 40 (2). A recent study has shown that butyrate increases the proportion of cholinergic myenteric neurons associated with an increased colonic motility in adult rats (41). However, whether butyrate also has similar phenotypical and functional effects in rat pups remains currently unknown.

Therefore, the aim of this study was to determine the effects of administration of butyrate enemas in the postnatal period on the neurochemical phenotype of ENS and its functional impact on *in vivo* and *ex vivo* motility.

## MATERIAL AND METHODS

### Animal Models

Experiments were carried out in accordance with the recommendations and approval of the local Animal Care and Use Committee of Nantes (France). Primiparous timed-pregnant Sprague-Dawley female rats (Janvier Laboratories, Le Genest Saint Isle, France) were obtained at 13–14 days of gestation. Rats were accustomed to laboratory conditions for 1 wk before delivery and individually housed in cages on a 12-h:12-h light/dark cycle with free access to water and food (UAR, Epinay-sur-orge, France). Mothers and their pups (10–16 per litters) were kept in the same conditions during the whole experiments. Day of birth was considered to be PND 0.

### Administration of Enemas

Enemas were performed daily in rats between PND 7 to PND 17. A 24-gauge cannula (Fine Science Tools, Vancouver, Canada) was introduced in the rectum up to 5 mm, and a volume of 20  $\mu\text{l/g}$  of animal weight was injected. This volume of enema was determined in preliminary experiments in PND 7 and PND 17 rats ( $n = 3$ ). Methylene blue enemas (10% diluted in PBS) of 10, 20, and 100  $\mu\text{l/g}$

of animal weight were tested. Whereas 100  $\mu\text{l/g}$  reached the small intestine and 10  $\mu\text{l/g}$  did not reach the cecum, 20  $\mu\text{l/g}$  was able to reach the entire length of the colon (Fig. 1, A and B). We also showed that, at PND 21, 20  $\mu\text{l/g}$  of methylene blue stained the entire length of colon. Enemas were injected slowly (10 s per enema), the cannula was then removed, and pups were maintained muzzle down during 20 s.

Enemas of mannitol (5 mM; Aguettant, Lyon, France), saline (NaCl 0.9%), sodium butyrate (10.0, 5.0, 2.5 mM; Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), or sham enemas (i.e., only insertion of the cannula) were performed.

### Evaluation of Colonic Motility

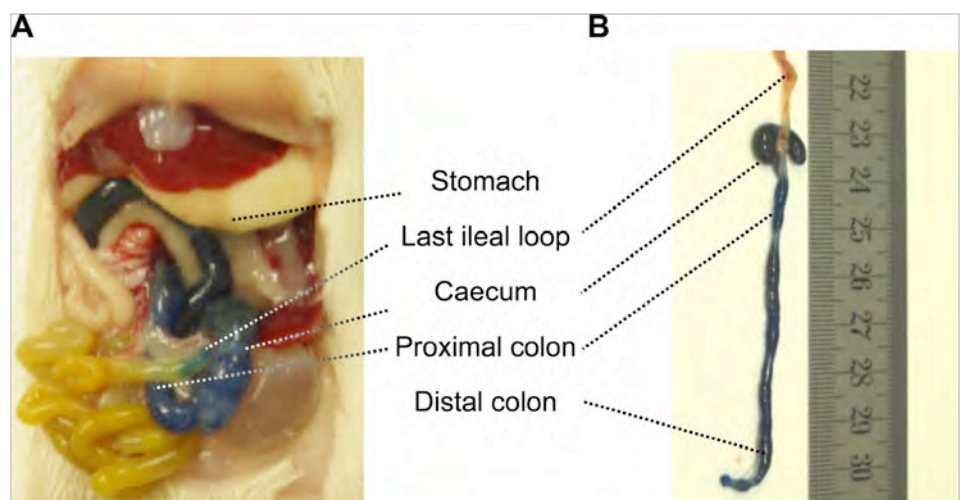
**In vivo experiments.** BEAD LATENCY. Distal colon transit time was measured at PND 21 using a method previously described in rats (44). A 2-mm-diameter glass bead (Sigma) was inserted 5 mm in the colon using a 5-French-gauge-diameter polished-end urethral catheter (Porgès, Le Plessis Robinson, France). After bead insertion, pups were isolated in individual cages. Distal colonic transit time (bead latency) was determined by measuring the time required for the expulsion of the bead.

**WATER CONTENT OF FECES.** Pups were isolated in individual cages without access to food and water for 1 h at PND 21. Feces were collected and weighed. Feces were then dried at 50°C for 1 wk and weighed. The water content of feces was evaluated and expressed as a percentage of wet weight.

**Ex vivo experiments.** Ex vivo neuromuscular transmission was evaluated as previously described (44). At PND 21, rats were killed by cervical dislocation, and the colon was removed (except the distal extremity  $\sim 5$  mm from anus). The colon was placed in cold oxygenated (5%  $\text{CO}_2$ -95%  $\text{O}_2$ ) Krebs solution containing (in mM) 117.0 NaCl, 4.7 KCl, 1.2  $\text{MgCl}_2$ , 1.2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25.0  $\text{NaHCO}_3$ , 2.5  $\text{CaCl}_2$ , and 11.0 glucose.

Segments of distal colon were placed in the longitudinal direction in a 7-ml organ bath containing oxygenated Krebs solution (37°C) and were stretched with a preload of 0.04 to 0.06 mN of tension. Preparations were equilibrated for 60 min. Isometric contractions were recorded with force transducers (no. 7005; Basile, Comerio, Italy) and data acquired onto a PowerMac Performa 7100/80 computer equipped with the MacLab/4s system (ADI, Bremen, Germany). Activation of enteric neurons was performed by electrical field stimulation (EFS) using a stimulator connected to two platinum ring electrodes (10 V, duration of pulse train: 10 s; pulse duration: 300  $\mu\text{s}$ ; frequency: 30 Hz). This procedure was repeated three times with 10-min periods between stimulations. The response of colonic longitudinal muscle to EFS was also measured in the presence of NO synthase (NOS)

Fig. 1. Picture showing the distribution of methylene blue along the colon following an enema (20  $\mu\text{l/g}$ ) performed in a 17-day-old postnatal rat (A). Methylene blue stained the entire colon from the rectum to the caecum (B).



inhibitor, *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester (*L*-NAME, 50 mM, Sigma), and further in presence of atropine ( $10^{-6}$  M, Sigma), an antagonist of cholinergic muscarinic receptors. Drugs were applied 15 min before EFS. Tension level, amplitude of spontaneous contractions, and area under the curve (AUC) during each EFS-induced response were measured. Data were normalized to the weight of the tissue.

#### Paracellular Permeability Measurements in Ussing Chambers

Full-thickness segments of distal colon were mounted in 2-mm-diameter Ussing chambers (Easy Mount; Warner Instrument, Hamden, CT). Tissues were maintained at 37°C in DMEM (Invitrogen) containing 0.1% fetal calf serum (AbCys, Paris, France) continuously oxygenated (5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>). After 30 min of equilibration, 200 μl of apical medium was replaced by 200 μl of sulfonic acid solution (578 Da, final concentration: 0.1 mg/ml) (Invitrogen). The fluorescence level in the basolateral chamber was measured every 30 min during 150 min using a fluorometer (Varioskan; Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The slope of the fluorescence intensity over time was determined by using a linear regression fit.

#### Immunofluorescence Attaining

Segments of proximal colon (1 cm adjacent to the cecum) and distal colon (1 cm, directly above the segment used in motility studies) were opened along the mesentery, pinned in Sylgard (Dow Corning, Midland, MI)-coated Petri dish, and fixed in 0.1 M PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature for 3 h. Whole mounts of submucosal plexus and myenteric plexus were obtained following microdissection of the mucosa and the circular muscle.

Whole mounts were first permeabilized with PBS, 0.1% sodium azide, 4% horse serum, and Triton X-100 for 3 h at room temperature. Tissues were then incubated sequentially with primary antibodies for 16 h and the antibodies for 3 h in the following order: goat anti-choline acetyltransferase (ChAT) (1:200; Millipore, Billerica, MA) and anti-goat Cy3 (carboxymethylindocyanine) (1:500; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK), rabbit anti-neuronal NOS (nNOS) (1:1,000; Alexis Laboratories, San Diego, CA) and anti-rabbit Cy5 (7-amino-4-indodicarbocyanin) (1:500, Jackson ImmunoResearch), and mouse anti-HuC/HuD (1:200, Invitrogen) and anti-mouse FITC (1:500, Jackson ImmunoResearch).

Specimens were viewed under an Olympus IX 50 fluorescence microscope fitted with adequate filter cubes. Pictures were acquired with a digital camera (model DP 71; Olympus, Rungis, France) coupled to the microscope. The numbers of Hu-, ChAT- and nNOS-immunoreactive (IR) cells were counted in at least 20 ganglia per condition. Myenteric ganglia were defined under the microscope as entities containing Hu-IR cells separated by a gap clearly distinguishable (about the size of one neuron or even smaller). Structures not clearly identified as ganglia were not analyzed. Data are expressed as the number of neurons per ganglia and the percentage of ChAT-IR or nNOS-IR neurons normalized to the total number of Hu-IR neurons.

#### Morphological Analysis

Pellet-free segments of distal colon were fixed in 4% PFA solution for 3 h at room temperature and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Measurements of the longitudinal and the circular muscle thickness, the height of crypts, and the mucosal and submucosal thickness were performed on five distinct fields of view from five animals in each condition as previously described (44).

#### Acetylcholine Assay

Pellet-free tubular segments of distal colon were placed in RIPA buffer (Millipore) and frozen at -80°C. Acetylcholine concentration was determined in tissue homogenates (Amplex Red, acetylcholine/acetylcholinesterase assay kit, Invitrogen) and normalized to the

neuron-specific enolase (NSE) level (Prolifigen NSE IRMA; DiaSorin, Stillwater, MN).

#### Statistical Analysis

Data were expressed as the means ± SE. The significance of differences was determined using Mann-Whitney *U*-test to compare two means, Wilcoxon matched-pairs test for paired data, or Kruskal-Wallis test to compare more than two groups, followed by Dunn's multiple-comparison test. The weight gain during the time of experiments was determined by using a linear regression fit. Differences were considered statistically significant for  $P < 0.05$ .

## RESULTS

#### Impact of Butyrate Enemas On Bead Latency Time

In a first part of the study, we characterized the impact of butyrate enemas on the distal colonic motility. We first showed that 2.5 mM butyrate significantly reduced the bead latency time compared with control (sham enemas) ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2A). In addition, enemas of 5 mM but not 10 mM of butyrate also significantly reduced the bead latency time ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2A). However, bead latency time was not modified after saline, mannitol, or sham enema compared with unmanipulated animals (Fig. 2B). We next used 2.5 mM butyrate enemas for the remaining sets of experiments, and for controls sham enemas were used.

#### Impact of Butyrate Enemas On Morphological Parameters

During the period of butyrate enema administration, the weight gain over the time was not significantly different

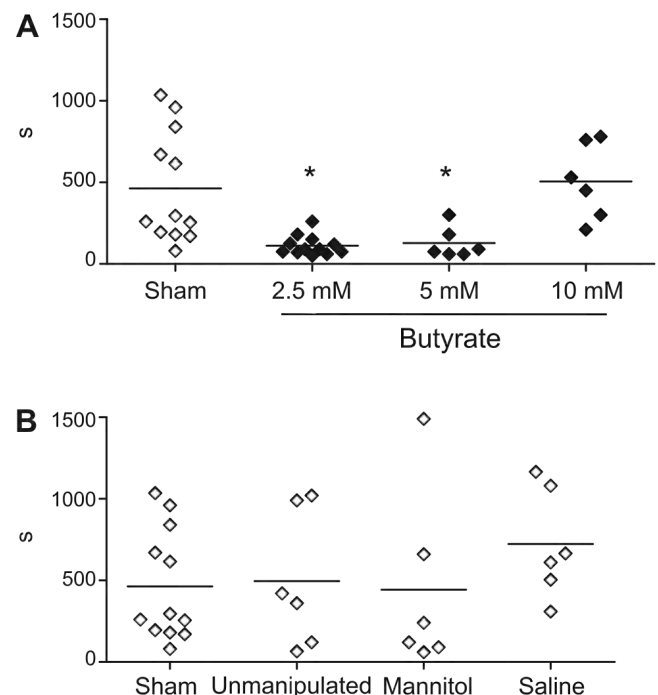


Fig. 2. Impact of butyrate enemas on bead latency. Butyrate enemas (2.5 mM;  $n = 12$  and 5 mM;  $n = 6$ ) reduced the expulsion time of a bead inserted in the rectum compared with controls (sham enemas;  $n = 12$ ). In addition, enemas of 10 mM butyrate ( $n = 6$ ) did not reduce the bead latency time compared with controls (A) (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple-comparison test;  $*P < 0.05$  compared with controls). Mannitol (5 mM), saline, and sham enemas did not modify the bead latency time compared with unmanipulated animals (B).



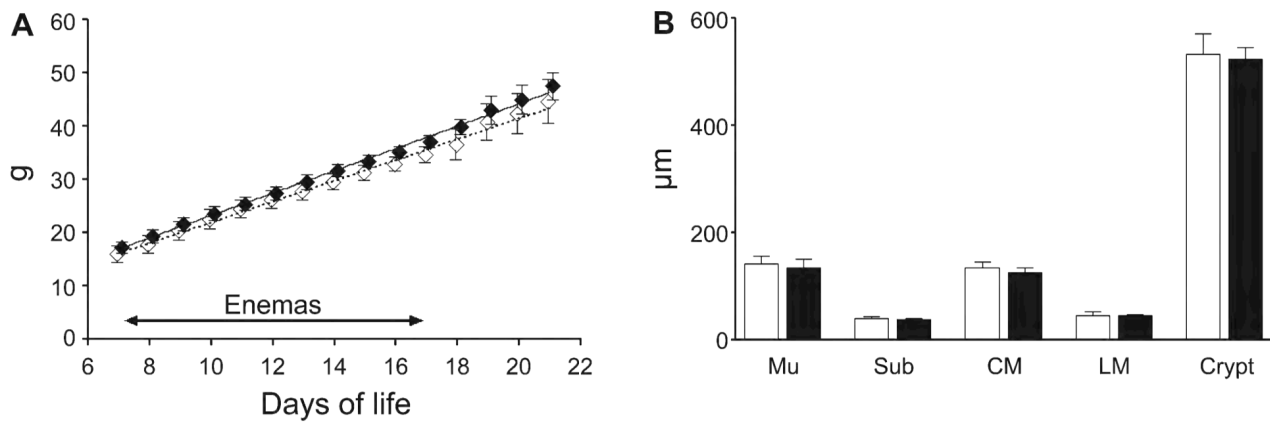


Fig. 3. Impact of butyrate enemas on weight gain and morphological parameters. Butyrate enemas (●) did not modify the weight of rats during the course of experiments compared with controls (sham enemas) (○) ( $n = 8$ ) (A). Butyrate enemas (●) did not modify histological parameters of colon compared with controls (sham enemas) (○) ( $n = 5$ ) in terms of thickness of mucosa (Mu), submucosa (Sub), circular muscle layer (CM), longitudinal muscle layer (LM), and height of crypts (Crypt) (B).

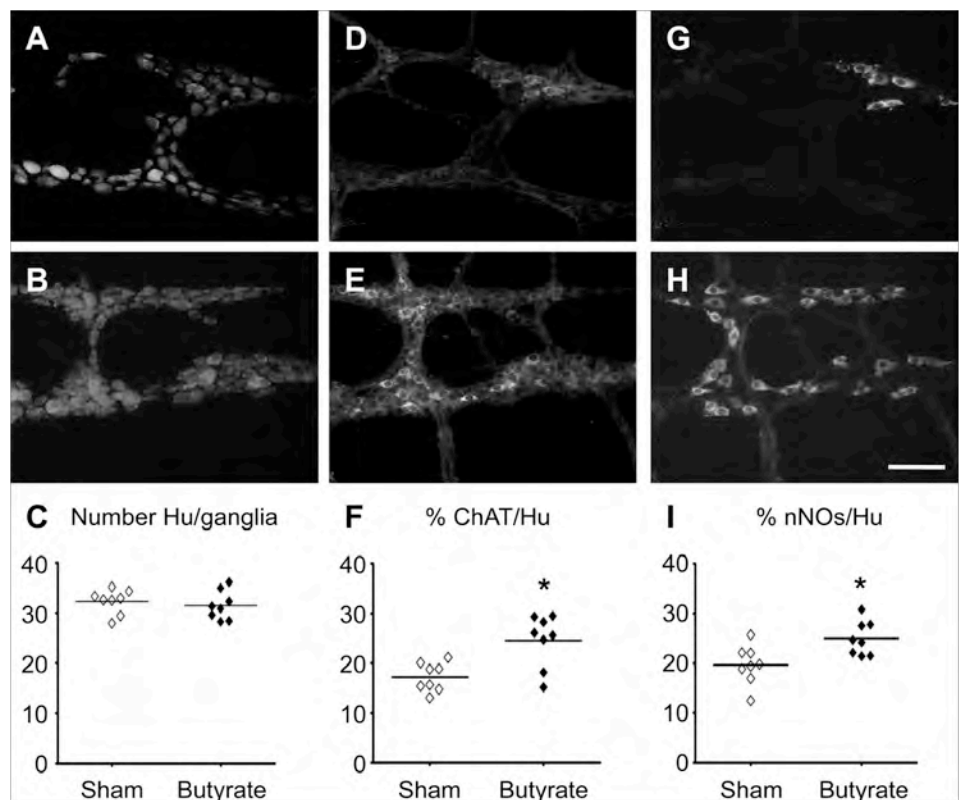
from controls (Fig. 3A). At PND 21, the colon length was similar between controls ( $8.9 \pm 0.5$  cm;  $n = 5$ ) and butyrate-treated animals ( $8.7 \pm 0.2$  cm;  $n = 6$ ). Butyrate enemas did not modify morphological parameters such as the height of the mucosa, the submucosa, the crypts, the circular or longitudinal muscle layers compared with controls (Fig. 3B).

#### Impact of Butyrate Enemas On the Neurochemical Phenotype of Enteric Neurons

We next sought to determine the impact of butyrate on the neurochemical phenotype of enteric neurons of the distal and proximal colon.

