

ANNÉE 2021

N°

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Camille GAUTIER

Présentée et soutenue publiquement le 17 juin 2021

**Augmentation de la motilité intestinale en conditions de stress :
implication des récepteurs GR exprimés par les neurones du
système nerveux entérique**

Président : Mr Jean-Marie BARD, PU-PH de Biochimie et Biologie moléculaire

Directrice de thèse : Mme Kalyane BACH-NGOHOU, MCU-PH de Biochimie

Co-directeur de thèse : Mr Damien MASSON, PU-PH de Biochimie spécialisée

Membres du jury : Mr Michel NEUNLIST, Directeur de recherche de l'unité Inserm
U1235 (TENS)

Mr Denis DAVID, Professeur de Pharmacologie à l'Université
Paris-Saclay, CESP-Inserm, équipe MOODS

Remerciements

À Madame Kalyane Bach-Ngohou,

Je tiens à te remercier d'avoir accepté d'encadrer mon travail, mais aussi de m'avoir accordé ta confiance pour mener à bien ce projet. Merci pour tes précieux conseils, ta disponibilité, tes encouragements, et pour le temps que tu y as consacré. Promis, j'essaierai la méthode « relax » à l'avenir !

À Monsieur Damien Masson,

Je te remercie pour ton encadrement, pour tes conseils avisés, ta bonne humeur, mais aussi ta capacité à me faire relativiser dans chaque situation.

À Monsieur Jean-Marie Bard,

De m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma thèse. Merci pour vos enseignements au cours de mes années d'études.

À Monsieur Michel Neunlist,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre unité de recherche, et de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ce travail. Merci pour vos conseils, vos connaissances ainsi que la rigueur scientifique que vous m'avez transmis.

À Monsieur Denis David,

Je vous remercie pour votre participation à ce jury. Mais également, merci pour vos enseignements au cours de mon année de M2, qui auront su aiguïser ce travail, et pour vos conseils d'orientation.

À toi, Justine,

Merci pour m'avoir accompagnée dans mes débuts, et pour m'avoir transmis ton savoir (même si je me serais bien passé de l'analyse de la motilité !). Ce travail n'aurait pas été possible sans toi. J'espère avoir pu l'honorer à travers cette thèse. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi.

À toutes les personnes de l'unité Inserm U1235 qui ont contribué de près ou de loin à ce travail,

Merci à toi Philippe de m'avoir aidé pour toutes les manip d'exploration fonctionnelle et pour avoir contribué à la bonne réalisation de ce projet. Merci également à toi Thibault pour avoir eu la patience de me former au difficile art de la microdissection, ce qui m'a permis de connaître la joie des longues heures passées derrière la loupe binoculaire.

D'une façon générale, je remercie l'ensemble des membres de l'unité Inserm U1235 pour votre accueil, votre disponibilité, votre bienveillance et pour cette ambiance incroyable qui règne au sein du laboratoire.

À toutes les équipes officinales avec qui j'ai travaillé,

Pharmacie Commeil Beliard, Pharmacie des Trois Rivières, Pharmacie Cambronne. Merci pour votre confiance, et pour tout ce que vous m'avez appris.

À Baltha et Mathou,

Sans qui le premier (et le deuxième !) confinement n'aurait pas été pareil. Je vous souhaite une bonne route. Pour sûr, on se retrouvera sur notre cata !

À mes amis Nancéiens, (plus Aveyronnais que Nancéiens d'ailleurs),

Pour tous nos bons moments passés ensemble. Pour toutes ces autres « Belles îles » qu'il nous reste à découvrir ensemble.

À Laurine,

Pour tous nos périple majorquins !

À mes amis de la faculté,

À Marie, ma binôme pharma indus'/recherche,

À mes amis Nantais,

Particulièrement à vous, Marie, Jérôme et Coco. Merci pour tous ces moments de fou rire et ces longues soirées (qui, il faut l'avouer se terminent souvent par un « bobo tête »).

À Didier et Sylvie,

Bien au-delà de ces années d'études, je vous remercie pour tous vos encouragements, votre soutien et vos conseils. À tous les bons moments que l'on a pu apprécier en France ou ailleurs. Et aussi parce que maintenant, grâce à vous, je n'aurais plus jamais la même vision de ce qu'est un parking !

À ma sœur,

Merci pour ton soutien et tes encouragements. Merci de m'avoir fait l'honneur de devenir tata de cette petite merveille. Malgré les années qui passent et la distance qui nous éloigne, tu resteras toujours ma grande sœur « préférée » !

À mes parents,

Pour votre amour, pour votre soutien sans faille. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez pu faire pour moi pendant toutes ces années d'études. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Merci pour tout.

À Pierre-Antoine,

Merci pour ces belles années passée à tes côtés, pour ces moments incroyables que je partage avec toi depuis le 1^{er} jour. Merci de m'avoir toujours soutenu, d'avoir toujours cru en moi et de toujours et encore me supporter (et ce malgré mon caractère !). On aura finit par y arriver. À toutes ces années qui nous attendent, à tous nos beaux projets.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	5
Liste des figures	8
Liste des abréviations.....	9
Introduction	12
 PARTIE I : Le stress : de la physiologie à la pathologie.....	14
1. Le stress : généralités	15
1.1. Historique du concept du stress	15
1.2. Conception actuelle du stress	16
2. Physiologie et physiopathologie du stress et relation avec l'axe corticotrope	17
2.1. Neurobiologie du stress	17
2.2. Initiation de la réponse physiologique au stress.....	17
2.3. L'axe corticotrope	19
2.3.1. L'hypothalamus.....	19
2.3.2. L'hypophyse	20
2.3.3. Les glandes corticosurrénales	20
2.4. Synthèse des effets physiologiques du stress.....	21
3. Stress et système nerveux central.....	22
3.1. Stress physiologique : action sur les fonctions cognitives et émotionnelles	22
3.2. Stress pathologique et conséquences neurobiologiques.....	22
4. Stress et troubles digestifs	25
4.1. Généralités sur le système nerveux entérique	25
4.2. Innervation intrinsèque du système nerveux entérique.....	26
4.2.1. Organisation du SNE.....	26
4.2.2. Structure du SNE.....	27
4.2.3. Neurones fonctionnels du SNE	28
4.3. Innervation extrinsèque du SNE : communications entre le SNE et le SNC.....	30
4.3.1. Fibres afférentes	30
4.3.2. Fibres efférentes	30
4.3.3. Synthèse du concept axe intestin-cerveau.....	32
4.4. Rôles des neurones entériques.....	33
4.4.1. Contrôle de la motricité intestinale.....	33
4.4.2. Contrôle des sécrétions intestinales	34

4.4.3.	Contrôle de l'absorption intestinale.....	35
4.4.4.	Contrôle du flux sanguin	35
4.4.5.	Contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale	35
4.5.	Implication du SNE dans la motilité gastro-intestinale et la survenue de troubles digestifs.....	36
4.5.1.	Rôle de la CRH dans l'accélération du transit colique.....	36
PARTIE II : Les Glucocorticoïdes.....		39
1.	Biosynthèse et circulation.....	40
2.	Les récepteurs aux glucocorticoïdes	41
2.1.	Le récepteur GR aux glucocorticoïdes.....	42
2.2.	Le récepteur MR aux minéralocorticoïdes.....	44
3.	Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.....	45
3.1.	Mécanisme d'action non-génomique	45
3.2.	Mécanisme d'action génomique	45
4.	Propriétés pharmacologiques des glucocorticoïdes	47
4.1.	Actions métaboliques	47
4.1.1.	Métabolisme glucidique	47
4.1.2.	Métabolisme protidique	48
4.1.3.	Métabolisme lipidique	48
4.1.4.	Métabolisme hydro-électrolytique.....	49
4.1.5.	Métabolisme phospho-calcique	49
4.2.	Activité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes	49
4.3.	Activité anti-immuno-allergique des glucocorticoïdes.....	50
5.	Régulation des glucocorticoïdes : rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope	50
6.	Implication du récepteur GR dans les troubles digestifs.....	51
7.	Les antagonistes du récepteur GR aux glucocorticoïdes	52
7.1.	Antagonistes non sélectifs du récepteur GR aux glucocorticoïdes	52
7.1.1.	Mifépristone ou RU486	52
7.2.	Antagonistes sélectifs du récepteur GR aux glucocorticoïdes.....	53
7.2.1.	CORT108297	54
7.2.2.	CORT118335.....	58
7.3.	Place des SGRM dans la stratégie thérapeutique	59
PARTIE III : Résultats expérimentaux d'une étude menée au sein du laboratoire TENS.....		61
1.	Contexte de l'étude	62
1.1.	Etat des lieux	62
1.2.	Modèles animaux de stress	62
1.3.	Données préliminaires obtenues au laboratoire.....	63

1.3.1. Le remodelage des neurones du SNE induit des modifications fonctionnelles digestives: cas de la rectocolite hémorragique	64
1.3.2. Validation de modèles animaux d'activation de l'axe HPA : le modèle MPR et le modèle WAS	64
2. Objectifs de l'étude	66
3. Integration of stress by glucocorticoid receptors expressed by neurons of the enteric nervous system induces an increase in intestinal motility	68
4. Conclusion	90
5. Perspectives	94
Bibliographie.....	96

Liste des figures

Figure 1 : De l'équilibre (homéostasie) au stress.....	16
Figure 2 : Initiation d'une réponse de stress et rôle de l'amygdale.....	18
Figure 3 : L'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien est activé lors de l'exposition au stress.....	21
Figure 4 : Courbe de Yerkes-Dodson représentant les performances lors d'une tâche mnésique en fonctions du stress.....	22
Figure 5 : Variation d'arborisation dendritique des neurones des cortex préfrontal et orbitofrontal, de l'amygdale, et de l'hippocampe après un stress chronique.....	23
Figure 6 : Modifications structurales et fonctionnelles dans les régions interconnectées du cerveau suite à un stress chronique.....	24
Figure 7 : Schéma d'une coupe transversale d'intestin grêle.....	27
Figure 8 : Ontogénèse du système nerveux entérique.....	28
Figure 9 : Organisation fonctionnelle du système nerveux entérique	29
Figure 10 : Innervation du tube digestif	31
Figure 11 : Organisation de l'axe intestin-cerveau	33
Figure 12 : Modification de la motilité intestinale du côlon distal induite par la CRH chez les patients IBS	37
Figure 13 : Mécanisme d'activation et d'inactivation de la corticostérone	40
Figure 14: Structure générale du récepteur aux glucocorticoïdes	42
Figure 15 : Mécanisme d'action génomique des récepteurs aux glucocorticoïdes	46
Figure 16 : Structure moléculaire du RU486 (<i>Splitz et Bardin, 1993</i>).....	53
Figure 17 : Structure moléculaire du CORT108297 (<i>Pineau et al. 2016</i>)	55
Figure 18 : La corticostérone augmente le nombre de neurones cholinergiques	65

Liste des abréviations

5-HT	5-hydroxytryptamine
ACh	Acétylcholine
ACTH	Adreno CorticoTropic Hormone
AF-1	Activation function 1
AF-2	Activation function 2
AMP	Adénosine monophosphate
AP-1	Activator Protein 1
ARNm	Acide ribonucleique messenger
ATP	Adenosine triphosphate
AVP	Arginine vasopressine
BDNF	Brain-Derived-Neurotrophic-Factor
BEI	Barrière Epithéliale Intestinale
CBG	Corticosteroid Binding Globulin
CBP	CREB-Binding Protein
CEI	Cellule Epithéliale Intestinale
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
ChAT	Choline Acetyl Transferase
CIC	Cellule Interstitielle de Cajal
CORT108297	Specific GR antagonist
CRE	cAMP response element
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CYP40	Cycophilin 40
DBD	DNA Binding Domain
DRG	Dorsal Root Ganglion
EFS	Electrical Field Stimulation
ENaC	Epithelial Sodium Channel
FST	Forced Swim Test
GCs	Glucocorticoïdes
GI	Gastro Intestinal
GR	Glucocorticoïd Receptor

GRE	Glucocorticoid Response Element
GRP	Gastrin Releasing Peptide
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPA	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis
HPC	Hippocampe
HRE	Hormone Response Element
Hsp	Heat shock protein
IBS	Irritable Bowel Syndrome
IPANs	Intrinsic Primary Afferent Neurons of the intestine
LBD	Ligand Binding Domain
LC	Locus Coeruleus
LMMP	Longitudinal Muscle Myenteric Plexus
MC2-R	Melanocortin-2 receptor
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MII	Maladie Intestinale Inflammatoire
MPR	Maternal Protein Restriction
MR	Mineralocorticoid Receptor
MRE	Mineralocorticoid Response Element
NA	Noradrénaline
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NLS	Nuclear Localization Sequence
NO	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthase
NPY	Neuropeptide Y
NR3C	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C
NTD	N-terminal DNA Binding Domain
OFT	Open Field Test
PHI	Peptide Histidine Isoleucine
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	Paraventricular nucleus
RCH	Rectocolite hémorragique
RU486	Miféprisotone
SGK1	Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1
SGRM	Selective Glucocorticoid Receptor Modulator
SII	Syndrom de l'Intestin Irritable

SNA	Système Nerveux Autonome
SNC	Système Nerveux Central
SNE	Système Nerveux Entérique
SP	Substance P
SRC-1A	Steroid receptor coactivator-1
TD	Tube digestif
TENS	The Enteric Nervous System in Gut and Brain Disorders
TIF2	Transcriptional intermediary factor
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
WAS	Water Avoidance Stress

Introduction

Tous les organismes doivent maintenir un état d'équilibre dynamique complexe, ou homéostasie, qui est constamment remis en question par des facteurs internes ou externes appelées facteurs de stress. Le stress est ainsi défini comme une menace pour l'homéostasie, nécessitant une réponse adaptative qui peut avoir une influence à court et à long terme sur le développement et l'exacerbation de certaines pathologies, et notamment au niveau intestinal, comme le syndrome de l'intestin irritable (SII). Il est aujourd'hui établi que chez l'homme, le stress est associé à des troubles gastro-intestinaux, par des altérations de la motilité, de la sécrétion et de la perméabilité intestinale. En pratique, le stress entraîne flatulences, douleurs abdominales, plus ou moins associées à une diminution de la vidange gastrique et une accélération de la vidange colique.

Un évènement stressant, quel qu'il soit, induit l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien ou axe HPA. Il en résulte la sécrétion de CRH au niveau de l'hypothalamus, stimulant la sécrétion d'ACTH au niveau hypophysaire, qui à son tour stimulera la production surrénalienne du cortisol. Les hormones de l'axe corticotrope sont ainsi considérées comme les hormones du stress. Plusieurs études récentes rapportent que la survenue d'évènements stressants ou traumatisants dans la petite enfance entraîne une prévalence plus élevée de troubles gastro-intestinaux à l'âge adulte. Plusieurs études rapportent également que la cortisolémie de certaines personnes souffrant de troubles digestifs est plus élevée que celle des sujets sains, ceci indépendamment de tout problème surrénalien.

Parallèlement, il a été montré que le stress a un impact sur le cerveau mais aussi sur le tractus gastro-intestinal par le biais du système nerveux entérique (SNE), comme le montrent les observations dans des modèles animaux de stress. Le modèle animal de stress d'évitement de l'eau (WAS) est notamment utilisé pour induire ces altérations, entraînant une diminution de la vidange gastrique, une augmentation du transit fécal, ainsi que de la perméabilité, de la contractilité et de la motilité intestinale.

Le SNE est un réseau neuronal intégratif situé tout au long du tube digestif impliqué dans la régulation des fonctions telles que la motilité et la sécrétion intestinale. Il relie le cerveau au tube digestif : cette interaction bidirectionnelle désigne l'axe cerveau-intestin. Il constitue un circuit de réflexes nerveux, composé de récepteurs, de fibres afférentes projetant vers les aires intégratives centrales et de fibres efférentes projetant vers les structures effectrices du tube digestif. L'axe cerveau-intestin, en coopération avec le système hormonal (hormones intrinsèques au tube digestif, ou synthétisées par les glandes endocrines dont fait partie l'axe HPA) et le système immunitaire, permet au cerveau d'être informé en permanence de l'environnement digestif, et en régule en retour les processus digestifs.

Il a été démontré que la CRH contribue aux changements induits par le stress dans la motilité intestinale et les fonctions de la muqueuse intestinale. Cependant, si les antagonistes des récepteurs de la CRH préviennent les troubles gastro-intestinaux liés au stress dans des modèles animaux, leur efficacité chez l'homme pour soulager les maladies intestinales fonctionnelles sensibles au stress n'a pas été démontrée.

A côté de la CRH, l'axe corticotrope comprend d'autres acteurs, l'ACTH et le cortisol, qui pourraient également être impliqués. Outre leur rôle pléiotropique dans le métabolisme, les glucocorticoïdes (GCs) sont des hormones du stress aigu ou chronique. L'expression de leurs récepteurs (GR) par les cellules épithéliales intestinales ou par les cellules

mononucléaires de la lamina propria intestinale est déjà connue. Ainsi, le rôle des GCs et de leurs récepteurs dans les troubles gastro-intestinaux induits par le stress, comme l'augmentation de la perméabilité, n'est pas exclu. Cependant, ni l'expression de GR par les cellules du SNE, ni les relations entre les GCs et le SNE n'ont encore été décrites.

L'objectif de mon travail de thèse est, dans un premier temps, de décrire les réactions physiologiques et physiopathologiques induites par le stress, tant au niveau du système nerveux central (SNC) qu'au niveau du SNE. Dans un deuxième temps, ce travail reprendra le mécanisme d'action ainsi que les effets des glucocorticoïdes, l'implication des récepteurs GR dans les troubles digestifs, et les stratégies thérapeutiques classiques et émergentes actuelles. Enfin, ce travail intégrera les résultats de notre étude menée au sein du laboratoire The Enteric Nervous System in Gut and Brain Disorders (TENS), visant à déterminer si GR est exprimé par les neurones du SNE, si le stress peut induire une modification du phénotype neuronal, à l'origine de la modification de la motilité digestive, et si ces modifications fonctionnelles peuvent être médiées par GR.

PARTIE I :

Le stress : de la physiologie à la pathologie

1. Le stress : généralités

Le stress est un terme fréquemment utilisé que ce soit dans la vie courante ou dans le domaine médical pour définir un état induit par un environnement engendrant des contraintes et des peurs. C'est une réponse physiologique à une situation ou contrainte physique, psychique ou sensorielle de l'environnement. Le stress est un phénomène normal, indispensable à la survie, mais lorsqu'il devient intense, répété ou prolongé, il peut entraîner des états pathologiques (1). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le stress apparaît chez une personne dont les ressources et stratégies de gestions personnelles sont dépassées par les exigences qui lui sont posées. Bien que la définition du stress ait évolué au cours du temps, l'ensemble des auteurs s'accordent sur les mécanismes biologiques mis en jeu, impliquant l'axe corticotrope, sur lequel nous nous focaliserons, le système nerveux autonome, ainsi qu'une régulation centrale par le système limbique.

1.1. Historique du concept du stress

Le terme « stress » ne tient pas son origine de la langue française. C'est un mot dérivé de l'anglais synonyme de « to strangle » qui signifie étrangler, et on lui reconnaît également une origine latine avec « stringere » qui veut dire serrer (2).