*Distal colon.* In the myenteric plexus, butyrate enemas did not modify the number Hu-IR cells per ganglia (Fig. 4, B and C) compared with controls (Fig. 4, A and C). However, butyrate significantly increased the proportion of both ChAT-IR neurons (+43%;  $n = 8$ ;  $P = 0.02$ ) (Fig. 4, E and F) and nNOS-IR neurons (+27%;  $n = 8$ ;  $P = 0.04$ ) (Fig. 4, H and I) compared with controls (Figs. 4, D, F, G, and I, respectively). This increase in the proportion of ChAT-IR neurons was associated with a significant increase in the acetylcholine amount in the distal colon of butyrate-treated animals ( $10.1 \pm 3.3$   $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$  of NSE;  $n = 6$ ) compared with controls ( $2.0 \pm 0.8$   $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$  of NSE;  $n = 6$ ;  $P = 0.03$ ). Saline enemas did not modify the number of Hu-IR cells per

Fig. 4. Impact of butyrate enemas on neurochemical coding of myenteric neurons. Triple immunohistochemical staining of whole-mount preparations of myenteric plexus and longitudinal muscle layer. Immunohistochemical staining with antibodies against Hu revealed that butyrate enemas (B and C) did not modify the number of neurons per ganglia compared with controls (sham enemas) (A and C) ( $n = 8$ ). Immunohistochemical staining with antibodies against choline acetyltransferase (ChAT) revealed that butyrate enemas (E and F) increased the number of ChAT-immunoreactive (IR) neurons per Hu-IR neurons compared with control (sham enemas) (D and F) ( $*P < 0.05$ ; Mann-Whitney  $U$ -test;  $n = 8$ ). Immunohistochemical staining with antibodies against neuronal nitric oxide synthase (nNOS) revealed that butyrate enemas (H and I) increased the number of nNOS-IR neurons per Hu-IR neurons compared with controls (sham enemas) (G and I) ( $*P < 0.05$ ; Mann-Whitney  $U$ -test;  $n = 8$ ) (scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ).



ganglia compared with controls ( $31.9 \pm 0.8$  cells;  $n = 4$  vs.  $32.2 \pm 0.9$  cells;  $n = 8$ , respectively) or the proportion of ChAT-IR and nNOS-IR neurons compared with controls ( $15.3 \pm 2.8\%$ ;  $n = 4$  vs.  $17.2 \pm 1.0\%$ ;  $n = 8$  and  $20.6 \pm 1.9\%$ ;  $n = 4$  vs.  $19.7 \pm 1.4\%$ ;  $n = 8$ , respectively). Similarly, mannitol enemas did not modify the number of Hu-IR cells per ganglia compared with controls ( $31.1 \pm 0.7\%$  cells;  $n = 4$  vs.  $32.2 \pm 0.9\%$  cells;  $n = 8$ , respectively) or the proportion of ChAT-IR and nNOS-IR neurons compared with controls ( $13.0 \pm 1.7\%$ ;  $n = 4$  vs.  $17.2 \pm 1.0\%$ ;  $n = 8$  and  $19.5 \pm 0.9\%$ ;  $n = 4$  vs.  $19.7 \pm 1.4\%$ ;  $n = 8$ , respectively).

We next determined whether butyrate enemas could modify the phenotype of submucosal neurons in the distal colon. Butyrate did not modify the number of Hu-IR cells per ganglia ( $8.6 \pm 1.8$  cells;  $n = 5$ ) compared with controls ( $9.7 \pm 3.2$  cells;  $n = 4$ ). However, butyrate increased the proportion of nNOS-IR neurons ( $26.2 \pm 3.5\%$ ;  $n = 5$ ) compared with controls ( $12.7 \pm 1.6\%$ ;  $n = 4$ ;  $P = 0.03$ ) and tended to increase the proportion of ChAT-IR neurons ( $43.3 \pm 3.9\%$ ;  $n = 5$ ) compared with controls ( $35.1 \pm 1.8\%$ ;  $n = 4$ ;  $P = 0.1$ ).

*Proximal colon.* We next determined whether butyrate enemas could also impact the neurochemical phenotype of myenteric neurons in the proximal colon.

The number of Hu-IR cells per myenteric ganglia was not different between controls and butyrate-treated animals ( $35.1 \pm 1.0$  cells;  $n = 5$  vs.  $36.4 \pm 0.8$  cells;  $n = 6$ , respectively). In contrast to distal colon, butyrate did not modify the proportion of ChAT-IR neurons ( $26.2 \pm 1.5\%$ ;  $n = 6$ ) compared with controls ( $25.7 \pm 0.5\%$ ;  $n = 5$ ). Butyrate also did not modify the proportion of nNOS-IR neurons ( $22.2 \pm 1.7\%$ ;  $n = 6$ ) compared with controls ( $22.4 \pm 0.7\%$ ;  $n = 5$ ).

We next compared the phenotype of myenteric neurons between the proximal and distal colon. In control animals, the number of Hu-IR cells/ganglia tended to be higher in the proximal compared with the distal colon ( $35.4 \pm 1.0$  cells vs.  $32.2 \pm 0.9$  cells, respectively;  $n = 5$ ;  $P = 0.09$ ). The proportion of ChAT-IR neurons was significantly larger in the proximal than in the distal colon ( $25.4 \pm 0.5\%$  vs.  $14.6 \pm 2.2\%$ , respectively;  $n = 5$ ;  $P = 0.02$ ). The proportion of NOS-IR neurons tended to be larger in the proximal than in the distal colon ( $22.4 \pm 0.7\%$  vs.  $20.3 \pm 1.7\%$ , respectively;  $n = 5$ ;  $P = 0.06$ ). In butyrate-treated animals, the number of Hu-IR cells/ganglia was higher in the proximal colon compared with the distal colon ( $36.4 \pm 0.8$  vs.  $31.5 \pm 1.0$ , respectively;  $n = 5$ ;  $P = 0.04$ ). The proportion of ChAT-IR neurons remained larger in the proximal than in the distal colon ( $26.3 \pm 1.2\%$  vs.  $20.3 \pm 2.0\%$ , respectively;  $n = 5$ ;  $P = 0.02$ ), and the proportion of NOS-IR neurons tended to be larger in the distal than in the proximal colon ( $22.2 \pm 1.7\%$  vs.  $27.0 \pm 2.2\%$ , respectively;  $n = 5$ ;  $P = 0.09$ ).

#### *Impact of Butyrate On Neuromuscular Transmission*

Ex vivo motility studies were performed on segments of colonic longitudinal muscle. Basal tension level was similar between butyrate-treated animals compared with controls ( $2.6 \pm 0.5$  vs.  $3.0 \pm 1.4$  mN/g of tissue, respectively;  $n = 6$ ). In presence of L-NAME, the basal tension was increased in butyrate-treated animals ( $4.0 \pm 0.6$  mN/g of tissue;  $n = 6$ ;  $P = 0.03$ ) but not in controls ( $3.2 \pm 0.7$  mN/g of tissue;  $n = 6$ ). In the presence of atropine, the basal tension decreased in both

controls and butyrate-treated animals ( $2.2 \pm 0.6$  mN/g of tissue;  $n = 6$ ;  $P = 0.03$  and  $2.7 \pm 0.6$  mN/g of tissue, respectively;  $n = 6$ ;  $P = 0.03$ ).

Amplitudes of spontaneous contractions were lower in the control group compared with butyrate ( $0.4 \pm 0.3$  vs.  $0.9 \pm 0.1$  mN/g of tissue, respectively;  $n = 6$ ;  $P = 0.02$ ). In presence of L-NAME, amplitudes of spontaneous contractions were increased in butyrate-treated animals ( $1.3 \pm 0.2$  mN/g of tissue;  $n = 6$ ;  $P = 0.03$ ) but not in controls ( $0.4 \pm 0.05$  mN/g of tissue;  $n = 6$ ). In the presence of atropine, amplitudes of spontaneous contractions tended to decrease in butyrate-treated animals ( $0.9 \pm 0.3$  mN/g of tissue;  $n = 6$ ;  $P = 0.053$ ) but not in the control group ( $0.5 \pm 0.2$  mN/g of tissue;  $n = 6$ ).

Segments of colonic longitudinal muscle were stimulated by EFS, and EFS-induced contractile responses were then analyzed in the absence or presence of L-NAME and/or atropine (Fig. 5A). The EFS-induced AUC was larger in butyrate-treated animals compared with controls ( $n = 6$ ;  $P = 0.01$ ) (Fig. 5B). In the presence of L-NAME, EFS-induced AUC was significantly increased in both control group ( $n = 6$ ;  $P = 0.03$ ) and butyrate group ( $n = 6$ ;  $P = 0.02$ ) (Fig. 5B). However, the amplitude of L-NAME-sensitive AUC was significantly larger after butyrate treatment compared with controls ( $n = 6$ ;  $P = 0.01$ ) (Fig. 5C). In the presence of atropine, EFS-induced AUC was significantly decreased only in the butyrate-treated group ( $n = 6$ ;  $P = 0.02$ ) (Fig. 5B). Furthermore, the amplitude of atropine-sensitive AUC was higher in the butyrate group compared with controls ( $n = 6$ ;  $P = 0.03$ ) (Fig. 5D).

#### *Impact of Butyrate On the Distal Colonic Permeability*

We next determined whether butyrate could modify the paracellular permeability in the distal colon. Sulfonic acid flux across the colonic mucosa was identical in butyrate-treated animals compared with controls (Fig. 6A). Butyrate enemas did not modify the proportion of water in feces ( $44.6 \pm 5.7\%$ ;  $n = 5$ ) compared with control ( $47.8 \pm 2.6\%$ ;  $n = 4$ ) (Fig. 6B).

## DISCUSSION

This study showed that butyrate enemas induce in rat pups profound neuroplastic changes in myenteric and submucosal neurons characterized by an increase in the proportion of both cholinergic and nitrergic neurons. Furthermore, this neuroplasticity was associated with an enhanced distal colonic motility and changes in neuromuscular transmission.

A first finding of our study was the ability of enemas to target the ENS in the colon. Indeed, in preliminary results of this study, we showed that a substance administered by enemas was able to reach the entire colon. For the colon, enemas represent various advantages over the oral route such as to bypass the intestinal assimilation of delivered substances and prevent putative deleterious effects of digestive secretory products (acid, biliary salts, or pancreatic enzymes) on the administered substance. Specific targeting of the colon can be of particular interest in the context of postnatal motility disorders of the lower GI tract. Indeed, enemas are used in preterm infants with a delayed meconium expulsion. These approaches attempt to avoid prolonged ileus complications such as intestinal perforation, necrotizing enterocolitis, and parenteral support morbidity. The therapeutic aim of these enemas is in general to decrease meconium viscosity with saline solution

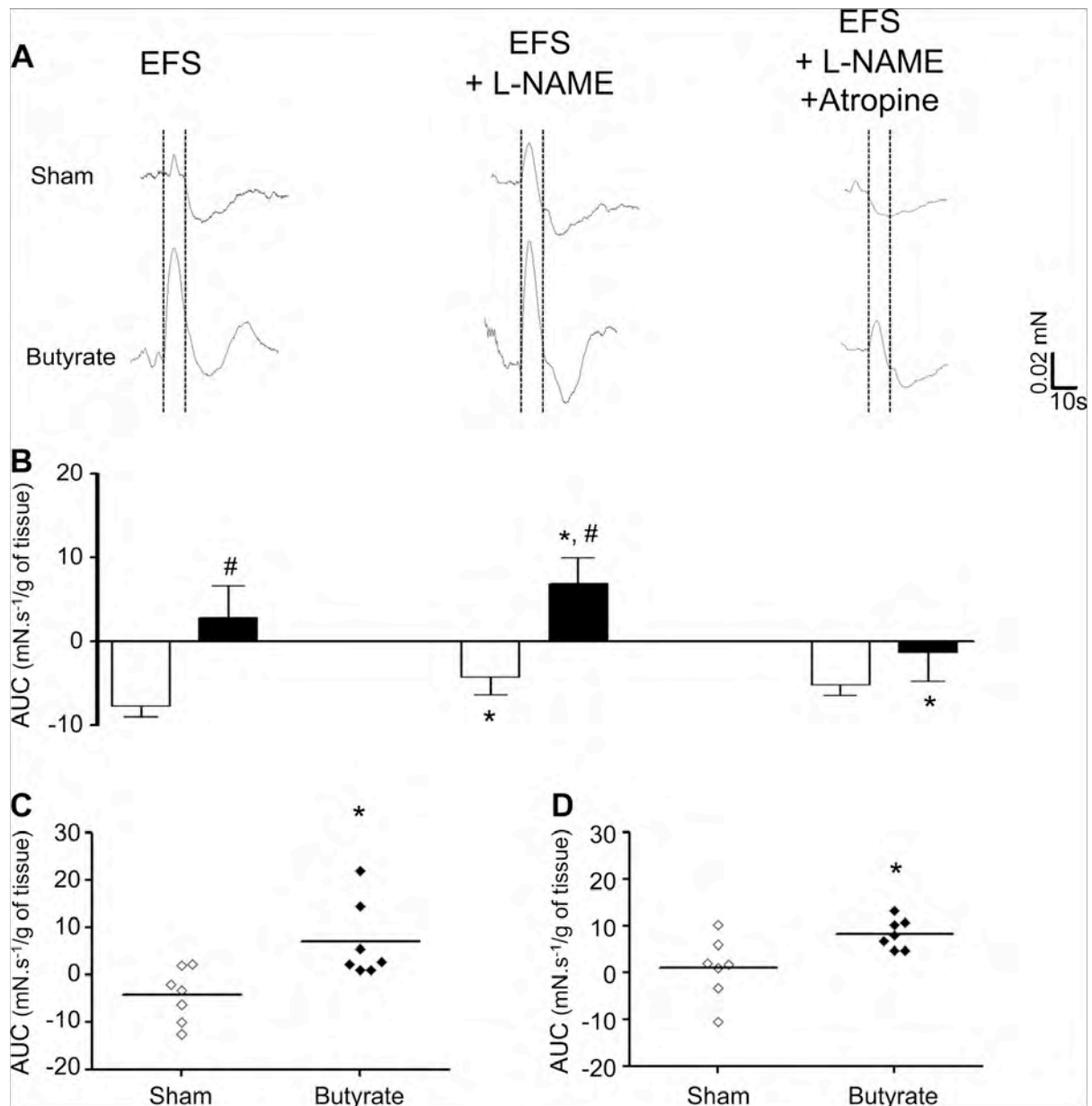


Fig. 5. Impact of butyrate enemas on neuromuscular transmission assessed ex vivo. Distal colonic longitudinal muscle segments were stimulated by electrical field stimulation (EFS). The area under the curve (AUC) of EFS-induced contractile response was analyzed in absence or in presence of *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester (L-NAME) or atropine (A). The EFS-induced AUC was larger in butyrate-treated animals compared with controls (sham enemas) (B) (# $P < 0.05$ ; Mann Whitney *U*-test;  $n = 6$ ). In presence of L-NAME, EFS-induced AUC was significantly increased in both groups (B) (\* $P < 0.05$ , Wilcoxon matched-pairs test;  $n = 6$ ) and was also larger in butyrate-treated animals compared with controls (sham enemas) (B) (# $P < 0.05$ ; Mann Whitney *U*-test;  $n = 6$ ). However, the amplitude of L-NAME-sensitive AUC was larger after butyrate treatment compared with controls (sham enemas) (C) (\* $P < 0.05$ ; Mann Whitney *U*-test;  $n = 6$ ). In the presence of atropine, EFS-induced AUC was significantly decreased only in the butyrate-treated group (B) (\* $P < 0.05$ , Wilcoxon matched-pairs test;  $n = 6$ ). Furthermore, the amplitude of atropine-sensitive AUC was higher in the butyrate group compared with control (sham enemas) (D) (\* $P < 0.05$ ; Mann Whitney *U*-test;  $n = 6$ ).

(NaCl 0.9%) (11, 19) or with osmotic agents such as Gastrografin (16) or iopamidol (29). Such approaches have been associated with complications like dehydration (34), intestinal perforation, or rectal injury (1, 7, 10, 18). However, it remains unclear whether these complications result from the procedure by itself or are a primary consequence of colon dysfunctions due to immaturity. In our study, we did not observe any rectal bleedings, intestinal perforations, or peritonitis as consequences of enema procedures. In addition, our data suggest that

butyrate enema-induced functional changes were not attributable to changes either in distension induced by enemas or by osmolarity because enemas of saline and mannitol, respectively, did not modify distal colonic transit, nor did they modify the neurochemical phenotype of myenteric neurons. Consistently, in preterm infants, saline enemas did not improve colonic motility (19). Furthermore, we showed in our study that butyrate enemas (2.5 mM) did not impact colonic permeability. This result is consistent with a previous ex vivo study



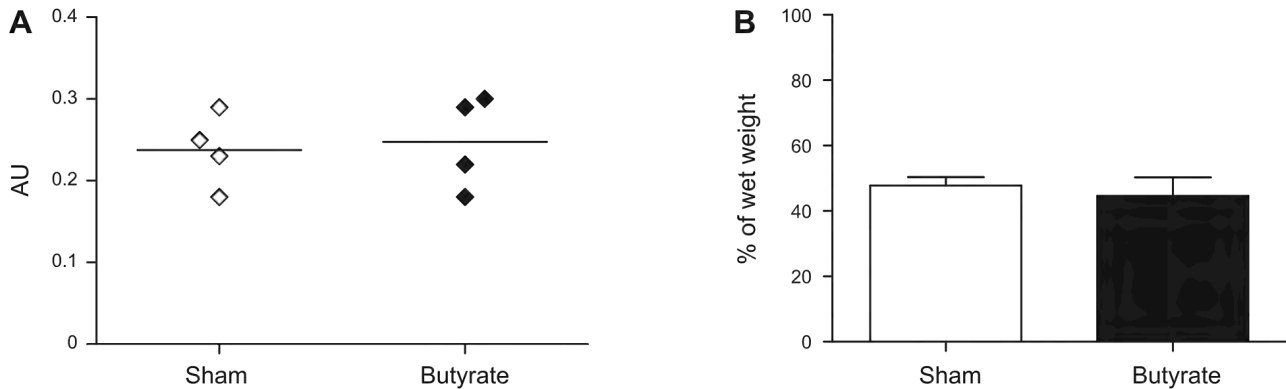


Fig. 6. Impact of butyrate on colonic permeability. Paracellular permeability assessed *ex vivo* in Ussing chambers and sulfonic acid flux were not modified in the butyrate-treated group compared with controls (sham enemas) (A). The water content of feces was unchanged after butyrate enemas compared with controls (sham enemas) (B).

showing that low doses of butyrate (less than 10 mM) did not impact permeability, whereas higher doses of butyrate (more than 10 mM) reduced paracellular permeability (27).