Initialement le stress a été défini comme une réaction de l'organisme, en réponse à un stimulus menaçant, ayant pour but de retrouver son homéostasie (3). En 1878, Claude Bernard, physiologiste français introduit un concept, celui de la constance du milieu, en proposant que « La fixité du milieu intérieur suppose un perfectionnement de l'organisme tel que les variations externes soient à chaque instant compensées et équilibrées. Bien loin au contraire que l'animal élevé soit indifférent au monde extérieur, il est au contraire dans une étroite et savante relation avec lui de sorte que son équilibre résulte d'une continuelle et délicate compensation établie comme la plus sensible des balances » (*Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*, p.114, 1878). Ce principe d'équilibre dynamique du milieu intérieur fut ensuite nommé « homéostasie » par Walter Bradford Cannon (1929), un physiologiste américain, par référence aux mots grecs stasis (« état, position ») et homoios (« égal, semblable à »). Cet équilibre est à la base de toutes les régulations physiologiques et des processus d'adaptation d'un organisme à son environnement. Cannon est le premier à employer le mot « stress » qui désigne les agressions susceptibles de perturber l'homéostasie. Il avait proposé que l'émotion soit au centre de la réponse adaptative et que la peur ou la fureur, en induisant une libération d'adrénaline, préparait le sujet à un comportement de « fight, flight or fright » (lutte, fuite ou effroi). Hans Seyle, un endocrinologue Austro-Hongrois définit le stress comme la réponse non spécifique de l'organisme à toute demande qui lui est faite. Il décrit sa théorie sur le mécanisme du « syndrome général d'adaptation » (Figure 1), qui se déroule en trois phases quel que soit la nature de l'agression.

- Lors de la première phase : « **la réaction d'alarme** », l'organisme mobilise ses ressources énergétiques pour faire face au stress
- Puis dans la « **phase de résistance** », l'organisme utilise ses ressources afin de mettre en place une réaction adaptée

- Si le stress est puissant ou se prolonge, alors l'organisme atteint la « **phase d'épuisement** » pendant laquelle l'énergie utilisée pour y faire face est épuisée. C'est pendant cette phase qu'apparaissent les troubles somatiques à l'origine de pathologies aussi bien psychologiques, métaboliques, inflammatoires ou encore auto-immunes.

On peut aussi observer une dysrégulation de nos systèmes de transduction qui régulent l'expression de nos gènes entraînant à terme des modifications dans leur expression, indiquant clairement que nos systèmes biologiques s'adaptent continuellement (3). Le stress est alors une des voies majeures des bouleversements des systèmes d'homéostasie. De plus, Hans Selye a proposé une implication des hormones cortico-surrénaliennes dans ces troubles, qui ont un rôle de médiateurs.

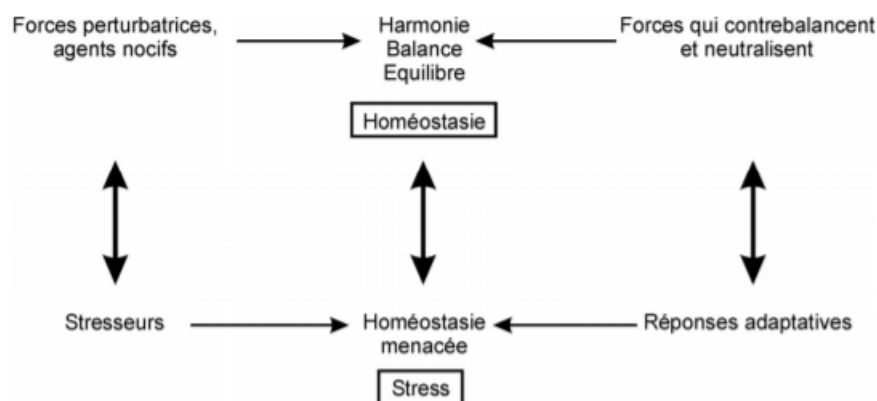


Figure 1 : De l'équilibre (homéostasie) au stress

Dans le langage courant, l'expression stress correspond souvent au changement dû à un stresseur. « Stresseur » en français (stress en anglais) : la force exercée sur le corps déformable. Des réponses adaptatives sont mises en place pour rétablir l'équilibre, l'homéostasie.

1.2. Conception actuelle du stress

A l'heure actuelle, le stress est toujours défini comme la réponse de l'organisme à un stimulus déclencheur appelé « stresseur » mais il est plus souvent et par abus de langage assimilé au stimulus déclencheur de la réponse au stress (2).

Le stress est donc une réaction à une « menace réelle ou interprétée de l'intégrité physiologique ou psychologique d'un individu et qui a pour conséquence une réponse physiologique et/ou psychologique de la part de cet individu » (4). Cette réponse permettra de réduire ou d'éliminer l'impact négatif induit par le stresseur.

On considère deux catégories de stresseurs : le stress physique et le stress psychologique. Ils ont été mis en évidence dans les années 1970 par John Mason, qui a démontré que des stresseurs psychologiques sont tout aussi puissants que des stresseurs physiques et qu'ils peuvent déclencher une réponse de stress. De par ses travaux sur le singe, il démontre qu'un animal témoin de la détresse d'un de ses congénères déploie également une réponse de stress (5).

Ce qui différencie principalement ces deux types de stress repose sur l'action qu'il exerce sur l'individu (6). Le stress physique correspond à une menace physique réelle et immédiate pour la santé et le bien-être de l'organisme, perturbant le milieu interne et déclenchant une restauration de l'homéostasie. Le stress psychologique, quant à lui, n'agit pas directement sur l'individu mais à travers la perception, l'interprétation du stimulus, en liaison avec l'apprentissage et la mémoire. Ce stress peut menacer l'état actuel de l'individu mais peut aussi être anticipé. La prise de conscience du stimulus est donc nécessaire pour induire une réponse de stress qui conduira l'individu à y faire face, en mettant en œuvre une réponse adaptée. De plus chaque individu sera plus ou moins vulnérable au stress, selon son vécu, la valeur émotionnelle qu'il attribue à une expérience, son âge et son sexe. En effet, si toute situation non-spécifique peut entraîner un stress, cela implique que nous devrions tous éprouver un stress devant les mêmes situations. Cependant, ce n'est pas le cas, ce qui nous stresse peut être très différent de ce qui stresse quelqu'un d'autre. La réponse à un stress apparaît donc comme une réponse non spécifique qui peut se produire suite à une interprétation d'une menace absolue (réelle menace) ou bien relative (stimulus interprété comme dangereux sans réel fondement) et entraîne de nombreuses réponses physiologiques et comportementales (7).

Par ailleurs, de nombreux travaux ont également mis en évidence la pertinence des facteurs génétiques dans la contribution à cette diversité neurocomportementale (8).

Aujourd'hui le stress n'est toujours pas considéré comme une pathologie à part entière mais il a une responsabilité dans l'apparition de bien d'autres pathologies et problèmes socio comportementaux en majoration constante depuis plusieurs années.

2. Physiologie et physiopathologie du stress et relation avec l'axe corticotrope

2.1. Neurobiologie du stress

Lorsqu'un individu perçoit un stimulus stressant, des réponses physiologiques coordonnées sont activées. Ces réponses mettent en jeu le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (ortho)sympathique ainsi que l'axe corticotrope ou axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis ou HPA axis en anglais), sur lequel nous allons nous focaliser.

2.2. Initiation de la réponse physiologique au stress

À la vue d'un stimulus menaçant, l'information est relayée au thalamus. Le thalamus relaie l'information à l'amygdale, directement (voie thalamo-amygdalienne), et indirectement en passant par le cortex sensoriel (voie thalamo-cortico-amygdalienne). La première voie sous-corticale est rapide et envoie des informations brutes qui ne sont soumises à aucun traitement cognitif. La seconde voie est plus lente et envoie des informations sensorielles plus détaillées que la première. Ces deux voies convergent sur le noyau latéral de l'amygdale, un noyau connu pour recevoir toutes sortes d'informations sensorielles (9). Le noyau latéral de l'amygdale communique avec le noyau central de l'amygdale directement et indirectement en passant par le noyau basal. Le noyau central qui constitue la principale sortie de l'amygdale,

contrôle l'expression des réactions de peur telles que les réponses comportementales, endocriniennes et celle du système autonome. Les projections du noyau central vers les ganglions de la base induisent un comportement d'immobilisation (freezing), celles vers l'hypothalamus activent l'axe corticotrope et le système sympathique. De plus, le noyau central projette sur les dendrites issues du locus coeruleus (LC) induisant une augmentation de la production de la noradrénaline (NA), ainsi que sur d'autres systèmes neuromodulateurs impliquant notamment des monoamines telles que la sérotonine, la dopamine et l'acétylcholine (10) (Figure 2).