A major finding of our study was the demonstration that butyrate enemas were able to induce neuroplastic and functional changes in the ENS of distal colon of rat pups. In particular, the butyrate-induced increase in the proportion of cholinergic myenteric neurons and cholinergic neuromuscular transmission was reminiscent to the effects of butyrate observed in the adult rat with *in vivo* cecal infusion of butyrate (41). However, whether these neuroplastic changes induced by butyrate are maintained over time remains currently unknown. In adult rats, butyrate effects were observed in the proximal colon with a concentration of 5 mM and were absent with 1 mM of butyrate. We observed an effect at a lower concentration of butyrate in our study, *i.e.*, 2.5 mM. This concentration of butyrate is in the range of the one observed during the postnatal period in rat pups. Indeed, concentration of butyrate measured in ceco-colonic content is 3  $\mu\text{mol/g}$  at P18 and reaches 33  $\mu\text{mol/g}$  of dried feces at P40 (2). We observed an effect of butyrate enemas on the neurochemical phenotype of ENS only in the distal colon and not in the proximal colon although enemas were able to reach the cecum. Although an absence of effect could be attributable to lower time of exposure of the proximal colon than distal one to butyrate, one cannot exclude also that region-specific differences in sensitivity to butyrate (*i.e.*, proximal vs. distal colon) could exist. Indeed, butyrate concentrations are higher in the cecum compared with the rectum (8). Conversely, the expression of the monocarboxylate transporter (MCT)-1 (expressed on colonocytes and transporting butyrate) increases along the colon and is maximum in the distal segment (17). Whether similar regional or age-dependent changes occur with other monocarboxylate transporters such as MCT-2, which is expressed on myenteric neurons (41), remains currently unknown. However, we showed similar expression of MCT-2 both in distal and proximal colon (data not shown).

Surprisingly, we also observed a major effect of butyrate on the nitrergic phenotype in newborn rats, whereas in adult rats butyrate had no effect on this subtype of neurons (41). Mechanisms responsible for these age-dependent differences remain unknown but could be attributable to differences in the epigenetic state of myenteric neurons during the postnatal period compared with adulthood. This could be highly likely because butyrate effects on ENS phenotype were shown to be associated with epigenetic

changes in neurons (45). These effects of butyrate could also be attributable to an increase in the proliferation of neuronal progenitors, which are still present in the postnatal period (24). In the brain, butyrate administration increases bromodeoxyuridine incorporation of progenitor cells in the subventricular zone after ischemia (23). However, such a mechanism might not be involved in our study, as the number of neurons per ganglia remained unchanged after butyrate treatment.

Another interesting finding of this study was that the proportion of nitrergic and cholinergic neurons followed an aboral gradient between the proximal and distal colon. Such a gradient has been already described for the nitrergic neurons in adult rats (42) and guinea pigs (14) but not for cholinergic neurons. This suggests that, during the postnatal period, a rostro-caudal gradient in the maturation of the neurochemical phenotype exists, which could be reminiscent of the gut colonization by neural crest stem cells during embryogenesis.

In conclusion, we have shown that butyrate enemas enhance colonic motility in rat pups by modulating the neurochemical phenotype of myenteric neurons. This study could serve as a basis for the development of therapeutic approaches in preterm infants with colonic motility disorders characterized by reduced transit time.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pr. Hérouy and Pr. Rozé for constructive discussion and comments.

#### GRANTS

E. Suply was supported in part by a grant of Cephalon and by a grant of Danone Research. M. Neunlist is a recipient of a Contrat d'Interface INSERM. R. Soret was supported by a grant of the Pays de la Loire. F. Cossais was supported by a grant of the Fondation pour la Recherche Médicale and the SanTidge foundation.

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: E.S., P.d.V., R.S., and M.N. conception and design of research; E.S., R.S., and F.C. performed experiments; E.S. analyzed data; E.S. and M.N. interpreted results of experiments; E.S. prepared Figs.; E.S. and M.N. drafted manuscript; E.S., P.d.V., R.S., F.C., and M.N. edited and revised manuscript; E.S. and M.N. approved final version of manuscript.

## REFERENCES

- Amodio J, Berdon W, Abramson S, Stolar C. Microcolon of prematurity: a form of functional obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 146: 239–244, 1986.
- Barrat E, Michel C, Poupeau G, David-Sochard A, Rival M, Pagniez A, Champ M, Darmaun D. Supplementation with galactooligosaccharides and inulin increases bacterial translocation in artificially reared newborn rats. *Pediatr Res* 64: 34–39, 2008.
- Bekkali N, Hamers SL, Schipperus MR, Reitsma JB, Valerio PG, Van Toledo L, Benninga MA. Duration of meconium passage in preterm and term infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 93: F376–F379, 2008.
- Bisset WM, Watt JB, Rivers RP, Milla PJ. Ontogeny of fasting small intestinal motor activity in the human infant. *Gut* 29: 483–488, 1988.
- Boston VE. Necrotizing enterocolitis and localized intestinal perforation: different diseases or ends of a spectrum of pathology. *Pediatr Surg Int* 22: 477–484, 2006.
- Buddington RK. Nutrition and ontogenetic development of the intestine. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 251–259, 1994.
- Caniano DA, Beaver BL. Meconium ileus: a fifteen-year experience with forty-two neonates. *Surgery* 102: 699–703, 1987.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28: 1221–1227, 1987.
- Druckebrod NR, Epstein ML. The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev Biol* 287: 125–133, 2005.
- Ein SH, Shandling B, Reilly BJ, Stephens CA. Bowel perforation with nonoperative treatment of meconium ileus. *J Pediatr Surg* 22: 146–147, 1987.
- Emil S, Nguyen T, Sills J, Padilla G. Meconium obstruction in extremely low-birth-weight neonates: guidelines for diagnosis and management. *J Pediatr Surg* 39: 731–737, 2004.
- Favre A, Szylił O, Popot F, Catala I, Rondeau C, Maurage C, Gold F, Borderon JC, Butel MJ. Diet, length of gestation, and fecal short chain fatty acids in healthy premature neonates. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 26: 51–56, 2002.
- Fu M, Lui VCH, Sham MH, Cheung ANY, Tam PKH. HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. *Dev Dyn* 228: 1–10, 2003.
- Furness JB, Li ZS, Young HM, Förstermann U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell Tissue Res* 277: 139–149, 1994.
- Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81: 87–96, 2000.
- Garza-Cox S, Keeney SE, Angel CA, Thompson LL, Swischuk LE. Meconium obstruction in the very low birth weight premature infant. *Pediatrics* 114: 285–290, 2004.
- Gill RK, Saksena S, Alrefai WA, Sarwar Z, Goldstein JL, Carroll RE, Ramaswamy K, Dudeja PK. Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C846–C852, 2005.
- Greenholz SK, Perez C, Wesley JR, Marr CC. Meconium obstruction in markedly premature infant. *J Pediatr Surg* 31: 117–120, 1996.
- Haiden N, Jilma B, Gerhold B, Klebermass K, Prusa AR, Kuhle S, Rohrmeister K, Kohlhauser-Vollmuth C, Pollak A. Small volume enemas do not accelerate meconium evacuation in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 44: 270–273, 2007.
- Hao MM, Young HM. Development of enteric neuron diversity. *J Cell Mol Med* 13: 1193–1210, 2009.
- Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* 8: 466–479, 2007.
- Ittmann PI, Amarnath R, Berseth CL. Maturation of antroduodenal motor activity in preterm and term infants. *Dig Dis Sci* 37: 14–19, 1992.
- Kim HJ, Leeds P, Chuang DM. The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *J Neurochem* 110: 1226–1240, 2009.
- Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35: 657–669, 2002.
- Kunze WA, Furness JB. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 61: 117–142, 1999.
- Lin PW, Nasr TR, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention. *Semin Perinatol* 32: 70–82, 2008.
- Mariadason JM, Kiliyas D, Catto-Smith A, Gibson PR. Effect of butyrate on paracellular permeability in rat distal colonic mucosa ex vivo. *J Gastroenterol Hepatol* 14: 873–879, 1999.
- McClure RJ, Newell SJ. Randomised controlled trial of trophic feeding and gut motility. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 80: F54–F58, 1999.
- Nakaoka T, Shiokawa C, Nishihara M, Tamai H, Funato M, Uemura S. Iopamidol enema treatment for meconium obstruction of prematurity in extremely low-birth weight infants: a safe and effective method. *Pediatr Surg Int* 25: 273–276, 2009.
- Neu J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *Am J Clin Nutr* 85: 629S–634S, 2007.
- Norin E, Midtvedt T, Björkstén B. Development of faecal short-chain fatty acid pattern during the first year of life in Estonian and Swedish infants. *Microb Ecol Health Dis* 16: 8–12, 2004.
- Patel BA, Dai X, Burda JE, Zhao H, Swain GM, Galligan JJ, Bian X. Inhibitory neuromuscular transmission to ileal longitudinal muscle predominates in neonatal guinea pigs. *Neurogastroenterol Motil* 22: 909–918; e236–e237, 2010.
- Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, Maheshwari A, Nusrat A, Lin PW. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am J Pathol* 180: 626–635, 2012.
- Poole CA, Rowe MI. Clinical evidence of intestinal absorption of Gastrografin. *Radiology* 118: 151–153, 1976.
- De Quelen F, Chevalier J, Rolli-Derkinderen M, Mourrot J, Neunlist M, Boudry G. N-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *J Physiol* 589: 4341–4352, 2011.
- Ramirez A, Wong WW, Shulman RJ. Factors regulating gastric emptying in preterm infants. *J Pediatr* 149: 475–479, 2006.
- Roberts RR, Murphy JF, Young HM, Bornstein JC. Development of colonic motility in the neonatal mouse—studies using spatiotemporal maps. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G930–G938, 2007.
- Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16, Suppl 1: 55–59, 2004.
- Shinohara T, Tsuda M, Koyama N. Management of meconium-related ileus in very low-birth weight infants. *Pediatr Int* 49: 641–644, 2007.
- Siddiqui MMF, Drewett M, Burge DM. Meconium obstruction of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 97: F157–F150, 2012.
- Soret R, Chevalier J, De Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, Segain JP, Neunlist M. Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology* 138: 1772–1782, 2010.
- Takahashi T, Owyang C. Regional differences in the nitrergic innervation between the proximal and the distal colon in rats. *Gastroenterology* 115: 1504–1512, 1998.
- Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81: 1031–1064, 2001.
- de Vries P, Soret R, Suply E, Heloury Y, Neunlist M. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G539–G547, 2010.
- Wallace AS, Burns AJ. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 319: 367–382, 2005.
- Wittmeyer V, Merrot T, Mazet B. Tonic inhibition of human small intestinal motility by nitric oxide in children but not in adults. *Neurogastroenterol Motil* 22: 1078; e282, 2010.

# ARTICLE 3



**Article 3 : L'antibiothérapie néonatale induit des dysfonctions de la barrière intestinale chez le raton (Article en cours de rédaction)**

**Early life administration of antibiotic induces intestinal barrier dysfunctions in rat pups.**

**Philine de Vries<sup>1,2,3,4</sup>, Etienne Suply<sup>1,2,3</sup>, Philippe Aubert<sup>1,2,3</sup>, Julien Chevalier<sup>1,2,3</sup>, Pascale Marcorelles<sup>4,5</sup>, Severine Loisel<sup>7</sup>, Emmanuel Coron<sup>1,2,3</sup>, 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> CHRU Brest, Service de chirurgie pédiatrique, Brest, France.

<sup>5</sup> CHRU Brest, Service d'anatomopathologie, Brest, France.

<sup>5</sup> EA 4685, Laboratoire de Neurosciences de Brest, Université de Bretagne Occidentale, France.

<sup>7</sup> Université de Bretagne Occidentale, animalerie, Faculté de médecine, Brest, France

**Running title:** Antibiotic and intestinal permeability.

\* **Corresponding author:** NEUNLIST Michel

UMR Inserm U913

1, rue Gaston Veil

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)

# INTRODUCTION

L'incidence des naissances prématurées (avant 36 semaines d'aménorrhées) est en constante augmentation dans les pays occidentaux. Le taux de survie et l'amélioration de la qualité de vie progressent en permanence, cependant cette population de patients présente un risque accru de complications dues à l'immaturation des organes, en particulier digestif. En effet, si l'embryogénèse du tube digestif se déroule tôt au cours de la grossesse, la maturation des fonctions intestinales se poursuit après la naissance. C'est le cas des fonctions de barrière intestinale, telles que la perméabilité para cellulaire (Buddington 1994; De Quelen, Chevalier et al. 2010) et que l'immunité intestinale (Neu 2007). La maturation des fonctions motrices, également, continuent à évoluer durant cette période, et les enfants prématurés présentent un ralentissement digestif global, depuis le haut appareil digestif, (Ittmann, Amarnath et al. 1992), jusqu'au colon (Bekkali, Hamers et al. 2008). En conséquence, une stase gastrique (Ramirez, Wong et al. 2006) et un iléus prolongé (Shinohara, Tsuda et al. 2007) apparaissent, qui sont à l'origine de difficultés alimentaires, retardant le retour à domicile, et du développement d'entérocolites ulcéronécrosantes (Wen, Smith et al. 2004; Lin, Nasr et al. 2008). Or un nombre croissant d'études suggère une implication potentielle de l'antibiothérapie dans la survenue de cette pathologie spécifique aux enfants prématurés (Shah, Nathan et al. 2013). Les nouveau-nés et en particulier les prématurés reçoivent couramment des antibiotiques dont l'innocuité à court et à long terme est actuellement remise en question. Ils sont notamment suspectés d'augmenter les risques de survenue d'entérocolite ulcéronécrosante dans les unités de néonatalogie (Neu 2007; Claud and Walker 2008), mais aussi d'avoir un rôle dans l'incidence de certaines obésités (Million, Lagier et al. 2013; Million and Raoult 2012). L'antibiothérapie peut être indispensable en cas d'infection avérée, mais son utilisation prophylactique devient de plus en plus controversée, du fait de son impact sur l'incidence des entérocolites ulcéronécrosantes qu'elle cherche paradoxalement à éviter (Tzialla, Borghesi et al. 2012).

Parmi les constituants du tube digestif, le système nerveux est un régulateur clé des fonctions digestives. Il est constitué de neurones et de cellules gliales entériques. Ces constituants sont impliqués dans le contrôle de la barrière épithéliale intestinale mais exercent aussi un effet protecteur sur celle-ci (Aube, Cabarrocas et al. 2006).

Bien que le tube digestif soit entièrement colonisé par le SNE au cours de l'embryogénèse, (entre le 9<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour chez la souris, et entre la 4<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> semaine chez l'homme

(Wallace and Burns 2005), le SNE poursuit sa maturation après la naissance (Roberts, Murphy et al. 2007; Hao and Young 2009; de Vries, Soret et al. 2010). Outre des facteurs génétiques, le SNE est sous l'influence de différents facteurs environnementaux capables de réguler son phénotype. En effet, des travaux récents ont mis en évidence la capacité du microbiote ou de ses métabolites, tel que butyrate, à réguler le phénotype du SNE, aussi bien chez l'adulte que chez le nouveau-né (Suply, de Vries et al. 2012). Ainsi, une modification de la flore, comme celle induite par une antibiothérapie, pourrait influencer le développement du phénotype neurochimique du SNE. Dans ce contexte, les conséquences d'une antibiothérapie néonatale sur les fonctions de barrière intestinale et sur la motricité intestinale ainsi que sur la mise en place du SNE restent encore inconnues (Neu 2007).

Le but de notre étude était de déterminer si la prise orale d'un antibiotique en période périnatale et jusqu'au sevrage chez le raton, modifiait les fonctions digestives motrices et les fonctions de barrière intestinale, et de déterminer si ces effets étaient rémanents après l'arrêt du traitement. Ensuite nous nous sommes intéressés aux conséquences profondes sur la réponse neurochimique du système nerveux entérique.

# MATERIEL ET METHODES

## Modèle animal

Les expérimentations animales se sont déroulées au sein de l'animalerie de l'Unité de Thérapeutique Expérimentale (UTE) de la faculté de médecine de Nantes conformément au règlement interne. Des ratte gestantes Sprague-Dawleys primipares (Janvier, Le Genest, France) ont été livrées à 13-14 jours de gestation, placées dans des cages individuelles avec un accès libre à la nourriture. Après la naissance et pendant toute la durée de l'expérimentation, les ratons ont été laissés en présence de leur mère. Le jour de la naissance était appelé J0. Les ratons ont été euthanasiés par dislocation cervicale à 36 jours (J36) de vie.

## Schéma expérimental

Dés la naissance et jusqu'au 21<sup>ème</sup> jours de vie, les ratons étaient soumis à un traitement oral de METRONIDAZOLE ou de PBS 1X. A J36, des études de motricité et de perméabilité *in vivo* étaient réalisées puis les animaux étaient sacrifiés par décapitation. Du sang intracardiaque et les colons étaient prélevés. Les pièces étaient placées dans une solution de Krebs's. Des segments coliques proximaux et distaux étaient placés en chambre de USSING pour les études fonctionnelles, et d'autres étaient conditionnés en vu de réaliser des dissections des plexus myentériques (whole mount), des études immunohistochimiques, anatomopathologique, ELISA, et PCR.

## Antibiothérapie périnatale

Un traitement antibiotique par METRONIDAZOLE était administré dans l'eau de boisson des ratte spragues Dawleys gestantes au cours des 4 derniers jours de gestation et de la première journée de vie des ratons (1g/L). A partir de J1 et jusque J21, le METRONIDAZOLE per os était administré aux ratons par gavage (7,5g/kg/j). Une ratte gestante et les douze ratons de sa portée étaient traités par le METRONIDAZOLE (groupe AB), une ratte gestante et ses douze ratons étaient traités, selon les mêmes modalités par du PBS 1X (groupe PBS).

## Motricité *in vivo*

Temps de transit intestinal: les ratons recevaient 100 µl d'une solution de rouge carmin (60 mg/ml) en début de journée. L'apparition de la première crotte rouge était mesurée en minutes.