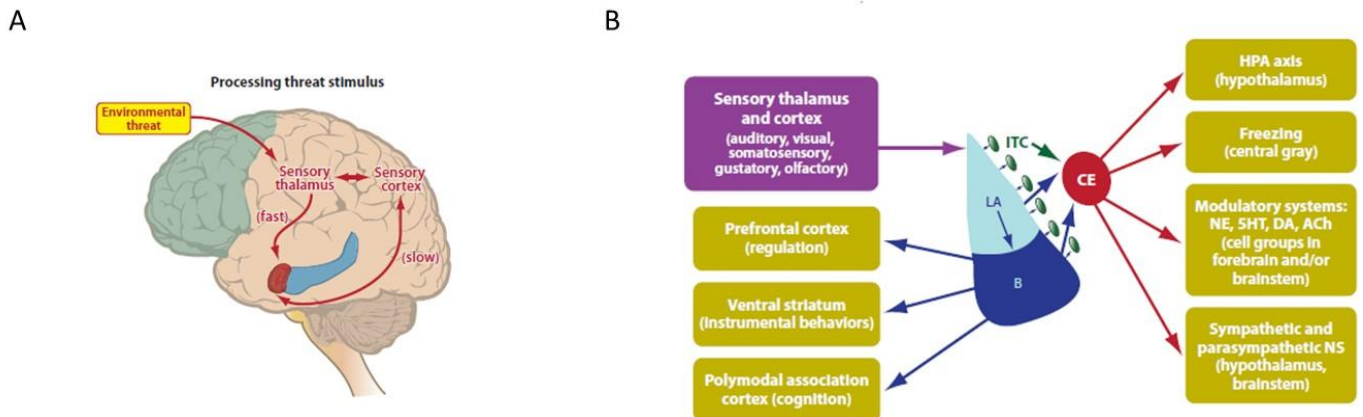


Figure 2 : Initiation d'une réponse de stress et rôle de l'amygdale

B : basal nucleus ; CE : central nucleus ; LA : lateral nucleus ; ITC : intercalated cells

A. Lorsqu'un stimulus menaçant est perçu dans l'environnement, le système sensoriel impliqué active le thalamus qui active directement l'amygdale (voie rapide) et indirectement en passant par le cortex sensoriel (voie lente). **B.** Lorsque le noyau basolatéral (LA et B sur la figure) de l'amygdale reçoit les afférences du thalamus et du cortex, il transmet l'information au noyau central (CE) qui envoie des projections à l'hypothalamus pour activer l'axe corticotrope et le système nerveux sympathique, aux ganglions de la base pour induire un comportement adapté ainsi qu'aux différents systèmes de neuromodulations. (D'après *Rodrigues et al, 2009*)

Lors de la survenue d'un événement stressant, c'est le système hypothalamo-sympathico-adrénergique qui est premièrement activé : c'est la phase d'alerte. Cette activation induit la libération de deux catécholamines : l'adrénaline et la noradrénaline (Figure 2). Ces deux hormones entraînent des changements physiologiques au sein de l'organisme, qui permettent d'alimenter rapidement et massivement le cerveau et les muscles en oxygène, afin d'être plus vigilant, et de préparer instantanément le corps à une action physique brutale. Ces deux catécholamines induisent notamment une augmentation de la fréquence cardiaque (afin d'augmenter l'afflux sanguin vers les muscles squelettiques et le cerveau), de la tension artérielle, des niveaux de vigilance, de la température corporelle... L'organisme est plus réceptif à toutes sensations, comme l'ouïe, la vision ou les odeurs.

Le système hypothalamo-sympathico-adrénergique est qualifié d'axe rapide, car l'effet de ce système est instantanément ressenti sur l'organisme. Nous sommes génétiquement programmés à cette réponse primaire, innée et spontanée. Cependant elle s'avère insuffisante dans de nombreuses situations ; il s'agit d'une réponse à court terme. Si l'agent stressant

perdre, la mobilisation des énergies de l'ensemble du corps est nécessaire, le système endocrinien, à savoir l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA), prend la relève.

2.3. L'axe corticotrope

Cet axe est constitué principalement de trois structures : l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande corticosurrénale (Figure 3).

Le système hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien intervient lors de la phase de résistance, décrite par le syndrome général d'adaptation de Seyle. Dans cette phase, le stresser se maintient.

2.3.1. *L'hypothalamus*

L'hypothalamus est une région du cerveau de la taille d'une amande située au niveau de la partie ventrale du diencephale, sous le thalamus. Cette région est constituée d'un ensemble de noyaux qui font le lien entre le système nerveux central et le système endocrinien. L'hypothalamus est régulé par le système limbique, système nerveux à la base du cerveau, comprenant la région septale, le fornix, l'hippocampe, le complexe amygdalien et les cortex insulaire et fronto-orbitaire postérieur. Il joue un rôle primordial dans les fonctions végétatives et endocrines de l'organisme ainsi que dans les comportements émotionnels et alimentaires. Il intervient dans le maintien de l'homéostasie hormonale et dans les réponses adaptatives du système endocrinien face aux situations de stress.

L'activation de l'hypothalamus par un stimulus stressant entraîne deux types de réponses. Une réponse immédiate par le système nerveux autonome et une réponse hormonale plus lente par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (HPA) ou axe corticotrope. Nous nous intéresserons ici seulement à la réponse à moyen et long terme, de type hormonale.

Ainsi la perception d'un stress déclenche l'activation des neurones au niveau du thalamus, puis de l'amygdale et du LC et enfin de l'hypothalamus (11) (Figure 2 ; Figure 3). L'activation de l'axe corticotrope commence par le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus, qui reçoit des afférences de l'amygdale ainsi que du LC via les récepteurs alpha-1 adrénergiques (12). L'hypothalamus intègre les différentes réponses du cerveau au stimulus stressant. Après traitement de l'information, les neurones parvocellulaires du PVN sécrètent la corticolibérine (ou corticotropin-releasing hormone : CRH, ou encore corticotropin-releasing factor : CRF), un neuropeptide composé de 41 acides aminés, dérivé d'un prépropeptide de 196 acides aminés. Une fois libérée par l'éminence médiane dans les capillaires irriguant l'antéhypophyse, la CRH va agir par l'intermédiaire de deux récepteurs à savoir CRF1 et CRF2 pour permettre l'activation en chaîne de l'axe HPA. Le PVN va aussi sécréter un autre neuropeptide, l'arginine-vasopressine (AVP) composée de 9 acides aminés qui, entre autres, potentialise l'effet du CRH.

2.3.2. *L'hypophyse*

L'hypophyse est une glande endocrine reliée à l'hypothalamus par la tige pituitaire, constituée de deux lobes : le lobe antérieur ou l'anté-hypophyse ou adénohypophyse et le lobe postérieur ou neurohypophyse. Les neurohormones produites par le PVN agissent au niveau de des cellules corticotropes de l'adénohypophyse et induisent l'expression du gène codant pour la pro-opiomélanocortine ou POMC, une protéine de 241 acides aminés dont la maturation donne naissance à de nombreux peptides dont l'ACTH (ou adrenocorticotropie hormone ou hormone corticotrope). L'ACTH est un peptide de 39 acides aminés qui, libéré dans la circulation sanguine, va agir au niveau du cortex surrénalien afin de stimuler la libération de glucocorticoïdes.

2.3.3. *Les glandes corticosurrénales*

Les glandes corticosurrénales sont des glandes endocrines qui constituent la couche externe des glandes surrénales situées au-dessus des reins. Elles sont impliquées dans la sécrétion des stéroïdes dont les glucocorticoïdes. La synthèse des glucocorticoïdes est assurée par la zone fasciculée, une sous-région de la corticosurrénale. C'est lorsque l'ACTH se fixe sur son récepteur MC2-R, récepteur membranaire aux mélanocortines couplé à une adénylate cyclase, qu'elle va permettre de catalyser la phosphorylation de l'enzyme hydrolysant les esters de cholestérol libres dans l'enclave lipidique des cellules surrénales. Cela induit alors la synthèse et la libération des glucocorticoïdes (GCs) dans la circulation sanguine. La principale hormone glucocorticoïde circulante chez l'Homme est le cortisol, et pour d'autres espèces comme le rat, la souris ou la plupart des reptiles, la corticostérone. Le cortisol (ou corticostérone) agit par l'intermédiaire des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) ou aux minéralocorticoïdes (MR).

En conditions basales, l'axe corticotrope sécrète ces hormones selon un rythme circadien, soit de manière importante le matin et plus faible le soir chez l'homme, lié à l'alternance jour/nuit. C'est pourquoi les concentrations de GCs (ainsi que de CRH et d'ACTH) présentent une acrophase au réveil et un nadir en période de sommeil. Ainsi l'acrophase chez l'Homme a lieu le matin tandis que chez le rongeur, animal nocturne, elle a lieu en fin d'après-midi qui correspond au début de sa phase d'activité. Ceci permet une augmentation de l'allocation énergétique nécessaire au début de la phase active, suivie d'une diminution progressive afin de rentrer en état de repos, où les besoins énergétiques sont moindres (13).

Par ailleurs, de nombreux facteurs environnementaux, tels que le stress, sont des stimuli importants pour la sécrétion de cortisol (14). Les glucocorticoïdes agissent sur de nombreux organes mais aussi sur des structures cérébrales afin de réguler leur propre sécrétion : c'est le rétrocontrôle négatif.

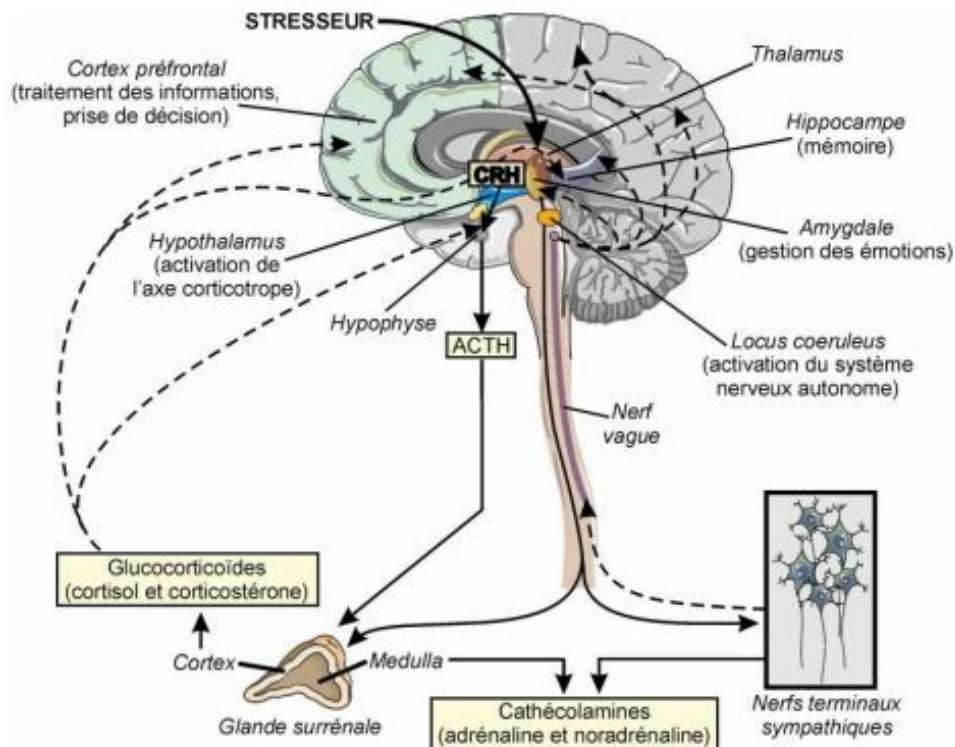


Figure 3 : L'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien est activé lors de l'exposition au stress

Le stress déclenche une cascade de réactions permettant la libération de CRH au niveau de l'hypothalamus, d'ACTH au niveau de l'hypophyse et de GCs au niveau des glandes surrénales. Les GCs exercent un rétrocontrôle sur l'ensemble de l'axe ainsi que des régulations cérébrales et périphériques. D'autre part, le stress active également le système nerveux autonome descendant. Ainsi une seconde réponse au stress, plus rapide passant par le nerf vague, va induire une augmentation de la sécrétion de catécholamines périphériques, à savoir l'adrénaline venant principalement de la médullosurrénale, et la noradrénaline provenant principalement de la décharge des terminaisons sympathiques dans la circulation sanguine. (Bases neurobiologiques et neuroendocriniennes du stress. D'après <http://www.ipubli.inserm.fr/>).

Les glucocorticoïdes, notamment le cortisol, sont les hormones les plus importantes dans la phase de résistance. Ils ont une action différente de l'adrénaline et de la noradrénaline : ici c'est une réaction d'endurance. Véritable initiateur et régulateur métabolique, le cortisol permet de libérer de l'énergie à partir de l'organisme (glucides, graisses), nécessaire à la résistance au stress et à la compensation des dépenses énergétiques.

Le système hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien est qualifié d'axe lent. Les effets de ce système ne sont pas immédiatement ressentis dans le corps.

2.4.Synthèse des effets physiologiques du stress

Au cours de la phase d'alerte du syndrome général d'adaptation, les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) vont permettre une mobilisation de l'énergie qui prépare l'organisme à la lutte ou à la fuite lors d'une réponse à un stimulus bref. Elles facilitent la transmission de l'influx nerveux et la contraction musculaire.

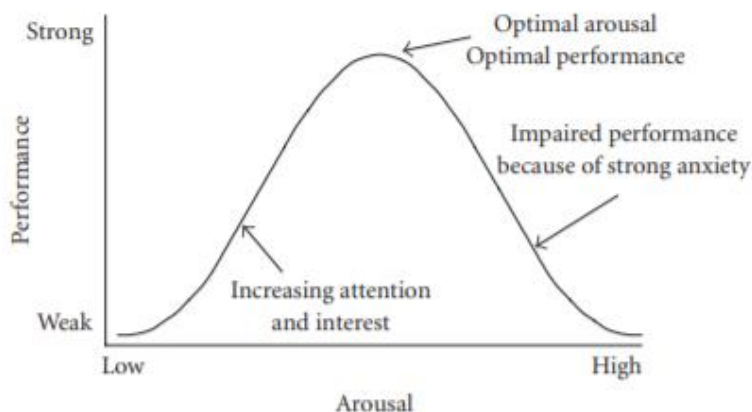
Lors de la phase de résistance, les hormones hypophysaires vont agir sur différents organes. Les réactions physiologiques engendrées ont pour fonction de produire de l'énergie pour

résister au stress. Les glucocorticoïdes (principalement le cortisol ou la corticostérone) ont un rôle majeur.

Lors de la phase d'épuisement, les capacités énergétiques de l'organisme s'épuisent. Il se produit une dérégulation des systèmes neuronaux et endocriniens, provoquant une élévation excessive du taux de glucocorticoïdes. Cette phase favorise l'apparition de pathologies.

3. Stress et système nerveux central

3.1. Stress physiologique : action sur les fonctions cognitives et émotionnelles



Le stress, lorsqu'il reste de l'ordre ponctuel et physiologique, permet de moduler différentes fonctions supérieures comme l'apprentissage et la mémoire. Certains auteurs allant jusqu'à dire que « le stress façonne la mémoire » (15). Schwabe détaille même ses propos en démontrant que le stress joue un rôle à la fois sur la quantité et qualité de la mémoire.

Figure 4 : Courbe de Yerkes-Dodson représentant les performances lors d'une tâche mnésique en fonctions du stress

Concernant l'aspect quantitatif, celui-ci est dépendant du contexte ainsi que de l'état émotionnel du sujet. Plusieurs facteurs sont à prendre en considération comme le contexte émotionnel dans lequel l'apprentissage se fait, la complexité de la tâche ainsi que l'intensité du stimulus stressant. Les performances observées sont alors tributaires de ces facteurs, et varient ainsi avec l'intensité du stress (16) (Figure 4).

Concernant l'aspect qualitatif, le stress contraint le sujet à employer des stratégies simples, rapides et rigides au détriment de stratégies cognitives flexibles et adaptables à de nouvelles situations.

3.2. Stress pathologique et conséquences neurobiologiques

Lorsque le stress devient chronique, la réaction normale peut se trouver perturbée et mener à l'apparition de nombreux troubles. L'homéostasie existante dans des conditions normales disparaît et engendre ainsi des troubles liés à l'hyperactivité ou l'hypoactivité de l'axe HPA qui en résulte. Les répercussions de ces modifications peuvent ainsi toucher toutes les fonctions intervenant dans la régulation de l'axe HPA lui-même, ou les fonctions sensibles à l'état émotionnel de l'individu.

Les modifications engendrées par le stress chronique sont généralement importantes aussi bien au niveau comportemental que physiologique. Certaines études montrent que le stress chronique généré soit par une injection quotidienne de corticostérone ou par une contention quotidienne de rats sur une durée de 3 semaines induit des modifications neuronales qui sont à l'origine d'altérations de la mémoire ou de l'apprentissage, d'une exacerbation du déclin cognitif lié au vieillissement, et d'une susceptibilité accrue des neurones de l'hippocampe à l'atrophie ou à la nécrose (17) (18).

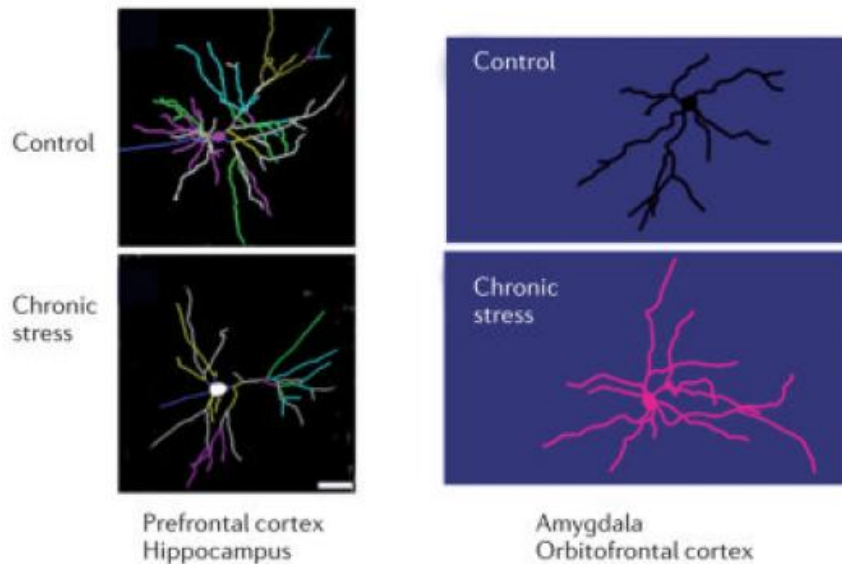


Figure 5 : Variation d'arborisation dendritique des neurones des cortex préfrontal et orbitofrontal, de l'amygdale, et de l'hippocampe après un stress chronique

Variation d'arborisation dendritique dans le cortex préfrontal et l'hippocampe (à gauche) et au contraire une augmentation dans l'amygdale et le cortex orbitofrontal (à droite) sont observables après une exposition à un stress chronique (D'après Popoli et al, 2012)

Une sécrétion excessive de glucocorticoïdes, caractéristique du stress chronique, a donc un impact sur la plasticité neuronale. La plasticité neuronale se caractérise par une croissance et un renouvellement des épines dendritiques, ainsi que la pousse axonale. Un excès de glucocorticoïdes entraîne une perte nette d'épines nouvelles, mais aussi des épines anciennes, formées au cours du développement, aboutissant à terme à une atrophie, principalement localisée dans l'hippocampe et le cortex préfrontal. Cette modification neuronale empêche l'apprentissage et la consolidation de la mémoire, par un défaut de neurotransmission. En effet, les neurones hippocampiques expriment les récepteurs aux glucocorticoïdes. L'altération de cette région conduit à une levée de l'inhibition tonique qu'exerce l'hippocampe sur l'activation de l'axe corticotrope, qui lorsqu'elle se pérennise *via* un cercle vicieux, entraîne divers processus pathologiques (Figure 6).

En revanche, une augmentation de l'arborisation dendritique est observée dans l'amygdale et le cortex orbitofrontal. Cette hypertrophie dendritique est associée à une augmentation de la mémoire de peur, à de l'anxiété et de l'agressivité (18) (19).

Quelques mois après l'arrêt des stressseurs, les neurones de l'hippocampe et du cortex préfrontal médian reviennent à leur conformation d'origine, ce qui confirme l'existence d'une

plasticité neuronale. En revanche l'hypertrophie de l'amygdale persiste après l'arrêt des stressseurs dans les modèles utilisés jusqu'à présent (21).