Pourcentage d'eau dans les selles: les rats étaient isolés dans des cages individuelles, sans accès à l'eau pendant 1 h. Les selles étaient collectées et pesées le jour même puis après une semaine d'incubation à 50°C. Le pourcentage d'eau était calculé et exprimé en pourcentage du poids total.

Temps d'expulsion d'une bille intrarectale: la mesure de la motricité du côlon distal a été évaluée en utilisant une méthode précédemment décrite (de Vries, Soret et al. 2010). Cette méthode vise à évaluer le transit du côlon distal en mesurant le temps d'expulsion d'une bille introduite dans le rectum. Les rats ont été placés dans une cage individuelle en plexiglas transparent, isolée du froid, sans litière ni nourriture. Une bille de verre de 2mm de diamètre a été introduite à 5 mm de la marge anale d'un raton vigile à l'aide d'une pipette en verre recouverte de vaseline. Le temps d'expulsion de la bille a été mesuré en secondes. Si la bille n'était pas expulsée au bout d'une heure, le test était arrêté afin de limiter l'isolement des rats ainsi que leur refroidissement.

### **Perméabilité *in vivo***

La procédure utilisée pour la mesure de la perméabilité paracellulaire intestinale a été réalisée selon de précédents travaux (Aube, Cabarrocas et al. 2006). La perméabilité intestinale a été déterminée par la mesure de l'apparition d'un marqueur fluorescent dans le sang, le Fluorescein isothiocyanate-Dextran-4 ou FD-4 (4.4 kDa, SIGMA, Saint Quentin Fallavier, France). Un volume de 150 µl de PBS 1X filtré contenant 44 mg/ml de FD-4 est administré par gavage. Cinq heures après l'administration du marqueur, des échantillons d'environ 150 µl de sang sont récupérés à l'aide de pipettes pasteur par prélèvement rétroorbital. Le sang prélevé a été placé à 4°C dans des tubes contenant 5 µl d'ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA ; SIGMA). Le sang a été centrifugé à 3000 rpm à 4°C pendant 20 minutes. 50 µl de plasma a été mélangé à un volume équivalent de PBS 1X filtré (pH = 7,4). La concentration de FD-4 présente dans le plasma a été déterminée à l'aide d'un fluorimètre (Perkin-Elmer, France ; longueur d'onde d'excitation : 485 nm / longueur d'onde d'émission : 530 nm).

### **Perméabilité *ex vivo***

Les segments de colon rincés et ouverts sur le bord antimésentérique, étaient placés entre les deux demies chambres de Ussing, dans un milieu de culture DMEM : F12 oxygéné (Dulbecco's modified Eagle's medium ; Invitrogen ; St Quentin Fallavier, France) (Pour 500

ml de DMEM : F12, 6 ml de glutamine à 200 mM, 16 ml de NaHCO<sub>3</sub> à 4.5g/100ml, 13 ml d'eau stérile, 5 ml de pénicilline streptonicine, 1 ml de gentamicine, 125 µl d'amphotéricine, 500 µl de sérum de veau fœtal décomplémenté). L'acide sulfonique (478 Da, 0.1mg/ml, SIGMA) était placé dans la demie chambre du côté luminal (côté CEI). Des mesures de la fluorescence présente dans la demie chambre de Ussing du côté séreux étaient effectuées toutes les trente minutes pendant 150 mn (Varioskan; Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). L'équation de la courbe obtenue est de la forme (ax+b), « a » représentant le flux de diffusion de l'acide sulfonique à travers le segment et est directement utilisé comme un indice de la perméabilité intestinale.

### **Etude morphologique**

Un segment de 5 mm de côlon distal tubulisé a été fixé dans du paraformaldehyde (Sigma ; 4% dans PBS) pendant 3 heures suivi de trois lavages au PBS 1X de dix minutes chacun. Les tissus ont été conservés dans du PBS/NaN<sub>3</sub>. Des coupes transversales ont été réalisées après inclusion en paraffine. Une coloration des tissus à l'hématoxyline-éosine a été effectuée. Les lames ont été observées au microscope droit au grossissement 20X. Les paramètres suivant ont été mesurés : hauteur des villosités, de la muqueuse, de la sous-muqueuse, des couches musculaires circulaire et longitudinale. Au grossissement 40X, les cryptes ont été mesurées, ainsi que la hauteur des cellules épithéliales. Dans chaque champ visuel, il a été compté le nombre de vacuoles de mucus, de mitoses et de cellules inflammatoires, ces chiffres ont été rapportés au nombre de cryptes par champ. Pour chaque échantillon tissulaire, 5 champs ont été étudiés, et moyennés.

### **Dosage des protéines**

Un segment de colon distal était placé (après avoir rincé le contenu fécal) dans une solution RIPA (Millipore) et conservé à -80°C. La concentration d'Acétylcholine et de VIP était mesurée après homogénéisation des tissus par des kits de dosage (Amplex Red, acetylcholine/acetylcholinesterase et VIP assay kit, Invitrogen) et rapporté à la concentration des protéines totales (Prolifigen NSE IRMA; Dia-Sorin, Stillwater, MN).

### **PCR en temps réel**

Les ARN totaux ont été extraits à partir des échantillons coliques proximaux et distaux en utilisant l'ARN Nucleospin II (Macherey Nagel, Hoerd, France). L'ADNc a été synthétisé en utilisant le SuperScript III de la transcriptase reverse (Life Technologies, Cergy-Pontoise,

France) selon les recommandations du fabricant. Les PCR quantitative (qPCR), ont été réalisées en utilisant des amorces conçues avec Blast Primer (NCBI) à partir de séquences nucléotidiques de rat norvegicus antérieurement publiées (Icare) et décrit dans le tableau 1. Les amplifications PCR ont été réalisées en utilisant le LightCycler® 480 SYBR green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) selon le protocole du fabricant, sur un Rotor-Gene Q (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'expression du gène d'intérêt a été normalisée à l'expression du gène S6 qui a été mesurée en parallèle comme contrôle interne. La liste des différents primers des gènes neuronaux, gliaux et de cytokines figure dans le tableau ci-dessous.

Gene	Protein name	Forward primer	Reverse primer	Accession number
IFNg	Interferon Gamma	TCTGGATATCTGGAGGAAGTGGC	CTTATGTTGTTGCTGATGGCCTG	NM_1388880
IL10	Interleukine 10	TGCTATGTTGCCTGCTCTACTG	TCAAATGCTCCTTGATTTCTGG	NM_012854.2
IL1B	Interleukine 1 beta	TCCTGTGTGATGAAAGACGGCAC	GTGCTGATGTACCAGTTGGGGAAC	NM_031512.2
GFAP	Glial Fibrillary active protein	CCTGGAACAGCAAAACAAGG	AGCCTCAGGTTGGTTTCATC	NM_017009.2
S100B	S100 Calcium Binding Protein B	GAGCTGGAGAAGGCCATGG	CTAATCTCACTCATGTTCAAAGAACTC	NM_013191.1
nNOS	neuronal Nitric oxide synthase	ATCGGCGTCCGTGACTACTG	TCCTCATGTCCAAATCCATCTTCT	NM_052799
VIP	vasoactive intestinal peptide	TTGGCAAACGAATCAGCAGTAG	ATTTGCTTTCTAAGCGGGTGTGA	NM_053991.1
S6	ribosomal protein S6	CCAAGCTTATTCAGCGCTTGTACTCC	CCCTCGAGTCCTTCACTCTTGGC	NM_017160.1

Tableau 1 : Séquences nucléotidiques utilisées pour les PCR en temps réel.

### **Microscopie confocale**

Procédure endoscopique : L'endoscopie colique était réalisée sous anesthésie générale. La dose optimale de 10% de fluorescéine (fluorescéine sodique 10%, Novartis Pharma, France), a été injectée par voie intraveineuse dans la queue. La minisonde confocale (ColoFlex UHD, Cellvizio, Mauna Kea Technologies, Paris, France) était minutieusement introduite dans l'anus, et remontée sur une distance de 3-5cm. Ensuite, des enregistrements vidéo étaient réalisés pendant 5 minutes à compter de l'injection de fluorescéine. Un film était enregistré pour chaque raton.

Analyse quantitative des films vidéo : Les films ont été conservés en format .png pour une meilleure qualité d'image et analysés grâce au logiciel IC-Viewer (Cellvizio, Mauna Kea Technologies, Paris). Pour chaque film, la fluorescence moyenne des cryptes étaient mesurées sur au moins 6 images différentes. Puis 20 cryptes par film étaient sélectionnées et l'axe majeur (Ma) et l'axe mineur (ma) des lumières de chacune étaient mesurés. Le rapport Ma/ma ayant été défini dans une étude préalable, comme un critère d'inflammation de la muqueuse colique (Musquer, Coquenlorge et al. 2013)

## Analyses statistiques

Les résultats sont donnés en moyenne plus ou moins l'erreur standard (mean +/- SE). Les comparaisons entre deux groupes non appariés ont été réalisées par un test de Mann-Whitney (t-test non paramétrique). Pour comparer plus de deux groupes, une analyse ANOVA, à une ou deux voies, suivie d'un post-test selon Bonferroni a été effectuée. Une valeur de  $p < 0,05$  indique une différence statistiquement significative. Les analyses ont été effectuées grâce au logiciel Prism version 4 installé sur un ordinateur MacBook (Macintosh).

## **RESULTATS**

### Effets de l'antibiothérapie sur la motricité digestive

*In vivo*, le temps de transit total ralentit entre J21 (479 +/- 19 min) et J36 (où tous les animaux n'avaient pas émis de selles rouges après 9h). L'administration d'antibiotique (AB) ne modifiait pas le temps de transit à J21, date de fin du traitement. En revanche, à J36, après 15 jours d'arrêt des AB, les rats traités avaient un temps de transit significativement plus faible (572 +/- 7 min) par rapport aux rats contrôles (non traités) (Fig 1 A).

À J21, le temps d'expulsion de la bille n'était pas changé par le traitement antibiotique (Fig 1B). Le contenu en eau des selles augmente entre J21 (42 +/- 3% poids humide/poids total des selles) et J36 (66 +/- 2 %). L'administration d'antibiotique n'influe pas ce paramètre (Fig 1C).

### Effets de l'antibiothérapie sur la perméabilité paracellulaire

Après 21 jours de traitement par antibiotique, on observe une augmentation significative de la perméabilité *in vivo* par rapport aux rats contrôles (Figure 2A). En revanche 15 jours après l'arrêt du traitement, la perméabilité *in vivo* est identique dans le groupe des rats AB vs rats contrôle. L'analyse *in vitro* de la perméabilité colique en chambre de Ussing, a ensuite été effectuée dans des segments de colons proximaux et distaux. Nous avons montré une augmentation significative de la perméabilité dans le colon proximal (Fig. 2C) mais pas distal (Fig. 2D) 15 jours après l'arrêt des AB par rapport au groupe contrôle.

En parallèle, nous avons évalué l'impact du traitement AB sur l'intensité de la fluorescence des cryptes, mesurée par endomicroscopie confocale. Nous avons ainsi montré



que l'intensité de fluorescence mesurée dans les cryptes (évalué dans le colon distal) était identique dans le groupe AB par rapport au groupe contrôle.

#### Effets de l'antibiothérapie sur la morphologie du colon

Nous avons ensuite évalué les modifications morphologiques du colon distal potentiellement induites par l'antibiothérapie. En analysant des coupes HE, nous n'avons pas observé de modification significative de l'épaisseur de la muqueuse (Fig. 3A), de la sous-muqueuse (Fig. 3B), ni des couches musculaires lisses circulaire et longitudinale entre les deux groupes (contrôle vs AB).

#### Effets de l'antibiothérapie sur la muqueuse colique

Après 15 jours d'arrêt du traitement antibiotique, la taille des cryptes était identique dans le groupe AB par rapport au groupe contrôle (Fig. 5A). En revanche, le nombre de mitoses et de cellules inflammatoires, rapportées au nombre de cryptes était significativement diminué après antibiothérapie ( $0,4 \pm 0,07$  vs  $0,2 \pm 0,03$  et  $1,02 \pm 0,17$  vs  $1,04 \pm 0,09$  respectivement). (Fig. 5B et E). De plus, la hauteur des cellules épithéliales de surface était diminuée dans le groupe AB ( $28,94 \pm 0,76 \mu\text{m}$  vs  $25,24 \pm 0,8791 \mu\text{m}$ ). En revanche, le nombre de vacuoles (identifiant probablement les cellules sécrétant du mucus) était inchangé.

En parallèle, nous avons utilisé l'endomicroscopie confocale pour évaluer les effets de l'antibiothérapie sur la morphologie de la muqueuse. Nous avons montré que le rapport entre le grand axe et le petit axe de la lumière des cryptes ( $Ma/ma$ ), était augmenté dans le groupe AB par rapport au groupe contrôle ( $2,7 \pm 0,3$  vs  $1,8 \pm 0,1$ , respectivement ;  $n=2-3$ ) (Fig. 5F).

#### Neuromédiateurs du SNE et antibiothérapie

Dans une dernière partie, nous avons caractérisé les effets de l'antibiothérapie sur l'expression de médiateurs neuro-glio cibles, 15 jours après l'arrêt du traitement. Dans le colon proximal, nous avons montré que le traitement antibiotique ne modifiait pas l'expression des ARNm de la nNOS, du VIP, de la GFAP ou de S100b (Fig. 4). De plus on n'observait pas de différence d'expression de VIP ou d'ACh dans les colons proximaux provenant de raton du groupe AB vs contrôle. Enfin, nous avons montré que l'expression des ARNm de l'I1b et I10 dans le colon proximal (Fig 6 A, B) et dans le colon distal (Fig.6 C, D) était semblable dans les deux groupes.

## DISCUSSION

Cette étude a permis de mettre en évidence un impact fonctionnel rémanent d'une antibiothérapie néonatale sur la motricité et sur les fonctions de barrière intestinale chez le raton. En particulier, nous avons mis en évidence une augmentation du transit intestinal associé à une augmentation de la perméabilité paracellulaire colique chez les ratons traités par antibiothérapie par rapport aux contrôles. D'autre part, d'un point de vue histologique, bien que la morphologie colique n'ait pas été altérée, les ratons sous antibiotique présentaient des altérations microscopiques de la barrière épithéliale caractérisée par une réduction de la hauteur épithéliale et de la prolifération cellulaire et du nombre de cellules immunitaires dans le tissu de soutien. Parallèlement, en microscopie confocale, l'aspect de la lumière des cryptes après 15 jours de traitement était ovoïde. Cet aspect, mis en évidence chez l'homme dans la maladie de Crohn, serait un élément en faveur d'une inflammation persistante (Musquer, Coquenlorge et al. 2013).

L'ensemble de ces données suggèrent qu'un traitement prolongé par antibiotique durant la période néo natale induit des lésions de la barrière épithéliale intestinale rémanentes qui pourraient conduire à une augmentation de la susceptibilité à développer des dysfonctions digestives inflammatoires participant au développement des entérocolites ulcéronécrosantes.

Un des premiers résultats de notre étude est la présence de modifications fonctionnelles du tube digestif, associé à des altérations microscopiques de la barrière épithéliale intestinale quinze jours après l'arrêt du traitement. Des modifications de la fonction de barrière, notamment immunitaire, ont déjà été rapportées dans d'autres études (Schumann, Nutten et al. 2005) chez le raton. Cependant, une des limites de notre étude est l'absence d'identification de mécanismes responsables de ces altérations. La modification de la flore par l'antibiothérapie pourrait potentiellement être responsable des lésions observées. En effet, le métronidazole présente une action ciblée contre les germes anaérobies, et pourrait produire un déséquilibre dans la composition de la flore en cours d'évolution. Plusieurs arguments corroborent cette hypothèse. La première est la colonisation séquencée du tube digestif à partir de la naissance avec l'apparition des bifidobactéries, anaérobies, entre le 2<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jours de vie (Mitsuoka, Hayakawa et al. 1974). La seconde est le rôle d'une réduction de la diversité de la flore dans l'apparition d'altérations fonctionnelles microscopiques de la muqueuse, en terme d'efficacité immunitaire ou de diminution de

renouvellement cellulaire. (Alam, Midtvedt et al. 1994; Shanahan 2002). Par ailleurs, on ne peut exclure l'action directe de la molécule de METRONDAZOLE sur le SNE.

Dans une deuxième partie, nous avons initié l'étude visant à déterminer si les altérations observées étaient en lien avec des modifications du SNE. Cette étude préliminaire visait à caractériser l'expression de la transcription des médiateurs neuronaux et gliaux. Étonnamment, nous n'avons pas mis en évidence de modification du phénotype du SNE. Ceci pourrait être en rapport avec les techniques utilisées. En effet, la variation du phénotype est sans doute minime, et l'expression des mARN sur la totalité du tissu n'est certainement pas assez discriminante. Une étude du phénotype histochimique, après micro dissection des couches d'intérêt, les whole mount, devra être réalisée pour améliorer ces résultats. De la même façon, l'expression de la transcription des facteurs gliaux, GFAP et S100b n'était pas altérée dans notre étude, ni logiquement, l'expression de la transcription des cytokines IL10 qui régulent ces médiateurs gliaux, pour les mêmes raisons, cela ne nous permet pas de conclure.

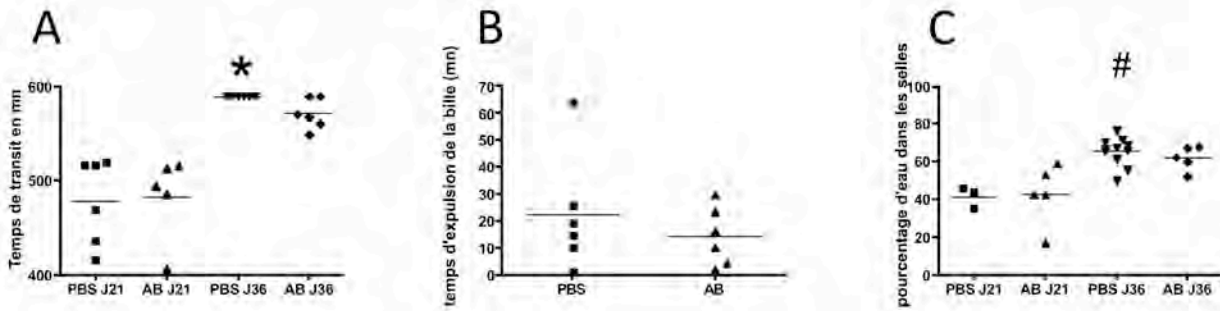
Une des questions soulevée par cette étude est la rémanence des lésions, ou au contraire leur aspect transitoire. En effet, la période néonatale est une période critique dans le développement des fonctions de l'organisme, et nombres d'altérations infracliniques peuvent aboutir à des pathologies de l'âge adulte. C'est notamment le cas de l'obésité induite par une antibiothérapie chez le rat (Morel, Oosting et al. 2013), et de dysfonctions digestives induites à l'âge adulte, chez le rat également, par un stress néonatal (Gareau, Jury et al. 2007). Nous avons donc également initié une étude pour déterminer, sur la base des lésions observées, si ces animaux ont une susceptibilité accrue à développer une inflammation digestive car il a été démontré que les patients porteurs de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, présentent une perméabilité intestinale augmentée préalablement à l'apparition de l'inflammation. Par ailleurs, nous ne savons pas dans quelle mesure le microbiote a été perturbé, ni si une souche particulière est concernée par les effets observés.

Enfin, une diminution du nombre de cellules immunitaires, suggère que ces animaux ont une capacité plus réduite à se protéger d'une agression par pathogènes. Si de tels résultats étaient observés chez l'homme, cela pourrait expliquer en partie la susceptibilité induite par les antibiotiques à développer une entérocolite ulcéro-nécrosante.

En conclusion, nos travaux suggèrent qu'un traitement par antibiotique, identique à ceux utilisés en pratique clinique courante, induit un dysfonctionnement de la barrière intestinale et augmente la perméabilité colique, même après 15 jours d'arrêt du traitement. Ces résultats apportent des alternatives à la compréhension de la physiopathologie du développement d'entéocolites ulcéronécrosantes chez l'enfant prématuré traité par antibiotique, et le risque de ces patients de développer des pathologies digestives ultérieures.

# FIGURES

## Figure 1



## Figure 2

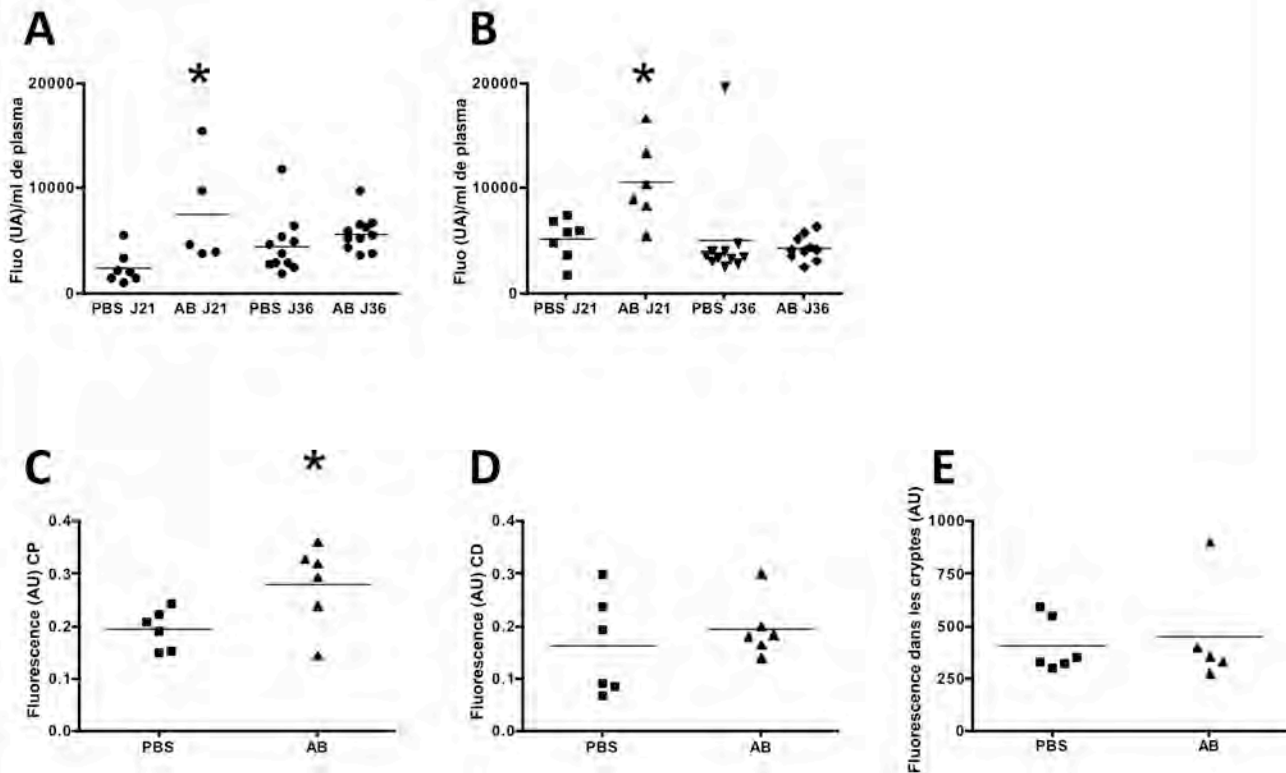


Figure 3

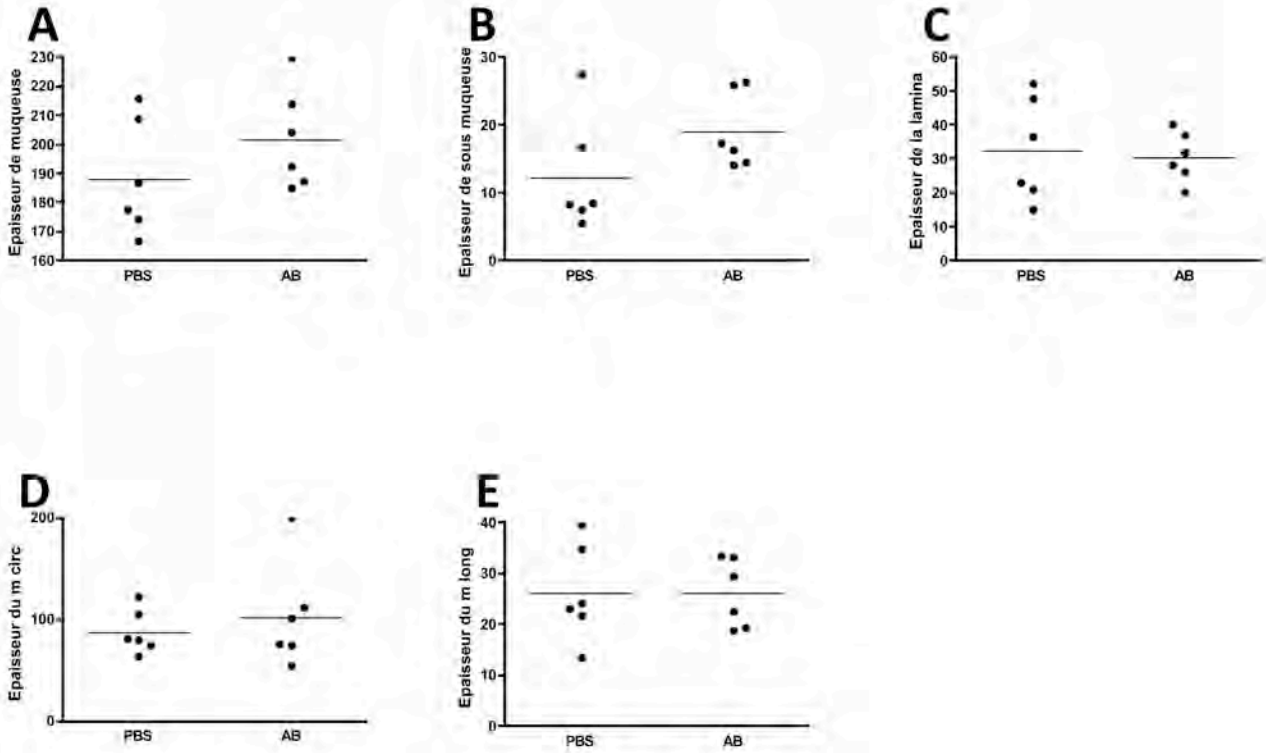


Figure 4

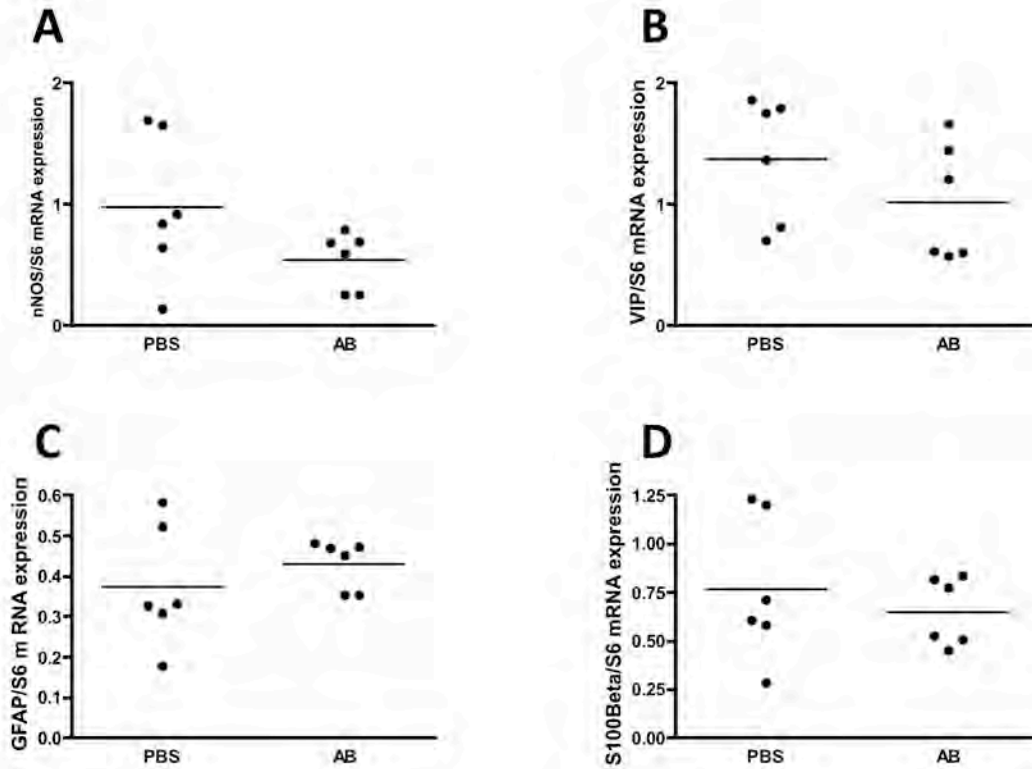


Figure 5

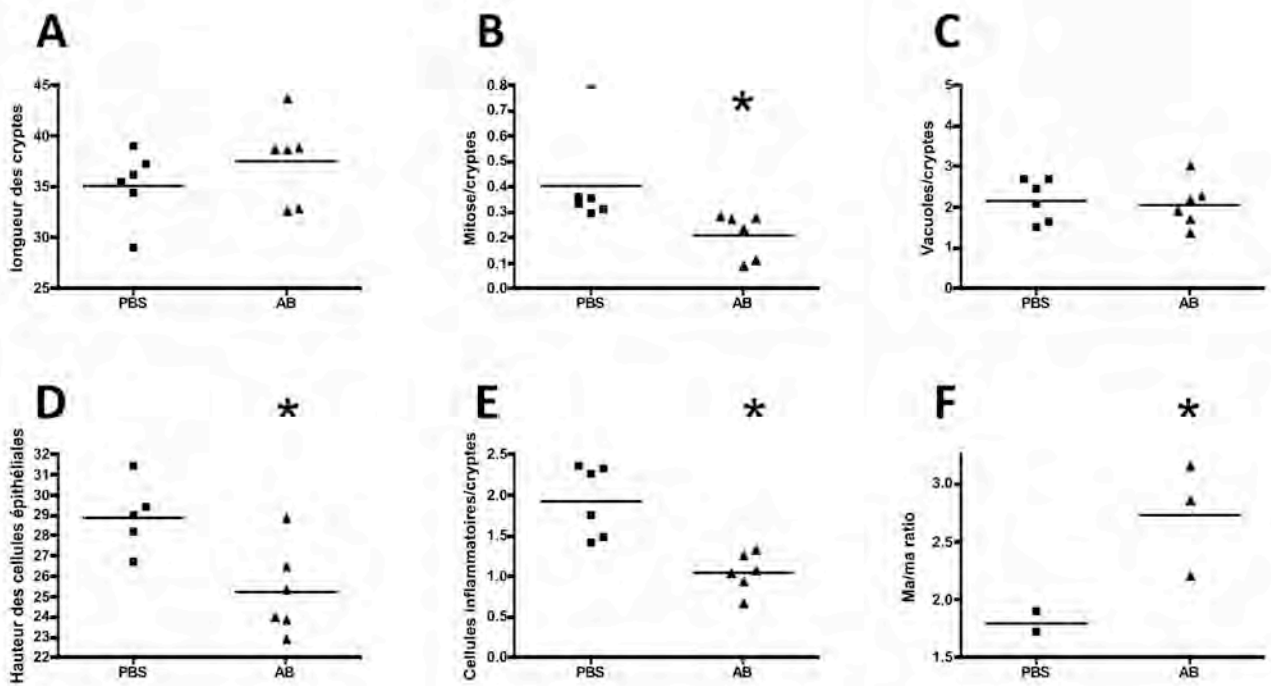
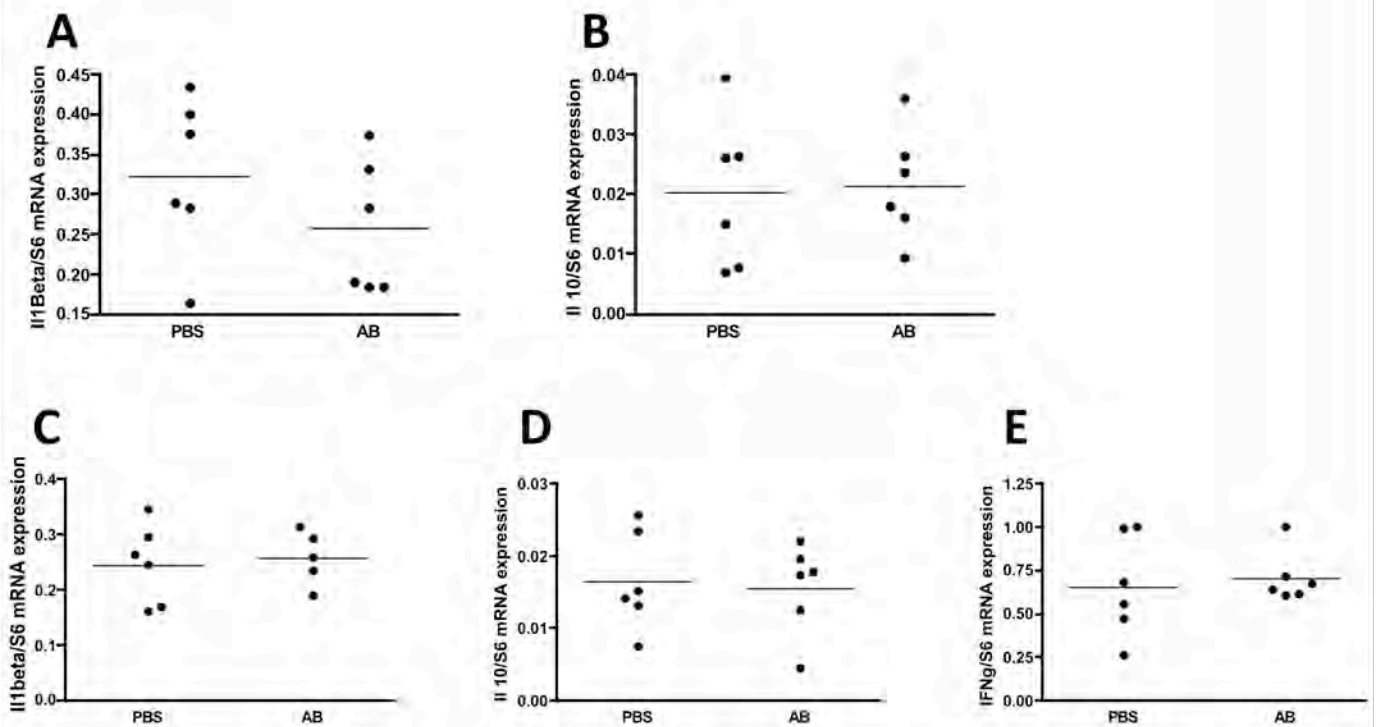


Figure 6



## LEGENDES

Figure 1 : Impact de l'antibiothérapie néonatale (AB) sur la motricité *in vivo*. Le temps de transit mesuré par le temps d'élimination du rouge carmin en minute (mn) augmente entre J21 et J36. L'antibiothérapie n'influe pas le temps de transit à J21 (PBS n=6 vs AB n=6). Après 15 jours d'arrêt des antibiotiques, les rats AB ont un temps de transit moins rapide que les rats PBS (n=6 dans chaque groupe, \* p<0,01 comparé aux 3 autres groupes) (A). Le temps d'expulsion de la bille n'est pas significativement différent à J21 (B). Les selles sont plus sèches à J21 qu'à J36 (n=6 à J21, tous les rats n'avaient pas émis de selle en 1 heures. n=12 à J36. #p<0,001 PBS J21 vs PBS J36). L'antibiothérapie n'influe pas le pourcentage aqueux des selles (C).

Figure 2 : Impact de l'antibiothérapie néonatale *in vivo* (A et B) et *ex vivo* (C, D et E) sur la perméabilité de la barrière intestinale. Le dosage plasmatique de la fluorescence 30 mn (A) et 60 mn (B) après gavage de 0.1 ml de FITC-dextran à 5 mmol/l montre une augmentation significative de l'absorption à J21 dans le groupe AB vs le groupe PBS (n>6 dans chaque groupe, \*p<0,01). En chambre de USSING, la vitesse de passage de la fluorescence du milieu apical vers le milieu basal, était significativement augmentée chez les rats traités dans le colon proximal (n=6 dans chaque groupe, \*p=0,03) (C). Dans le colon distal, la différence n'est pas significative (D). En microscopie confocale, et après injection intraveineuse de 5 mL de fluorescéine à 10%, la mesure de la fluorescence dans les cryptes colique n'était pas différente dans les deux groupes (E).