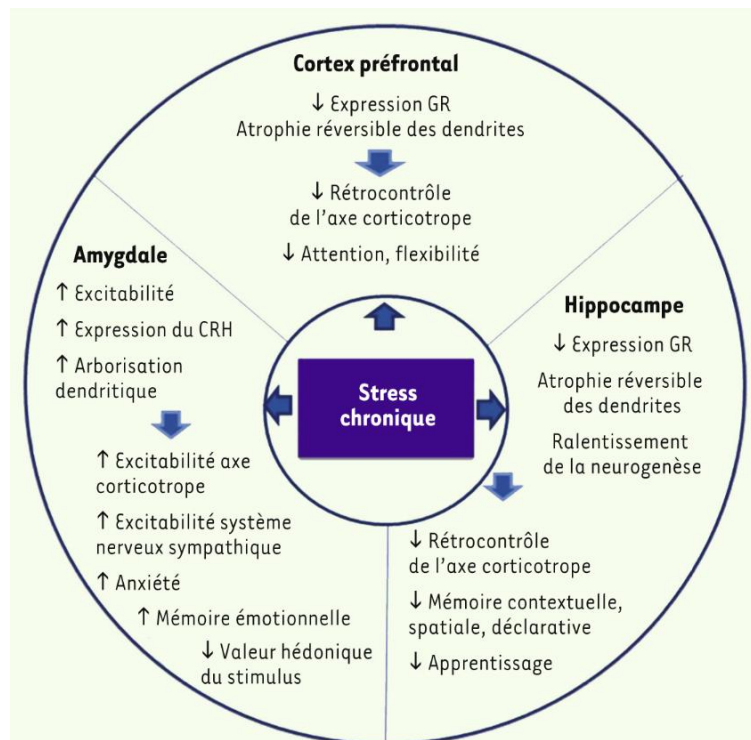


Figure 6 : Modifications structurales et fonctionnelles dans les régions interconnectées du cerveau suite à un stress chronique

Le stress entraîne des modifications dendritiques, ainsi que des changements de sensibilité dans le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'amygdale. L'hippocampe présente un volume réduit principalement associé à une diminution de la neurogénèse et une atrophie dendritique réversible. Le cortex préfrontal médian présente lui aussi une atrophie dendritique réversible. Enfin l'amygdale présente une hyperactivité associée à une augmentation du nombre de dendrites persistante (*Adapté de Roozendaal et al, 2009*).

Cependant, le postulat d'un effet direct des glucocorticoïdes sur le processus de neurodégénérescence est très controversé. En effet, chez les patients souffrant d'un syndrome de Cushing (adénome de l'hypophyse ou des surrénales entraînant une sécrétion élevée et continue de cortisol), on observe une réduction du volume de l'hippocampe qui est en partie réversible après quelques semaines de traitement suggérant qu'il n'y a pas de perte neuronale totale chez ces patients. Par ailleurs, ces modifications semblent être sensibles à l'âge d'apparition du stress chronique. Des études récentes ont montré que chez le sujet jeune, l'arborisation dendritique dans le cortex préfrontal se renouvelait après l'arrêt du stress chronique. Cependant cette récupération ne s'observe pas, ou du moins pas complètement, chez des sujets adultes et âgés (21).

Selon l'hypothèse actuelle, les glucocorticoïdes favoriseraient la neurotoxicité exercée par les acides aminés excitateurs. De façon aiguë, le stress permet une augmentation de la neurotransmission glutamatergique dans l'hippocampe et dans le cortex préfrontal (18). De façon chronique, la neurotransmission glutamatergique de l'hippocampe reste durablement accrue tandis que celle du cortex préfrontal augmente mais ne se maintient pas (23). Ceci

suggérerait une faculté d'adaptation du cortex préfrontal mais pas de l'hippocampe dans la réponse au stress chronique. Le stress chronique peut également altérer la capacité à « vidanger » le glutamate synaptique. Cela peut conduire à une concentration excessive de glutamate et donc à l'activation de récepteurs extrasynaptiques au glutamate. Cette excitotoxicité se traduit par des changements morphologiques de certaines régions du cerveau qui modifient les connectivités synaptiques et donc le fonctionnement cérébral. Ces modifications touchent principalement des structures impliquées dans la régulation de l'axe HPA (21) (24).

Le rôle du remodelage des dendrites est considéré comme un processus adaptatif par certains auteurs : il éviterait une suractivité du glutamate qui engendrerait des effets neurotoxiques irréversibles (4). D'autres chercheurs pensent au contraire que la réduction de la taille et de la densité des épines dendritiques accroît la vulnérabilité des neurones aux effets neurotoxiques irréversibles (25).

On distingue l'impact des glucocorticoïdes sur la plasticité neuronale, du remodelage neuronal. Ce dernier se caractérise par un remodelage des connexions synaptiques et du profil neurochimique, appréhendé par phénotypage neuronal. Cependant ce sont deux mécanismes à associer.

Parmi les facteurs de croissance ayant un impact sur le remodelage neuronal, on retrouve le *brain-derived-neurotrophic-factor* (BDNF). Il s'agit d'une neurotrophine qualifiée de neuromodulateur. Il est fortement exprimé dans le cerveau et notamment dans l'hippocampe. Il joue un rôle dans la mémorisation, et la plasticité neuronale (26).

Il a été montré que le niveau de BDNF influence drastiquement le répertoire de gènes sensibles aux glucocorticoïdes, en favorisant le recrutement de cofacteurs spécifiques du récepteur GR, par modulation de la phosphorylation de ce dernier. Ainsi le BDNF influence le profil d'expression génétique des gènes cibles régulés par le récepteur GR (27). Néanmoins, les mécanismes moléculaires par lesquels le stress régulerait l'expression de BDNF ne sont pas encore clairement définis, mais plusieurs études évoquent cette relation (20).

4. Stress et troubles digestifs

Il est admis que le stress affecte les fonctions digestives, les premières descriptions de ces relations remontant au XIX^{ème} siècle (28). De façon similaire à ses effets sur les neurones du SNC, plusieurs études suggèrent que le stress impacte les fonctions du système nerveux entérique (SNE). Ce dernier est connecté au SNC, notamment *via* le nerf vague, ce qui lui permet de relier les centres cognitifs du cerveau aux fonctions digestives périphériques.

4.1. Généralités sur le système nerveux entérique

Le système nerveux entérique (SNE), aussi appelé « second cerveau » est également considéré comme le cerveau originel, puisque les organismes pluricellulaires primitifs n'avaient qu'un tube digestif innervé. C'est uniquement au cours de l'évolution que

l'encéphale a pu se développer, dans le but d'améliorer les systèmes sensoriels tels que la vue et l'odorat. L'étude du système nerveux entérique, ou neurogastroentérologie, a débuté dès les années 1860 avec la description par G. Meissner et L.Auerbach de deux plexus nerveux distincts présents dans la paroi intestinale : le plexus de Meissner ou plexus sous-muqueux et le plexus d'Auerbach ou plexus myentérique. Des expériences réalisées par S.R y Cajal lui ont ensuite permis d'identifier différents types de neurones dans la paroi intestinale, que A.S Dogiel classifia en 1899 selon leur morphologie (29).

Le rôle fonctionnel du SNE a été établi en 1899 par l'étude de Bayliss et Starling chez le chien (30). Sur des anses intestinales isolées, ils ont observé une avancée du contenu luminal s'accompagnant d'une contraction dans le sens oral et d'une relaxation dans le sens anal. Ils ont démontré que la stimulation mécanique de l'intestin induisait ce réflexe moteur et qu'il était conduit par un système nerveux intrinsèque, en particulier le plexus d'Auerbach. Enfin, le caractère intrinsèque de cette innervation fut confirmé par les travaux de J.N. Langley qui montra la persévérance des contractions après la dégénérescence des afférences nerveuses (31). Ainsi, en 1921 le système nerveux entérique a été défini comme la troisième division du système nerveux autonome.

4.2. Innervation intrinsèque du système nerveux entérique

4.2.1. Organisation du SNE

Le SNE est un système autonome et intégratif distribué tout le long du tube digestif, composé de cellules gliales et de 200 à 600 millions de neurones (moteurs et sensitifs) tapissant la paroi intestinale, reliés entre eux par des fibres interganglionnaires. Il s'organise en deux plexus : le **plexus myentérique** (ou plexus d'Auerbach), situé entre les couches musculaires lisses longitudinales et circulaires, et le **plexus sous-muqueux** (ou plexus de Meissner), situé entre la muqueuse et la couche musculaire circulaire (Figure 7).

Cette organisation a un rôle fonctionnel puisque le plexus myentérique, présent de l'œsophage au rectum, est impliqué dans la régulation des fonctions de motricité alors que le plexus sous-muqueux, principalement développé au niveau de l'intestin grêle, est impliqué dans la régulation de la perméabilité, des sécrétions digestives et du flux sanguin (32). Il existe cependant des exceptions car certains neurones du plexus sous-muqueux externe innervent les muscles circulaires et à l'inverse des neurones du plexus myentérique ont des projections qui s'étendent jusqu'à la muqueuse.

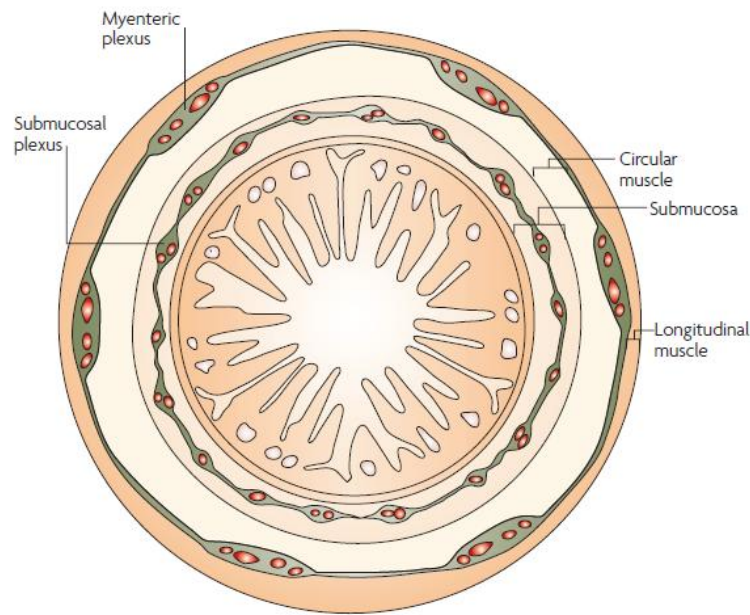


Figure 7 : Schéma d'une coupe transversale d'intestin grêle

L'organisation du système nerveux entérique se fait en deux plexus principaux : le plexus sous-muqueux, localisé entre la muqueuse et couche musculaire circulaire ; le plexus myentérique, localisé entre les couches musculaires circulaires et longitudinales (D'après *Heanue et Pachnis, 2007*)

4.2.2. Structure du SNE

Le SNE et le SNC partagent une origine commune et montrent des similarités fonctionnelles et chimiques :

- Le SNE est originaire de la crête neurale (Figure 8A). La crête neurale chez l'embryon est constituée d'une population de cellules transitoires et multipotentes générées à partir de la région la plus dorsale du tube neural (à l'origine du SNC, Figure 8B). Les cellules du segment vagal de la crête neurale migrent et colonisent le TD au cours du développement (Figure 8C). Une fois dans le TD, ces cellules précurseur se différencient en cellules gliales et en neurones qui constituent l'**innervation intrinsèque** du TD (Figure 8D) (33).

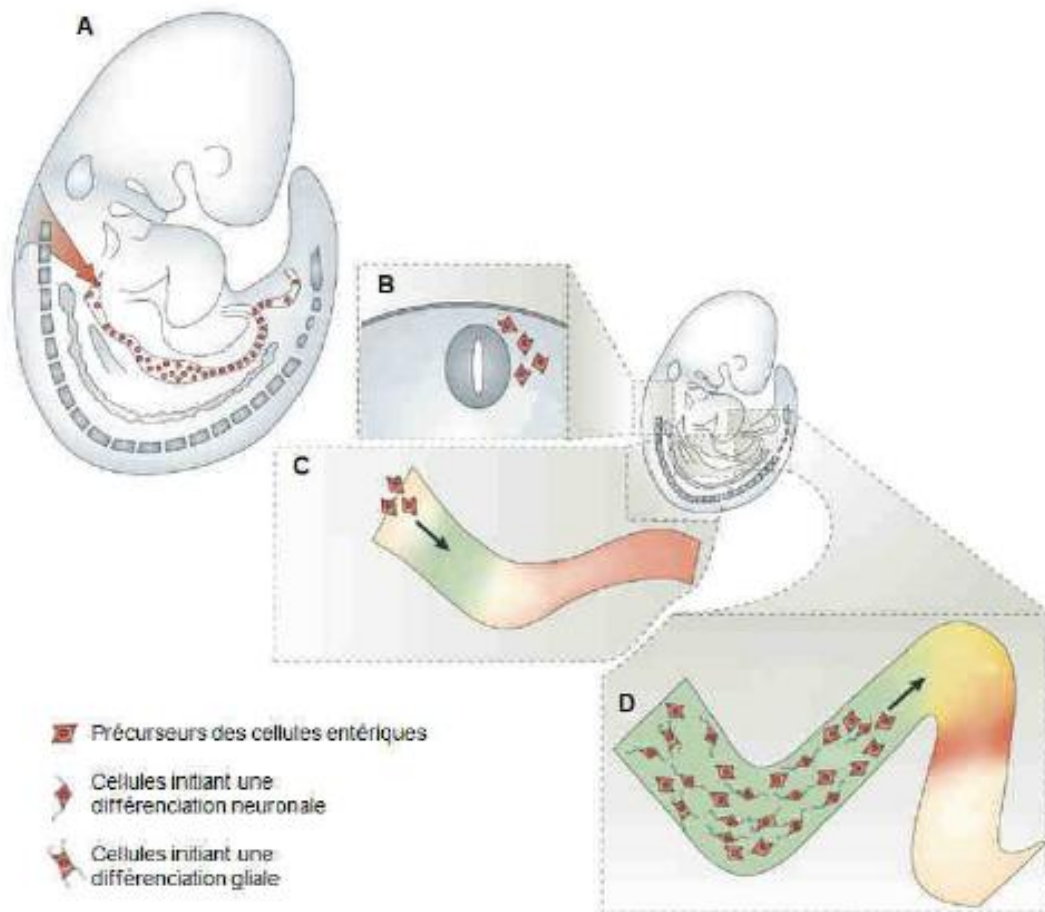


Figure 8 : Ontogénèse du système nerveux entérique

Mise en place du système nerveux entérique à partir des cellules de la crête neurale au cours du développement embryonnaire (A et B). Ces cellules migrent dans le tube digestif (C), avant de se différencier (D). (Adapté de Heanue et Pachnis, 2007)

- Le SNE contient entre 200 et 600 millions de neurones chez l'Homme soit approximativement le même nombre que ceux de la moelle épinière (34).
- Le SNE synthétise la plupart des neurotransmetteurs produits par le SNC (35).
- Le SNE est un système intégratif composé de neurones afférents, efférents et d'interneurones qui peuvent présenter une activité indépendante du SNC (34).

4.2.3. Neurones fonctionnels du SNE

Les neurones entériques sont classés en fonction de leur morphologie, de leurs propriétés électrophysiologiques et de la nature de leurs neurotransmetteurs. D'un point de vue général, le SNE est composé par (34) (36) :

- Les **neurones afférents primaires intrinsèques** (IPANs), situés préférentiellement dans le plexus sous-muqueux. Ils reçoivent l'information sensitive et régulent l'activité des interneurones et des neurones moteurs entériques. Les IPANs myentériques et sous-muqueux sont multimodaux et peuvent répondre à des stimuli de

nature différente : ils peuvent répondre à la distension de la paroi intestinale grâce aux mécanorécepteurs dans les couches musculaires ou dans la muqueuse et, *via* des chémorécepteurs situés dans la muqueuse, aux changements chimiques de la lumière du TD.

- Les **neurones moteurs**, situés dans le plexus myentérique. Ils peuvent être excitateurs ou inhibiteurs. Les neurones excitateurs, dont les axones projettent dans la direction ascendante, stimulent les cellules effectrices et sont ainsi responsables de la synthèse de l'acétylcholine (ACh) sous l'action de la Choline Acetyltransférase (ChAT), et de la substance P (SP). Ils induisent la contraction des fibres musculaires. Les neurones inhibiteurs, dont les axones projettent dans la direction descendante (anale), réduisant l'activité des cellules effectrices en favorisant la synthèse des neuromédiateurs tels que le monoxyde d'azote (NO), sous l'action de la NO synthase (NOS), le peptide vasoactif intestinal (VIP) ou l'ATP, responsables de la relaxation musculaire en aval du stimulus (37). C'est l'alternance de contractions en amont du bol alimentaire et, de manière simultanée, de relaxations en aval qui permet le péristaltisme intestinal et l'avancée du bol alimentaire le long tube digestif dans le sens antéro-postérieur (Figure 9) (36).
- Les **interneurones**. Ils forment un réseau dense au travers duquel les informations transitent. Ils permettent ainsi d'établir de multiples connexions entre les neurones afférents et efférents.

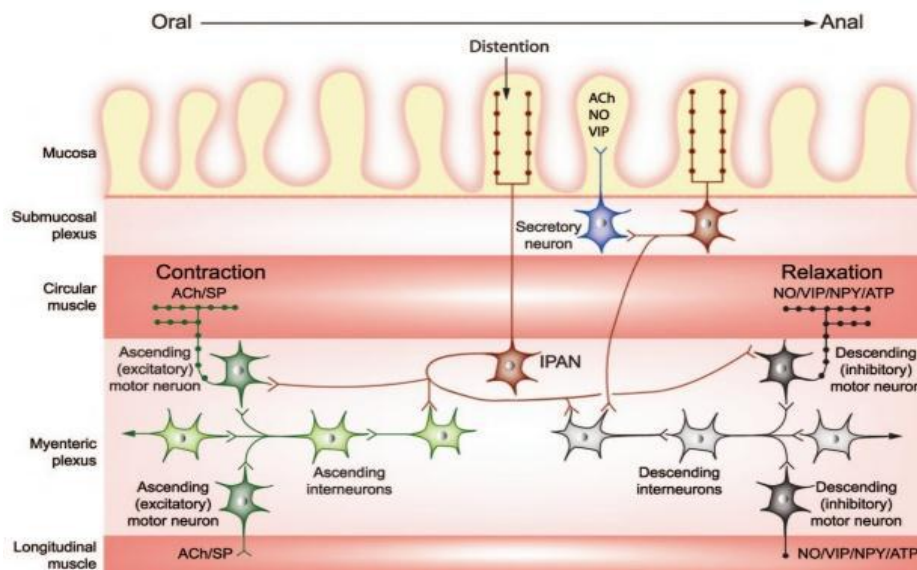


Figure 9 : Organisation fonctionnelle du système nerveux entérique

Les neurones IPANs sont présents dans les deux plexus (sous-muqueux et myentérique). Ils sont sensibles à une distension locale et possèdent des projections dans les directions orales et anales. Les interneurons et neurones moteurs sont présents dans le plexus myentérique. Ces derniers présentent des prolongements dans le muscle circulaire, et peuvent ainsi entraîner sa contraction ou relaxation (D'après Benarroch, 2007)

4.3. Innervation extrinsèque du SNE : communications entre le SNE et le SNC

Bien que le SNE soit capable de fonctionner indépendamment du SNC, le contrôle nerveux des fonctions digestives ne dépend pas uniquement de celui-ci, mais est en réalité un système intégratif qui implique des interactions entre les réflexes locaux du SNE, les réflexes qui passent par les ganglions sympathiques et les réflexes qui passent par l'intestin pour retourner vers le SNC (34). L'échange entre le SNE et le SNC est bidirectionnel. Il se fait par l'intermédiaire des voies afférentes, qui transportent les informations sensibles vers les centres intégrateurs et, de voies efférentes qui transmettent la commande motrice aux effecteurs. La proportion des fibres afférentes sensibles par rapport aux fibres efférentes motrices est supérieure : on retrouve environ 80% de fibres sensibles pour seulement 20% de fibres efférentes dans le nerf vague. Ces voies appartiennent au système nerveux sympathique (noradrénergique) et parasympathique (cholinergique), respectivement inhibiteur, et excitateur, qui constituent le **système nerveux extrinsèque**.