Figure 3 : Impact de l'antibiothérapie néonatale sur l'histologie du colon, 15 jours après l'arrêt du traitement. En microscopie optique, en coloration HE (Hématoxyline et Eosine), la morphologie du tube digestif n'est pas altérée (n=6 dans chaque condition). Les mesures, en µm de l'épaisseur de la muqueuse (A), la sous muqueuse (B), de la lamina (C), des muscles lisses circulaires (D) et longitudinaux (E) n'étaient pas significativement différentes.

Figure 4 : Impact de l'antibiothérapie néonatale sur l'expression des neuromédiateurs du SNE, 15 jours après l'arrêt du traitement. Le phénotype des neurones entériques évalué via l'expression des mRNA des neuromédiateurs NOS (A) et VIP (B) et des cellules gliales, via l'expression des mRNA du GFAP (C) et de S100β (D), rapporté à l'expression du mRNA du ribosome S6, n'est pas modifié par l'antibiothérapie. (n=6 par groupe)



Figure 5 : Impact de l'antibiothérapie sur l'inflammation de la barrière épithéliale, 15 jours après l'arrêt du traitement. La longueur des cryptes (A), la hauteur des cellules épithéliales (D), le nombre de mitoses, de vacuoles et de cellules inflammatoires par cryptes (B, C et E respectivement) étaient mesurés ou comptés en microscopie optique, en coloration HE (Hématoxyline et Eosine). La hauteur des cellules épithéliales était significativement diminuée dans le groupe AB (n=6 dans chaque groupe, \*p=0,01), le nombre de cellules inflammatoires et de mitoses étaient significativement diminués dans le groupe AB (n=6 dans chaque groupe, \*p<0,05). En microscopie confocale (F), le rapport de l'axe majeur (Major axis) sur l'axe mineur (minor axis) de la lumière des cryptes était significativement augmenté (n=2 et 3, \*p=0,08). Le changement d'architecture de la lumière des cryptes est le reflet d'une inflammation muqueuse d'après Musquer et al.. Abréviation : Ma: major axis; ma: minor axis; Ma/ma ratio: crypt lumen major axis over minor axis ratio. (Musquer, Coquenlorge et al.)

Figure 6 : Impact de l'antibiothérapie sur l'inflammation, après 15 jours d'arrêt du traitement. La production d'ILbeta (A, C) et d'IL10 (B, D) et d'interféron gamma (E) dans le colon proximal (A, B) et dans le colon distal (C, D, E) n'était pas modifiée dans les deux groupes.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèses s'inscrivent dans un axe de recherche visant à mieux appréhender le développement post natal des fonctions digestives, le rôle joué par le système nerveux entérique et enfin l'implication de facteurs environnementaux dans la maturation post natale des fonctions digestives. Ils ont permis de caractériser les changements fonctionnels du tube digestif, et la corrélation avec l'évolution du phénotype des neurones myentériques. Ils ont alors donné la possibilité de vérifier l'impact de facteurs environnementaux alimentaires tel que le butyrate ou médicamenteux, tel que le METRONIDAZOLE, sur la mise en place des fonctions digestives. Nos résultats tendent à démontrer que le butyrate module le phénotype neurochimique des neurones du SNE, et la mise en place du transit intestinal, et que l'administration néonatale d'antibiotique agit sur le développement des fonctions de la barrière intestinale.

Le principal résultat de la première partie de la thèse, a été de mettre en évidence l'immaturation fonctionnelle digestive chez le raton nouveau-né. Au cours des premiers jours de vie, les ratons isolés de leur mère n'exonèrent pas. La dépendance aux soins maternels est probablement liée à l'absence d'activité péristaltique dans le colon. En effet, *ex vivo* nous n'avons pas observé de contraction spontanée avant le quatorzième jour de vie. L'absence de complexe moteur migrant colique néonatal a également été mise en évidence chez la souris en 2007 (Roberts, Murphy et al. 2007). En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de modification de la perméabilité colique *ex vivo*, contrairement à ce qui a été retrouvé chez le porcelet, où une augmentation initiale puis une diminution secondaire de la perméabilité a été établie (De Quelen, Chevalier et al. 2010). Cette discordance peut être liée à des différences interspèces entre l'évolution de la surface d'absorption, par croissance épithéliale, et à l'augmentation concomitante de l'expression des jonctions serrées. Chez l'homme, l'activité péristaltique intestinale est présente dès la 11<sup>ème</sup> semaine de gestation, et les fonctions digestives du nouveau-né à terme sont plus matures que celles de l'enfant né prématurément. Cependant, leur évolution se poursuit au cours des premiers mois de vie, et l'enfant né prématurément présente une vidange gastrique et un temps de transit ralenti (Berseth 2006). Les fonctions de la barrière épithéliale sont également immatures, l'évaluation de la perméabilité intestinale par le dosage urinaire de mannitol ou de lactulose après administration entérale dans un service de néonatalogie, a confirmé que les enfants prématurés avaient une perméabilité augmentée par rapport aux nouveau-nés à terme et en bonne santé (Corpeleijn, van Elburg et al. 2011). Ainsi, la physiologie digestive du raton nouveau-né se rapproche de celle du grand prématuré, et les concepts développés sur ce

modèle pourraient être utilisés pour la compréhension de la physiologie et des mécanismes évolutifs du tube digestif.

Un autre résultat important de ce travail a été d'identifier le SNE comme un des constituants du tube digestif responsable de cette immaturité fonctionnelle digestive chez le raton nouveau-né et de montrer que la période post natale est une période importante de développement du SNE. En effet, il a été clairement établi, depuis des années, que la période embryonnaire est une période clef du développement du SNE. Ainsi, la colonisation de l'ensemble du tube digestif par les cellules de la crête neurale est terminée dès E 14 chez la souris et dès la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme. Or l'évolution postnatale du phénotype et des fonctions du SNE reste largement méconnue. Nos résultats montrent que de la naissance au sevrage, chez le raton, il existe (i) une évolution morphologique de SNE et (ii) une évolution du phénotype du SNE. En effet, tandis que la densité des neurones du plexus myentérique à la surface de la couche musculaire longitudinale diminue, leur taille augmente. Ces constatations avaient déjà été publiées antérieurement chez le rat (Schafer, Hansgen et al. 1999). Parallèlement, nous avons observé une augmentation de la proportion de neurones immunoréactifs à la ChAT et à la NOS, comme Vannucchi auparavant (Vannucchi and Fausson-Pellegrini 1996). L'augmentation du phénotype cholinergique post natale concomitante de l'apparition du péristaltisme intestinal a également été démontré chez la souris (Roberts, Ellis et al. 2010) et chez le cobaye où l'apparition d'une transmission neuromusculaire tachykinergique est différée par rapport à la naissance (Bian, Burda et al. 2009). En outre, des travaux en cours dans l'unité suggèrent que l'évolution post natale du SNE ne se limiterait pas aux neurones mais affecterait aussi les cellules gliales entériques. Pendant la période postnatale, l'expression des marqueurs gliaux augmente dans le colon, suggérant une différenciation gliale. De plus, les cellules gliales entériques pourraient également participer à la maturation neuronale, de part leur action régulatrice sur l'expression des neuromédiateurs dont NOS et ChAT dans le SNE (Aube, Cabarrocas et al. 2006).

Ces travaux nous ont aussi permis de nous intéresser aux facteurs environnementaux potentiellement impliqués dans la maturation des fonctions digestives, et plus particulièrement du SNE. En effet, si le développement des différentes fonctions de l'organisme est sous le contrôle du patrimoine génétique, il est de plus en plus évident que les facteurs environnementaux jouent aussi un rôle central ; et ceci spécialement dans le tube digestif qui représente une surface d'échange considérable et qui est soumis en période néonatale à un changement d'alimentation notable et à une colonisation précoce.

Parmi les facteurs environnementaux actuellement au centre de l'intérêt des gastroentérologues se trouve le microbiote intestinal. Ses interactions avec les fonctions digestives physiologiques et pathologiques sont multiples et le microbiote jouerait un rôle central dans le développement des fonctions digestive (Goulet, Colomb-Jung et al. 2009) dont bien sûr les fonctions motrices (Quigley 2011).

Or, l'influence principale du microbiote sur l'hôte provient du métabolisme bactérien des composés présents dans le côlon et en particulier du métabolisme des sucres non digestibles et des protéines. Les produits terminaux des fermentations bactériennes digestives sont très divers mais parmi les métabolites majeurs se trouvent les AGCC, dont le butyrate. Il a été montré que sa production augmente au cours des premiers mois de vie chez le raton (Barrat, Michel et al. 2008), témoignant d'un phénomène évolutif post natale, comme chez l'homme.

La deuxième partie de ce travail a alors montré que les lavements de butyrate induisaient des changements important du phénotype des neurones myentériques corrélée à une accélération de la motricité du colon distal et à des changements de la transmission neuromusculaire.

La voie intrarectale a été choisie pour contourner l'assimilation et la dégradation intestinale du butyrate. Ce mode d'administration est déjà utilisé en clinique en cas de retard d'émission du méconium et pour diminuer le temps d'iléus. Cependant, cette prise en charge peut entraîner d'autres complications, comme des perforations intestinales ou des lésions rectales (Amodio, Berdon et al. 1986). Il est difficile d'attribuer ces complications à un problème technique ou à la fragilité constitutionnelle du nouveau-né. Au cours de nos expérimentations, nous n'avons jamais mis en évidence d'effraction, de rectorragie, ni de perforation intestinale traumatique. Une des constatations majeure de cette étude a été l'accélération du transit à la suite des lavements de butyrate 2,5 mM. Celle-ci ne peut être mise sur le compte de l'action mécanique des lavements, puisque les résultats étaient spécifiques au butyrate, et étaient significativement différents des lavements contrôle au sérum physiologique ou au mannitol, dont l'osmolarité est similaire au butyrate. De plus, l'action du butyrate sur l'accélération de la motricité colique avait déjà été démontrée chez le rat âgé, pour des concentrations plus élevées (5mM) (Soret, Chevalier et al. 2010). Par ailleurs, des lavements de butyrate à de fortes concentrations peuvent induire des colites. Or, dans cette étude, nous avons utilisé une dose physiologique, et n'avons pas mis en évidence, à

la concentration 2,5 mM de perturbation *ex vivo* de la perméabilité intestinale, soulignant l'absence de colites induites chez nos rats.

Nous avons observé un effet des lavements au butyrate sur le phénotype neurochimique du SNE dans le colon distal. Après avoir vérifié que les lavements réalisés inondaient la totalité du colon jusqu'au caecum, il se pourrait que le temps de contact ait été moindre dans le côlon proximal, ou bien qu'il existe des sensibilités différentes en fonction de la localisation. Et de fait, les concentrations naturelles de butyrate sont plus élevées dans le caecum que dans le rectum (Cummings, Pomare et al. 1987). Enfin, cette différence pourrait également être liée à la dynamique rostro-caudale du développement du SNE, et la proportion des neurones cholinergiques et nitrergiques augmenterait selon le même gradient aboral que la colonisation de l'intestin par les cellules de la crête neurale.

L'augmentation du phénotype nitrergique était spécifique des rats, et n'avait pas été retrouvé chez le rat adulte (Soret, Chevalier et al. 2010). La raison de cette différence liée à l'âge reste inconnue, mais une hypothèse pourrait être liée à l'action épigénétique du butyrate sur les neurones myentériques pendant la période postnatale (Wallace and Burns 2005), ou bien à une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuronaux, encore présents durant la période postnatale. (Kruger, Mosher et al. 2002) Cependant, nous n'avons pas démontré d'augmentation conjointe du nombre de neurones par ganglions après le traitement par le butyrate. Ces travaux étendent donc les effets bénéfiques, aux doses physiologiques, du butyrate, connus chez l'adulte à l'enfant. Parallèlement, des études récentes suggèrent que les coliques du nourrisson sont associées à un déficit de bactéries butyrogènes (de Weerth, Fuentes et al. 2013). De ce fait, nos travaux ont servi de base à l'étude clinique NEOTRANS, visant à administrer aux enfants prématurés des lavements de butyrate pour améliorer la tolérance digestive et contrer les ralentissements du transit.

La dernière partie de notre thèse a porté sur l'étude de l'impact d'une antibiothérapie sur les fonctions digestives et sur le SNE.

D'une part, l'antibiothérapie permettait d'altérer le microbiote intestinal et ainsi d'étudier indirectement les conséquences d'une dysbiose sur le système nerveux entérique et sur les fonctions digestives. D'autre part, d'un point de vue clinique, les nouveau-nés et en particulier les prématurés reçoivent couramment des antibiotiques dont l'innocuité à court et à long terme est actuellement remise en question. Ils sont notamment suspectés d'augmenter les risques de survenue d'entérocolite ulcéronécrosante dans les unités de néonatalogie (Neu

2007; Claud and Walker 2008), mais aussi d'avoir un rôle dans l'incidence de certaines obésités (Million, Lagier et al. 2013; Million and Raoult 2012; Morel, Oosting et al. 2013).

Nous avons d'abord testé certains antibiotiques couramment utilisés chez le nouveau-né, et le METRONIDAZOLE a été choisi après les études préliminaires sur les antibiotiques les plus couramment utilisés dans les services de néonatalogie, et en raison de son action sur les bactéries anaérobies. Le traitement oral a été initié dès la naissance et jusqu'à 21 jours de vie, moment du sevrage, à la période où le microbiote se met en place. Des expériences ont été réalisées *in vivo* à la fin du traitement et *in vivo* et *ex vivo* après 15 jours d'arrêt du traitement, afin de rechercher un effet rémanent. Cependant, nous n'avons pas étudié si le microbiote s'est restauré ou est toujours altéré, ce d'autant que le retour à l'équilibre après un traitement antibiotique de cinq jours semble se faire en moins de 60 jours, chez l'homme (De La Cochetiere, Durand et al. 2005).

Ces travaux montrent que l'administration d'antibiotique fragilise la barrière épithéliale intestinale. Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Fak, qui avait montré en 2008 que l'administration d'antibiotique à la ratte gestante, augmentait les entérobactéries et la perméabilité intestinale chez les ratons de la portée (Fak, Ahrne et al. 2008). Par ailleurs, le rôle du microbiote sur les fonctions de la barrière intestinale est bien documenté (Barbara, Stanghellini et al. 2005), et le rôle des antibiotiques sur l'altération de la fonction immune également (Schumann, Nutten et al. 2005). Ils montrent également que cette fragilisation perdure 15 jours après l'arrêt du traitement. Cependant, nous ne savons pas si cet effet se prolonge au-delà. L'ensemble de ces éléments pourrait être en faveur d'une moins bonne réponse en cas d'exposition à un stress inflammatoire. La raison de ces observations nous est inconnu, et la susceptibilité de nos animaux traités à développer une inflammation digestive est en cours d'étude. L'utilisation de bactéries ou de prébiotiques pour contrer ces lésions reste également à déterminer.

Dans ce contexte, il reste à déterminer si les animaux traités ont une susceptibilité accrue particulière à développer une inflammation digestive.

Curieusement, nous n'avons pas mis en évidence de modification du phénotype du SNE après traitement antibiotique, alors que nous savons que les fonctions digestives perturbées sont régulées par le SNE. Ceci pourrait être en rapport avec les techniques utilisées. En effet, la variation du phénotype est sans doute minime, et l'expression des mARN sur la totalité du tissu n'est certainement pas assez discriminante. Une étude du

phénotype histochimique, après micro dissection des couches d'intérêt, les whole mount, devra être réalisée pour améliorer ces résultats.

En conclusion, nos travaux ouvrent plusieurs perspectives, à la fois cognitives et thérapeutiques. D'une part, ils ont mis en exergue l'importance de la période péri natale dans le développement du tube digestif et du SNE en particulier, et ils ont montré qu'à ce stade de la vie, le SNE était encore hautement plastique et sensible aux facteurs exogènes. D'autre part, ils s'inscrivent dans le concept directeur de l'action critique des événements néonataux sur le devenir immédiat de l'enfant mais aussi sur son vieillissement. Une meilleure connaissance du rôle des facteurs environnementaux sur le développement du SNE et de leur répercussion à long terme permettra de mieux défendre les enfants nés prématurément contre les complications induites par leur situation. Cette étude pourrait servir de base pour le développement d'approches thérapeutiques dans la prise en charge des troubles digestifs moteurs des enfants prématurés, ou porteurs de pathologies digestives néonatales comme le laparoschisis ou l'atrésie du grêle. De plus, ce modèle pourrait servir à l'étude des répercussions à long terme sur les fonctions digestives d'un stress néonatal et sur le développement ultérieur de maladies inflammatoires.



# ANNEXE

ANNEXE 1 : Facteurs impliqués dans le développement du SNE (d'après Young et al 2012 (Young 2012))

Molecule	Role	References
<b>Molecules expressed by gut mesenchyme or epithelium:</b>		
GDNF	Survival, proliferation, differentiation and migration of ENCCs	(Heanue and Pachnis, 2007; Burzynski et al., 2009)
Neurturin	Survival and differentiation of developing enteric neurons	(Heuckeroth et al., 1998; Heuckeroth et al., 1999; Rossi et al., 1999; Taraviras et al., 1999)
Endothelin-3	Proliferation of undifferentiated ENCCs; inhibits neuronal differentiation; promotes migration; regulates differentiation of various neuron subtypes	(Hearn et al., 1998; Wu et al., 1999; Woodward et al., 2000; Sandgren et al., 2002; Bondurand et al., 2006; Nagy and Goldstein, 2006; Druckenbrod and Epstein, 2009)
Neurotrophin-3	Survival and differentiation of developing enteric neurons	(Chalazonitis, 2004)
Sonic hedgehog	Proliferation of ENCCs, indirectly influence concentric patterning of neurons	(Sukegawa et al., 2000; Fu et al., 2004)
Indian hedgehog	Survival of a sub-population of ENCCs	(Ramalho-Santos et al., 2000)
BMP 2 and 4	Influences ENCC migration and differentiation, ganglion formation, concentric patterning of neurons	(Chalazonitis et al., 2004; Goldstein et al., 2005; Fu et al., 2006; Chalazonitis et al., 2011a)
Netrin	Induce migration of sub-population of ENCCs from myenteric region to submucosal region	(Jiang et al., 2003)
Semaphorin 3A	Negatively regulates the time of entry of extrinsic axons and sacral neural crest cells into the distal hindgut	(Shepherd and Raper, 1999; Anderson et al., 2007)
Laminin1	Promotes neuron differentiation in vitro	(Chalazonitis et al., 1997)
Hlx	Required for migration of ENCCs beyond stomach	(Bates et al., 2006)
<b>Molecules expressed by ENCCs (I) transcription factors</b>		
Sox10	Regulates expression of RET and Phox2b; survival of ENCCs and development of glia	(Herbarth et al., 1998; Southard-Smith et al., 1998; Kapur, 1999)
Foxd3	Maintains progenitors; regulates glial differentiation	(Teng et al., 2008; Mundell et al., 2012)
Phox2b	Survival of ENCCs by regulating RET expression	(Pattyn et al., 1999)
Hand2	Terminal differentiation of sub-populations of enteric neurons	(D'Autreaux et al., 2007; Hendershot et al., 2007; D'Autreaux et al., 2011)
Ascl1 (Mash1)	Survival of regional sub-population of ENCCs (esophageal ENCCs) and in the development of some enteric neuron sub-types	(Blaugrund et al., 1996; Sang et al., 1999)
Pax3	Acts with Sox10 to activate RET expression	(Lang et al., 2000)
AP2 family	In zebrafish, ap2 $\alpha$ acts with foxd3 to regulate Sox10 expression	(Arduini et al., 2009)
ZEB2 (also called ZFHX1B or SIP1)	Specification of vagal neural crest cells	(Van De Putte et al., 2003; Van de Putte et al., 2007)

Hoxb5	Negative regulator of RET expression	(Lui et al., 2008)
Hox11L1 (Tlx2, Ncx, Enx)	Regulates neuronal density by increasing cell death; however, its effects vary in different mice strains. Also expressed by mesenchymal cells	(Shirasawa et al., 1997; Parisi et al., 2003; Kapur et al., 2005; Aoki et al., 2007)
<b>Molecules expressed by ENCCs (ii) cell surface receptors</b>		
RET	Signaling molecule for GDNF and NRTN	(Heanue and Pachnis, 2007; Burzynski et al., 2009)
GFR $\alpha$ 1	GPI-anchored receptor to which GDNF binds	(Enomoto et al., 1998)
GFR $\alpha$ 2	GPI-anchored receptor to which Neurturin binds	(Heuckeroth et al., 1999; Rossi et al., 1999)
Endothelin receptor B	Receptor for endothelin-3	(Hearn et al., 1998; Wu et al., 1999; Woodward et al., 2000; Sandgren et al., 2002; Bondurand et al., 2006; Nagy and Goldstein, 2006; Druckenbrod and Epstein, 2009)
TrkC	Receptor for neurotrophin-3	(Chalazonitis, 2004)
ErbB2	Receptor for neuregulin	(Crone et al., 2003)
ErbB3	Development of enteric glia	(Chalazonitis et al., 2011a)
<b>Molecules expressed by ENCCs (iii) other</b>		
Sprouty-2	Negative regulator of RET	(Taketomi et al., 2005)
KIF26A	Negative regulator of RET	(Zhou et al., 2009)
L1-CAM	Influences ENCC migration and rate of neuronal differentiation; modifier gene for Sox10 and the ET3 – Ednrb signalling pathway	(Anderson et al., 2006c; Turner et al., 2009; Wallace et al., 2010; Wallace et al., 2011)
NCAM	Influences clustering of developing enteric neurons	(Fu et al., 2006; Faure et al., 2007)
$\beta$ 1-integrin	Regulates ENCC migration, ganglion geometry	(Breau et al., 2006; Breau et al., 2009; Nagy et al., 2009)
Notch	Regulates progenitor proliferation and glial development	(Taylor et al., 2007; Okamura and Saga, 2008)
Kif1-binding protein	Promotes neurite formation	(Brooks et al., 2005; Lyons et al., 2008; Alves et al., 2010)
Pten	Inhibits ENCC migration and proliferation	(Puig et al., 2009; Fu et al., 2010)
Small GTPases	Regulates ENCC migration, proliferation and neurite extension	(Stewart et al., 2007; Fuchs et al., 2009)
Norepinephrine transporter (NET)	Development and/or survival of some subtypes of enteric neurons	(Li et al., 2010)
Neuregulin	Survival of post-natal enteric neurons	(Crone et al., 2003)
MicroRNAs	Neuronal differentiation	(Huang et al., 2010; Zehir et al., 2010)
Treacle (Tcof1)	Required for ENCC migration, promotes ENCC proliferation,	(Barlow et al., 2012)
PKA	Mice with reduced PKA activity have GI motility defects, but mechanism is unknown	(Howe et al., 2006)
PKC $\zeta$ /GSK3 $\beta$	Axon specification of neurites	(Vohra et al., 2007)
Phactr4	Negatively regulates integrin signalling and polarisation of lamellapodia for directed ENCC migration	(Zhang et al., 2012b)

HIPK2	Transcription co-factor important for postnatal development of enteric neurons and glia	(Chalazonitis et al., 2011b)
<b>Other factors</b>		
Synaptic activity?	ENCC migration; however, the inhibitors of synaptic activity also block ubiquitous membrane cycling	(Vohra et al., 2006)
Serotonin	Regulates neuronal differentiation	(Fiorica-Howells et al., 2000; Li et al., 2011)
Vitamin A/Retinoic acid	Promotes ENCC migration	(Niederreither et al., 2003; Fu et al., 2010)

# BIBLIOGRAPHIE

- Abrams, G. D. (1977). "Microbial effects on mucosal structure and function." *Am J Clin Nutr* 30(11): 1880-6.
- Abrams, G. D. and J. E. Bishop (1967). "Effect of the normal microbial flora on gastrointestinal motility." *Proc Soc Exp Biol Med* 126(1): 301-4.
- Alam, M., T. Midtvedt, et al. (1994). "Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats." *Scand J Gastroenterol* 29(5): 445-51.
- Amodio, J., W. Berdon, et al. (1986). "Microcolon of prematurity: a form of functional obstruction." *AJR Am J Roentgenol* 146(2): 239-44.
- Anglade, P., C. Michel, et al. (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(5): 568-77.
- Arnoldi, R., E. Leva, et al. (2011). "Delayed meconium passage in very low birth weight infants." *Eur J Pediatr Surg* 21(6): 395-8.
- Arumugam, M., J. Raes, et al. (2011). "Enterotypes of the human gut microbiome." *Nature* 473(7346): 174-80.
- Aube, A. C., J. Cabarrocas, et al. (2006). "Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption." *Gut* 55(5): 630-7.
- Baetge, G. and M. D. Gershon (1989). "Transient catecholaminergic (TC) cells in the vagus nerves and bowel of fetal mice: relationship to the development of enteric neurons." *Dev Biol* 132(1): 189-211.
- Bailey, M. and K. Haverson (2006). "The postnatal development of the mucosal immune system and mucosal tolerance in domestic animals." *Vet Res* 37(3): 443-53.
- Barbara, G., V. Stanghellini, et al. (2005). "Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease." *Am J Gastroenterol* 100(11): 2560-8.
- Barlow, A. J., A. S. Wallace, et al. (2008). "Critical numbers of neural crest cells are required in the pathways from the neural tube to the foregut to ensure complete enteric nervous system formation." *Development* 135(9): 1681-91.
- Barrat, E., C. Michel, et al. (2008). "Supplementation with galactooligosaccharides and inulin increases bacterial translocation in artificially reared newborn rats." *Pediatr Res* 64(1): 34-9.
- Bayliss, W. M. and E. H. Starling (1900). "The movements and the innervation of the large intestine." *J Physiol* 26(1-2): 107-18.
- Baynash, A. G., K. Hosoda, et al. (1994). "Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons." *Cell* 79(7): 1277-85.
- Bekkali, N., S. L. Hamers, et al. (2008). "Duration of meconium passage in preterm and term infants." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 93(5): F376-9.
- Berseth, C. (1996). "Gastrointestinal motility in the neonate." *Clin perinatol* 23: 179-90.

- Berseth, C. L. (2006). "Motor function in the stomach and small intestine in the neonate." *NeoReviews* 7: 28-33.
- Bian, X., J. E. Burda, et al. (2009). "Postnatal downregulation of inhibitory neuromuscular transmission to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum." *Neurogastroenterol Motil* 21(9): 969-77.
- Bingham, P. M. (2009). "Deprivation and dysphagia in premature infants." *J Child Neurol* 24(6): 743-9.
- Blais, A., P. Aymard, et al. (1997). "Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers." *Pflugers Arch* 434(3): 300-5.
- Blaugrund, E., T. D. Pham, et al. (1996). "Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence." *Development* 122(1): 309-20.
- Bohmig, G. A., P. M. Krieger, et al. (1997). "n-butyrate downregulates the stimulatory function of peripheral blood-derived antigen-presenting cells: a potential mechanism for modulating T-cell responses by short-chain fatty acids." *Immunology* 92(2): 234-43.
- Bordin, M., F. D'Atri, et al. (2004). "Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins." *Mol Cancer Res* 2(12): 692-701.
- Bornstein, J. C., M. Costa, et al. (2004). "Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility." *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1: 34-8.
- Bourriaud, C., R. J. Robins, et al. (2005). "Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident." *J Appl Microbiol* 99(1): 201-12.
- Bowling, T. E., A. H. Raimundo, et al. (1993). "Reversal by short-chain fatty acids of colonic fluid secretion induced by enteral feeding." *Lancet* 342(8882): 1266-8.
- Brookes, N. (1997). "Intracellular pH as a regulatory signal in astrocyte metabolism." *Glia* 21(1): 64-73.
- Buddington, R. K. (1994). "Nutrition and ontogenetic development of the intestine." *Can J Physiol Pharmacol* 72(3): 251-9.
- Bullen, T. F., S. Forrest, et al. (2006). "Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine." *Lab Invest* 86(10): 1052-63.
- Burns, A. J. and N. M. Douarin (1998). "The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system." *Development* 125(21): 4335-47.
- Burns, A. J. and N. M. Le Douarin (2001). "Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras." *Anat Rec* 262(1): 16-28.
- Burns, A. J., P. J. Pasricha, et al. (2004). "Enteric neural crest-derived cells and neural stem cells: biology and therapeutic potential." *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1: 3-7.

- Champ, M. M., C. Molis, et al. (1998). "Small-intestinal digestion of partially resistant cornstarch in healthy subjects." *Am J Clin Nutr* 68(3): 705-10.
- Claud, E. C. and W. A. Walker (2008). "Bacterial colonization, probiotics, and necrotizing enterocolitis." *J Clin Gastroenterol* 42 Suppl 2: S46-52.
- Conlin, A., T. Kaltenbach, et al. (2010). "Endoscopic resection of gastrointestinal lesions: advancement in the application of endoscopic submucosal dissection." *J Gastroenterol Hepatol* 25(8): 1348-57.
- Corpeleijn, W. E., R. M. van Elburg, et al. (2011). "Assessment of intestinal permeability in (premature) neonates by sugar absorption tests." *Methods Mol Biol* 763: 95-104.
- Costa, M., S. J. Brookes, et al. (1996). "Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum." *Neuroscience* 75(3): 949-67.
- Crowe, S. E., K. Soda, et al. (1993). "Intestinal permeability in allergic rats: nerve involvement in antigen-induced changes." *Am J Physiol* 264(4 Pt 1): G617-23.
- Cuche, G., J. C. Cuber, et al. (2000). "Ileal short-chain fatty acids inhibit gastric motility by a humoral pathway." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(5): G925-30.
- Cuche, G. and C. H. Malbert (1999). "Short-chain fatty acids present in the ileum inhibit fasting gastrointestinal motility in conscious pigs." *Neurogastroenterol Motil* 11(3): 219-25.
- Cummings, J. H., E. W. Pomare, et al. (1987). "Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood." *Gut* 28(10): 1221-7.
- De La Cochetiere, M. F., T. Durand, et al. (2005). "Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge." *J Clin Microbiol* 43(11): 5588-92.
- De Quelen, F., J. Chevalier, et al. (2010). "n-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets." *J Physiol* 589(Pt 17): 4341-52.
- de Vries, P., R. Soret, et al. (2010). "Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(2): G539-47.
- de Weerth, C., S. (2013). Fuentes, et al. "Intestinal microbiota of infants with colic: development and specific signatures." *Pediatrics* 131(2): e550-8.
- Demaude, J., M. Leveque, et al. (2009). "Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: involvement of pancreatic trypsin." *Life Sci* 84(23-24): 847-52.
- 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.
- Druckenbrod, N. R. and M. L. Epstein (2005). "The pattern of neural crest advance in the cecum and colon." *Dev Biol* 287(1): 125-33.
- Druckenbrod, N. R. and M. L. Epstein (2009). "Age-dependent changes in the gut environment restrict the invasion of the hindgut by enteric neural progenitors." *Development* 136(18): 3195-203.



- Enomoto, H. (2009). "Death comes early: apoptosis observed in ENS precursors." *Neurogastroenterol Motil* 21(7): 684-7.
- Fak, F., S. Ahrne, et al. (2008). "Microbial manipulation of the rat dam changes bacterial colonization and alters properties of the gut in her offspring." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(1): G148-54.
- Fallani, M., D. Young, et al. (2010). "Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51(1): 77-84.
- Furness, J. B. (2000). "Types of neurons in the enteric nervous system." *J Auton Nerv Syst* 81(1-3): 87-96.
- Furness, J. B. (2012). "The enteric nervous system and neurogastroenterology." *Nat. rev. gastroenterol. hepatol* 9: 286-294.
- Furness, J. B., G. Alex, et al. (2003). "Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 272(2): 475-83.
- Furness, J. B., J. C. Bornstein, et al. (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(3): 561-71.
- Furness, J. B., N. Clerc, et al. (2000). "Memory in the enteric nervous system." *Gut* 47 Suppl 4: iv60-2; discussion iv76.
- Furness, J. B., W. A. Kunze, et al. (1998). "Intrinsic primary afferent neurons of the intestine." *Prog Neurobiol* 54(1): 1-18.
- Furness, J. B., H. L. Robbins, et al. (2004). "Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon." *Cell Tissue Res* 317(1): 1-12.
- Gareau, M. G., J. Jury, et al. (2007). "Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation." *Gut* 56(11): 1522-8.
- Gershon, M. D., M. L. Epstein, et al. (1980). "Colonization of the chick gut by progenitors of enteric serotonergic neurons: distribution, differentiation, and maturation within the gut." *Dev Biol* 77(1): 41-51.
- Goulet, O., V. Colomb-Jung, et al. (2009). "Role of the colon in short bowel syndrome and intestinal transplantation." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 48 Suppl 2: S66-71.
- Goulet, O. and F. Joly (2010). "[Intestinal microbiota in short bowel syndrome]." *Gastroenterol Clin Biol* 34 Suppl 1: S37-43.
- Goyal, R. K. and I. Hirano (1996). "The enteric nervous system." *N Engl J Med* 334(17): 1106-15.
- Grange G, Ed. (2012). *Guide pratique de l'échographie obstétricale et gynécologique*, Masson Ed.

- Guaraldi, F. and G. Salvatori (2012). "Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns." *Front Cell Infect Microbiol* 2: 94.
- Hallgren, A., G. Flemstrom, et al. (1998). "Interaction between neurokinin A, VIP, prostanooids, and enteric nerves in regulation of duodenal function." *Am J Physiol* 275(1 Pt 1): G95-103.
- Hansen, M. B. (2003). "Neurohumoral control of gastrointestinal motility." *Physiol Res* 52(1): 1-30.
- Hao, M. M., J. C. Bornstein, et al. (2012). "The emergence of neural activity and its role in the development of the enteric nervous system." *Dev Biol*.
- Hao, M. M. and H. M. Young (2009). "Development of enteric neuron diversity." *J Cell Mol Med* 13(7): 1193-210.
- Hayden, U. L. and H. V. Carey (2000). "Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278(6): R1589-94.
- Heanue, T. A. and V. Pachnis (2007). "Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies." *Nat Rev Neurosci* 8(6): 466-79.
- Heerdt, B. G., M. A. Houston, et al. (2003). "The intrinsic mitochondrial membrane potential (Deltapsim) is associated with steady-state mitochondrial activity and the extent to which colonic epithelial cells undergo butyrate-mediated growth arrest and apoptosis." *Cancer Res* 63(19): 6311-9.
- Heredia, D. J., E. J. Dickson, et al. (2009). "Localized release of serotonin (5-hydroxytryptamine) by a fecal pellet regulates migrating motor complexes in murine colon." *Gastroenterology* 136(4): 1328-38.
- Hirst, G. D., M. E. Holman, et al. (1974). "Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig." *J Physiol* 236(2): 303-26.
- Hofstra, R. M., R. M. Landsvater, et al. (1994). "A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma." *Nature* 367(6461): 375-6.
- Holzer, P., W. Schluet, et al. (1993). "Ascending enteric reflex contraction: roles of acetylcholine and tachykinins in relation to distension and propagation of excitation." *J Pharmacol Exp Ther* 264(1): 391-6.
- Hooper, L. V., M. H. Wong, et al. (2001). "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine." *Science* 291(5505): 881-4.
- Hosoda, K., R. E. Hammer, et al. (1994). "Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice." *Cell* 79(7): 1267-76.
- Inan, M. S., R. J. Rasoulpour, et al. (2000). "The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line." *Gastroenterology* 118(4): 724-34.

- Ittmann, P. I., R. Amarnath, et al. (1992). "Maturation of antroduodenal motor activity in preterm and term infants." *Dig Dis Sci* 37(1): 14-9.
- Iwai, H., Y. Ishihara, et al. (1973). "Effects of bacterial flora on cecal size and transit rate of intestinal contents in mice." *Jpn J Exp Med* 43(4): 297-305.
- Jiang, Y., M. T. Liu, et al. (2003). "Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas." *Dev Biol* 258(2): 364-84.
- Jost, T., C. Lacroix, et al. (2012). "New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates." *PLoS One* 7(8): e44595.
- Kamath, P. S., M. T. Hoepfner, et al. (1987). "Short-chain fatty acids stimulate motility of the canine ileum." *Am J Physiol* 253(4 Pt 1): G427-33.
- Kamath, P. S., S. F. Phillips, et al. (1988). "Short-chain fatty acids stimulate ileal motility in humans." *Gastroenterology* 95(6): 1496-502.
- Kapur, R. P. (2000). "Developmental disorders of the enteric nervous system." *Gut* 47 Suppl 4: iv81-3; discussion iv87.
- Kelsh, R. N. (2006). "Sorting out Sox10 functions in neural crest development." *Bioessays* 28(8): 788-98.
- Khen, N., F. Jaubert, et al. (2004). "Fetal intestinal obstruction induces alteration of enteric nervous system development in human intestinal atresia." *Pediatr Res* 56(6): 975-80.
- Kononen, E. (2000). "Development of oral bacterial flora in young children." *Ann Med* 32(2): 107-12.
- Kruger, G. M., J. T. Mosher, et al. (2002). "Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness." *Neuron* 35(4): 657-69.
- Kunze, W. A., N. Clerc, et al. (1999). "Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons." *J Physiol* 517 ( Pt 2): 547-61.
- Kunze, W. A. and J. B. Furness (1999). "The enteric nervous system and regulation of intestinal motility." *Annu Rev Physiol* 61: 117-42.
- Kunzelmann, K. and M. Mall (2002). "Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease." *Physiol Rev* 82(1): 245-89.
- Kuppala, V. S., J. Meinzen-Derr, et al. (2011). "Prolonged initial empirical antibiotic treatment is associated with adverse outcomes in premature infants." *J Pediatr* 159(5): 720-5.
- Langley, J. N. and R. Magnus (1905). "Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves." *J Physiol* 33(1): 34-51.
- Le Douarin, N. M. and M. A. Teillet (1973). "The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo." *J Embryol Exp Morphol* 30(1): 31-48.
- Lin, P. W., T. R. Nasr, et al. (2008). "Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention." *Semin Perinatol* 32(2): 70-82.

- Lippi, A., P. Santicioli, et al. (1998). "Depolarization evoked co-release of tachykinins from enteric nerves in the guinea-pig proximal colon." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357(3): 245-51.
- Lomax, A. E. and J. B. Furness (2000). "Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon." *Cell Tissue Res* 302(1): 59-72.
- Louis, P., K. P. Scott, et al. (2007). "Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine." *J Appl Microbiol* 102(5): 1197-208.
- Mariadason, J. M., D. H. Barkla, et al. (1997). "Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model." *Am J Physiol* 272(4 Pt 1): G705-12.
- Mariadason, J. M., D. Kiliass, et al. (1999). "Effect of butyrate on paracellular permeability in rat distal colonic mucosa ex vivo." *J Gastroenterol Hepatol* 14(9): 873-9.
- Matthews, J. B., I. Hassan, et al. (1998). "Na-K-2Cl cotransporter gene expression and function during enterocyte differentiation. Modulation of Cl<sup>-</sup> secretory capacity by butyrate." *J Clin Invest* 101(10): 2072-9.
- Mawe, G. M. and M. D. Gershon (1989). "Structure, afferent innervation, and transmitter content of ganglia of the guinea pig gallbladder: relationship to the enteric nervous system." *J Comp Neurol* 283(3): 374-90.
- McConalogue, K. and J. B. Furness (1994). "Gastrointestinal neurotransmitters." *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 8(1): 51-76.
- McKeown, S. J., C. W. Chow, et al. (2001). "Development of the submucous plexus in the large intestine of the mouse." *Cell Tissue Res* 303(2): 301-5.
- McManus, C. M., K. E. Michel, et al. (2002). "Effect of short-chain fatty acids on contraction of smooth muscle in the canine colon." *Am J Vet Res* 63(2): 295-300.
- Million, M., J. C. Lagier, et al. (2013). "Gut bacterial microbiota and obesity." *Clin Microbiol Infect* 19(4): 305-13.
- Million, M. and D. Raoult (2012). "The role of the manipulation of the gut microbiota in obesity." *Curr Infect Dis Rep* 15(1): 25-30.
- Mitsuoka, T., K. Hayakawa, et al. (1974). "[The faecal flora of man. II. The composition of bifidobacterium flora of different age groups (author's transl)]." *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 226(4): 469-78.
- Moore, T. A. and M. E. Wilson (2011). "Feeding intolerance: a concept analysis." *Adv Neonatal Care* 11(3): 149-54.
- Morel, F. B., A. Oosting, et al. (2013). "Can antibiotic treatment in preweaning rats alter body composition in adulthood?" *Neonatology* 103(3): 182-9.
- Musquer, N., S. Coquenlorge, et al. (2013). "Probe-based confocal laser endomicroscopy: A new method for quantitative analysis of pit structure in healthy and Crohn's disease patients." *Dig Liver Dis*.

- Nagler-Anderson, C. (2001). "Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa." *Nat Rev Immunol* 1(1): 59-67.
- Natarajan, D., C. Marcos-Gutierrez, et al. (2002). "Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis." *Development* 129(22): 5151-60.
- Neu, J. (2007). "Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants." *Am J Clin Nutr* 85(2): 629S-634S.
- Neu, J. (2007). "Perinatal and neonatal manipulation of the intestinal microbiome: a note of caution." *Nutr Rev* 65(6 Pt 1): 282-5.
- Neunlist, M., J. Barouk, et al. (2003). "Toxin B of *Clostridium difficile* activates human VIP submucosal neurons, in part via an IL-1beta-dependent pathway." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(5): G1049-55.
- Neunlist, M., L. Van Landeghem, et al. (2012). "The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10(2): 90-100.
- Newgreen, D. and H. M. Young (2002). "Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1." *Pediatr Dev Pathol* 5(3): 224-47.
- Nishi, S. and R. A. North (1973). "Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum." *J Physiol* 231(3): 471-91.
- O'Hara, A. M. and F. Shanahan (2006). "The gut flora as a forgotten organ." *EMBO Rep* 7(7): 688-93.
- Peng, L., Z. He, et al. (2007). "Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier." *Pediatr Res* 61(1): 37-41.
- Peng, L., Z. R. Li, et al. (2009). "Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers." *J Nutr* 139(9): 1619-25.
- Pham, T. D., M. D. Gershon, et al. (1991). "Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: sequence in relation to phenotype." *J Comp Neurol* 314(4): 789-98.
- Piche, T., G. Barbara, et al. (2009). "Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators." *Gut* 58(2): 196-201.
- Pompolo, S. and J. B. Furness (1988). "Ultrastructure and synaptic relationships of calbindin-reactive, Dogiel type II neurons, in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine." *J Neurocytol* 17(6): 771-82.
- Quigley, E. M. (2011). "Microflora modulation of motility." *J Neurogastroenterol Motil* 17(2): 140-7.
- Ramirez, A., W. W. Wong, et al. (2006). "Factors regulating gastric emptying in preterm infants." *J Pediatr* 149(4): 475-9.

- Resta-Lenert, S., F. Truong, et al. (2001). "Inhibition of epithelial chloride secretion by butyrate: role of reduced adenylyl cyclase expression and activity." *Am J Physiol Cell Physiol* 281(6): C1837-49.
- Roberts, R. R., J. C. Bornstein, et al. (2008). "Disturbances of colonic motility in mouse models of Hirschsprung's disease." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(4): G996-G1008.
- Roberts, R. R., M. Ellis, et al. (2010). "The first intestinal motility patterns in fetal mice are not mediated by neurons or interstitial cells of Cajal." *J Physiol* 588(Pt 7): 1153-69.
- Roberts, R. R., J. F. Murphy, et al. (2007). "Development of colonic motility in the neonatal mouse-studies using spatiotemporal maps." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(3): G930-8.
- Robertson, C. M., M. J. Watt, et al. (2009). "Outcomes for the extremely premature infant: what is new? And where are we going?" *Pediatr Neurol* 40(3): 189-96.
- Romeo, G., P. Ronchetto, et al. (1994). "Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease." *Nature* 367(6461): 377-8.
- Ropert, A., C. Cherbut, et al. (1996). "Colonic fermentation and proximal gastric tone in humans." *Gastroenterology* 111(2): 289-96.
- Ruhl, A., Y. Nasser, et al. (2004). "Enteric glia." *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1: 44-9.
- Santos, M. M., U. Tannuri, et al. (2003). "Alterations of enteric nerve plexus in experimental gastroschisis: is there a delay in the maturation?" *J Pediatr Surg* 38(10): 1506-11.
- Sasselli, V., V. Pachnis, et al. (2012). "The enteric nervous system." *Dev Biol* 366(1): 64-73.
- Schafer, K. H., A. Hansgen, et al. (1999). "Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat." *Anat Rec* 256(1): 20-8.
- Schemann, M. and M. Neunlist (2004). "The human enteric nervous system." *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1: 55-9.
- Schuchardt, A., V. D'Agati, et al. (1994). "Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret." *Nature* 367(6461): 380-3.
- Schumann, A., S. Nutten, et al. (2005). "Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome." *Physiol Genomics* 23(2): 235-45.
- Segain, J. P., D. Raingeard de la Bletiere, et al. (2000). "Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease." *Gut* 47(3): 397-403.
- Shah, P., E. Nathan, et al. (2013). "Prolonged exposure to antibiotics and its associations in extremely preterm neonates - the Western Australian experience." *J Matern Fetal Neonatal Med*.
- Shanahan, F. (2002). "The host-microbe interface within the gut." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16(6): 915-31.

- Shinohara, T., M. Tsuda, et al. (2007). "Management of meconium-related ileus in very low-birthweight infants." *Pediatr Int* 49(5): 641-4.
- Simpson, M. J., D. C. Zhang, et al. (2007). "Cell proliferation drives neural crest cell invasion of the intestine." *Dev Biol* 302(2): 553-68.
- Sokol, H. and P. Seksik (2010). "The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host." *Curr Opin Gastroenterol* 26(4): 327-31.
- Soret, R., J. Chevalier, et al. (2010). "Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats." *Gastroenterology* 5(138): 1772-82.
- Squires, P. E., R. D. Rumsey, et al. (1992). "Effect of short-chain fatty acids on contractile activity and fluid flow in rat colon in vitro." *Am J Physiol* 262(5 Pt 1): G813-7.
- Stach, W. (1982). "[Neuronal organization of the plexus myentericus (Auerbach) in the small intestine of the pig. IV. Type IV-Neurons]." *Z Mikrosk Anat Forsch* 96(6): 972-94.
- Stappenbeck, T. S., L. V. Hooper, et al. (2002). "Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15451-5.
- Suply, E., P. de Vries, et al. (2012). "Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitregeric phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302(12): G1373-80.
- Ten Bruggencate, S. J., I. M. Bovee-Oudenhoven, et al. (2006). "Dietary fructooligosaccharides affect intestinal barrier function in healthy men." *J Nutr* 136(1): 70-4.
- Ten Bruggencate, S. J., I. M. Bovee-Oudenhoven, et al. (2005). "Dietary fructooligosaccharides increase intestinal permeability in rats." *J Nutr* 135(4): 837-42.
- Timmermans, J. P., D. Adriaensen, et al. (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(2): 331-40.
- Torihashi, S., S. M. Ward, et al. (1995). "c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract." *Cell Tissue Res* 280(1): 97-111.
- Tuchmann-Duplessis H, H. P. "Embryologie. Enseignement dirigé." *Organogénèse*(Fasc. 2).
- Tzialla, C., A. Borghesi, et al. (2012). "Use and misuse of antibiotics in the neonatal intensive care unit." *J Matern Fetal Neonatal Med* 25 Suppl 4: 35-7.
- Uesaka, T. and H. Enomoto (2012). "GDNF is a key regulator for the formation of the submucosal plexus. In: The 3rd international symposium on development of the Enteric Nervous System. Hong Kong."
- Vannucchi, M. G. and M. S. Fausone-Pellegrini (1996). "Differentiation of cholinergic cells in the rat gut during pre- and postnatal life." *Neurosci Lett* 206(2-3): 105-8.
- Vantrappen, G., J. Janssens, et al. (1977). "The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine." *J Clin Invest* 59(6): 1158-66.

- Verdu, E. F. and S. M. Collins (2004). "Microbial-gut interactions in health and disease. Irritable bowel syndrome." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18(2): 315-21.
- Vidyasagar, S. and B. S. Ramakrishna (2002). "Effects of butyrate on active sodium and chloride transport in rat and rabbit distal colon." *J Physiol* 539(Pt 1): 163-73.
- Virta, L., A. Auvinen, et al. (2012). "Association of repeated exposure to antibiotics with the development of pediatric Crohn's disease--a nationwide, register-based finnish case-control study." *Am J Epidemiol* 175(8): 775-84.
- Wallace, A. S., A. J. Barlow, et al. (2009). "Inhibition of cell death results in hyperganglionosis: implications for enteric nervous system development." *Neurogastroenterol Motil* 21(7): 768-e49.
- Wallace, A. S. and A. J. Burns (2005). "Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract." *Cell Tissue Res* 319(3): 367-82.
- Wallace, A. S., C. Schmidt, et al. (2010). "L1cam acts as a modifier gene during enteric nervous system development." *Neurobiol Dis* 40(3): 622-33.
- Wang, X., A. K. Chan, et al. (2011). "Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo." *Gastroenterology* 141(3): 992-1002 e1-6.
- Ward, S. M., K. M. Sanders, et al. (2004). "Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles." *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1: 112-7.
- Wedel, T., U. Roblick, et al. (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(4): 327-37.
- Wen, S. W., G. Smith, et al. (2004). "Epidemiology of preterm birth and neonatal outcome." *Semin Fetal Neonatal Med* 9(6): 429-35.
- Wilson, A. J., A. C. Chueh, et al. (2010). "Apoptotic sensitivity of colon cancer cells to histone deacetylase inhibitors is mediated by an Sp1/Sp3-activated transcriptional program involving immediate-early gene induction." *Cancer Res* 70(2): 609-20.
- Wood, J. D. and C. J. Mayer (1978). "Slow synaptic excitation mediated by serotonin in Auerbach's plexus." *Nature* 276(5690): 836-7.
- Wostmann, B. and E. Bruckner-Kardoss (1959). "Development of cecal distention in germ-free baby rats." *Am J Physiol* 197: 1345-6.
- Yin, L., G. Laevsky, et al. (2001). "Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity." *J Biol Chem* 276(48): 44641-6.
- Yntema, C. L. and W. S. Hammond (1954). "The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo." *J Comp Neurol* 101(2): 515-41.
- Young B, L. J., Stevens A, Heath JW (2006). *Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather, de boeck.*



Young, H. M. (2012). "The spatial order and behaviour of neural crest-derived cells as they colonize the mouse gut. In: The 3rd international symposium on the development of the Enteric Nervous System. Hong Kong."

Young, H. M., A. J. Bergner, et al. (2004). "Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut." *Dev Biol* 270(2): 455-73.

Young, H. M., D. Ciampoli, et al. (1999). "Expression of Ret-, p75(NTR)-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut." *Dev Dyn* 216(2): 137-52.

Young, H. M. and D. Newgreen (2001). "Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration, and differentiation." *Anat Rec* 262(1): 1-15.

Young, H. M., K. N. Turner, et al. (2005). "The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut." *Cell Tissue Res* 320(1): 1-9.

**Titre : Développement post natal et ciblage nutritionnel du système nerveux entérique : étude chez le raton nouveau-né**

**Résumé :**

Les enfants prématurés présentent une immaturité des fonctions vitales. Les troubles fonctionnels du tube digestif (TD) retardent l'autonomie de l'enfant : directement, lors d'entérocolite, ou indirectement par l'alimentation parentérale à risque de cirrhose ou d'infections nosocomiales. La motricité intestinale est sous contrôle du système nerveux entérique (SNE). A la naissance, l'organisme est soumis aux facteurs environnementaux et le TD est soumis à l'influence des nutriments et de leurs dérivés, tel le butyrate. La flore intestinale commensale présente aussi des liens intimes avec le TD.

Nous avons étudié la maturation du SNE chez des ratons nouveaux nés, et son impact sur la fonction motrice colique. *Ex vivo*, des contractions apparaissaient dès J5, s'organisaient à partir de J14, et s'accéléraient jusqu'à J36. Parallèlement, les contractions musculaires induites par EFS étaient inhibées par l'atropine à partir de J14, et le phénotype cholinergique des neurones entériques se développait.

L'administration intra-rectale quotidienne, de 2,5 mM de butyrate, chez les ratons de J7 à J17, augmentait la proportion des cellules cholinergiques et nitreurgiques. *In vivo*, le temps de transit était accéléré ; *ex vivo*, la réponse motrice aux EFS étaient perturbée en présence d'atropine et de L-Name. L'administration périnatale orale de Metronidazole, jusqu'à J21, chez les ratons, modifiait la sensibilité à l'inflammation.

La maturation fonctionnelle du colon et structurelle du SNE évolue après la naissance. L'alimentation et les antibiotiques influent sur leur développement. Ceci ouvre des perspectives pour la prévention et la prise en charge des troubles intestinaux des prématurés.

**Mots clés :**

Système nerveux entérique ; Motricité intestinale ; Développement ; Prématurité ; Nutrition ; Antibiotique

**Development and postnatal nutritional targeting of the enteric nervous system : study in the newborn rat**

Digestive dysfunctions are often observed in premature child, such as slowing of intestinal transit to ulceronecrotizing enterocolitis. These symptoms could be a source of morbidity. The enteric nervous system (ENS) is known to be a major regulator of digestives functions. At birth, the child is submitted to environmental factors, and the GI tract is submitted to the influence of nutrients and their derivatives, such as butyrate. The commensal intestinal flora also has close ties with the GI tract.

We first studied the maturation of rat pups ENS, and its impact upon the colonic motor functions. Few spontaneous contractions of the colon appeared at P5. Starting P14 rhythmic phasic contractions appeared whose frequency increased over time until P36. In addition, EFS induced contractions were significantly reduced by atropine from P14, while the proportion of ChAT-immuno reactive neurons increased significantly over time.

Daily intrarectal administration of 2.5 mM butyrate, to the pups from P7 to P17, increased the proportion of nitreurgic and cholinergic cells and increase colonic motility *in vivo*. *Ex vivo* the motor response to EFS were disrupted in the presence of atropine and L-Name.

Perinatal administration of oral Metronidazole to pups until P21, altered sensitivity to inflammation.

Functional maturation of the colon and structural changes of the SNE occurred after birth. Food and antibiotics can influence their development. This opens perspectives for the prevention and treatment of intestinal disorders in premature infants.

Enteric nervous system ; gastrointestinal motility ; development ; preterm birth ; nutrition, antibiotics