4.3.1. *Fibres afférentes*

Les récepteurs du TD sont des terminaisons nerveuses de neurones afférents primaires capables de collecter l'information sensible provenant de la muqueuse, des couches musculaires ou de la séreuse et de la transmettre au cerveau *via* le système nerveux autonome (SNA). Ces IPANs qui portent les informations sensorielles au SNC sont localisés dans le nerf splanchnique (sympathique) et le nerf vague (parasympathique).

Les neurones afférents parasympathiques sont des neurones sensitifs constitués d'afférences vagues qui sont présentes dans le nerf pneumogastrique (ou nerf vague), et d'afférences spinales ou splanchniques que l'on retrouve dans les systèmes sympathique et parasympathique pelviens. Le corps cellulaire des neurones afférents primaires vagues est localisé dans le ganglion plexiforme (ganglion inférieur du nerf vague), à proximité du bulbe, et leurs terminaisons nerveuses dans le tronc cérébral, au niveau des noyaux du tractus solitaire, alors que les terminaisons nerveuses du nerf pelvien sont localisées dans la partie sacrée de la moelle épinière. Les terminaisons nerveuses transmettent ainsi l'information aux centres nerveux supérieurs ou directement aux voies efférentes. Elles sont sensibles à la distension mécanique et aux concentrations luminales de glucose, acides aminés et acides gras à chaînes longues (38) (34) (36). Ces neurones afférents parasympathiques sont responsables de l'initiation des réflexes de déglutition, de motricité et de sécrétion intestinale.

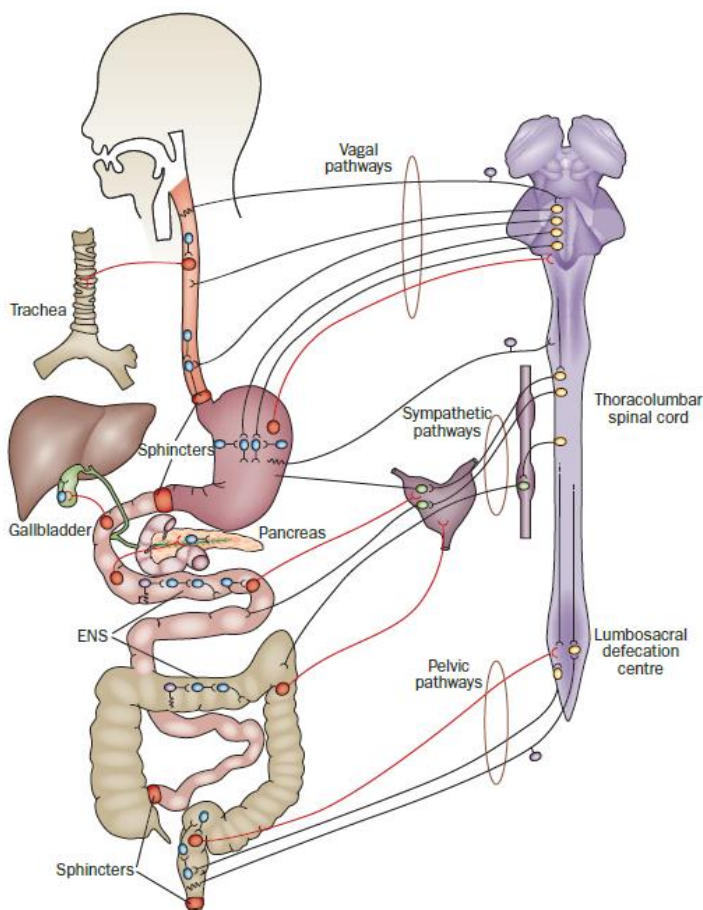
Les neurones afférents splanchniques sympathiques correspondent principalement à des nocicepteurs. Ils ont leurs corps cellulaires dans le noyau dorsal du nerf vague et leurs terminaisons sont localisées dans la paroi digestive. Ils sont responsables de la détection de la douleur digestive.

4.3.2. *Fibres efférentes*

Les voies efférentes motrices parasympathiques comportent le nerf vague qui contrôle les fonctions motrices et sécrétomotrices des parties supérieures du TD, et les nerfs sacrés qui régulent les fonctions du côlon distal et du rectum. Le nerf vague contrôle ces fonctions *via*

des neurones cholinergiques viscéro-moteurs dont le corps cellulaire est localisé au niveau bulbaire, dans le noyau dorsal du nerf vague. Le noyau moteur dorsal du nerf vague contient les neurones pré-ganglionnaires viscéromoteurs qui innervent les plexus myentérique et sous muqueux du SNE et font donc synapse avec les neurones post-ganglionnaires entériques directement à proximité des organes concernés (34). L'acétylcholine libérée possède une action excitatrice sur les neurones entériques principalement *via* les récepteurs nicotiniques et dans certaines régions *via* les récepteurs muscariniques.

L'innervation efférente sympathique quant à elle est constituée d'une voie à deux neurones. Les neurones pré-ganglionnaires viennent de la corne intermedio-latérale de la moelle épinière et innervent des ganglions des chaînes paravertébrale et prévertébrale *via* le nerf splanchnique. Les fibres qui pénètrent le TD sont donc des fibres nerveuses post-ganglionnaires. Les neurones pré-ganglionnaires sont cholinergiques alors que les neurones post-ganglionnaires sont essentiellement adrénargiques. La noradrénaline possède des effets inhibiteurs sur le muscle lisse gastro-intestinal (sauf au niveau des sphincters) *via* son action sur les neurones entériques. L'activation des neurones sympathiques conduit alors à une inhibition de l'excitabilité des neurones entériques (34).



L'innervation du tube digestif comprend de nombreux circuits localisés dans le SNE (neurones sensitifs en violet, neurones moteurs et interneurons en bleu). Ces circuits locaux projettent vers le SNC (neurones en jaune) *via* des IFANS (Intestinofugal neurons ; en rouge). Les neurones sympathiques des ganglions paravertébraux (en vert) reçoivent des informations du SNE et du SNC. Les informations sensitives en provenance du tube digestif partent vers le SNE *via* des neurones intrinsèques primaires afférents (en violet) et vers le SNC *via* des neurones extrinsèques primaires afférents (en violet) qui suivent les voies afférentes spinales et vagues. Les informations du SNC atteignent le SNE et les effecteurs intestinaux à travers des voies vagales, sympathiques et pelviennes (D'après Furness, 2012).

Figure 10 : Innervation du tube digestif

Ces communications entre SNE et SNC vont ainsi permettre de moduler les fonctions digestives, mais également de relier les centres émotionnels et cognitifs du cerveau aux fonctions et mécanismes intestinaux périphériques. Elles vont notamment permettre de réguler la sensation d'appétit ou encore de moduler la motilité digestive durant le sommeil. Il a par ailleurs été montré que ces communications pourraient être utilisées en thérapeutique. L'équipe de Brégeon et ses collaborateurs a montré que la stimulation des racines sacrées permet d'améliorer la réparation de la muqueuse intestinale induite par une inflammation, en plus de traiter l'incontinence (39). Elle représente ainsi une potentielle piste thérapeutique dans les pathologies impliquant des défauts de la barrière épithéliale intestinale, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). A l'inverse, une hypothèse formulée par Braak suggère que cette communication SNE-SNC pourrait être impliquée dans la maladie de Parkinson : selon lui les atteintes neuronales débuteraient au niveau de l'intestin suite à une infection par un pathogène neurotrophique, et pourraient remonter jusqu'au cerveau notamment via le nerf vague (40)

4.3.3. Synthèse du concept axe intestin-cerveau

Il en résulte que le SNC est en interaction permanente avec le TD, d'où le concept d'« intestin-cerveau ». Dans cet axe, le SNE peut être considéré comme une partie du SNC qui a migré vers le TD durant le développement mais qui a maintenu deux voies de communication (sympathique et parasympathique) bidirectionnelles avec le cerveau (chacune contenant des fibres nerveuses afférentes et efférentes) et qui contrôle le système effecteur (41) (Figure 10). L'axe intestin-cerveau représente donc un circuit de réflexes complexes, composé de récepteurs, de fibres afférentes projetant vers les aires intégratives centrales et de fibres efférentes projetant aux structures efférentes du TD. Le SNC est ainsi informé en permanence de la nature de l'environnement chimique dans la lumière du TD, de la tension dans la paroi du TD et de la condition du tissu (inflammatoire par exemple) *via* les afférences. Une fois intégré, le SNC module les fonctions gastro-intestinales par le biais de neurones efférents qui stimulent les neurones du SNE, eux-mêmes en interaction avec les cellules effectrices. L'activité du TD peut également être modulée par le SNE lorsqu'il contourne le réseau cortical : il peut alors générer une activité indépendamment de toute intervention du SNC, c'est l'innervation intrinsèque du SNE (34) (Figure 11).

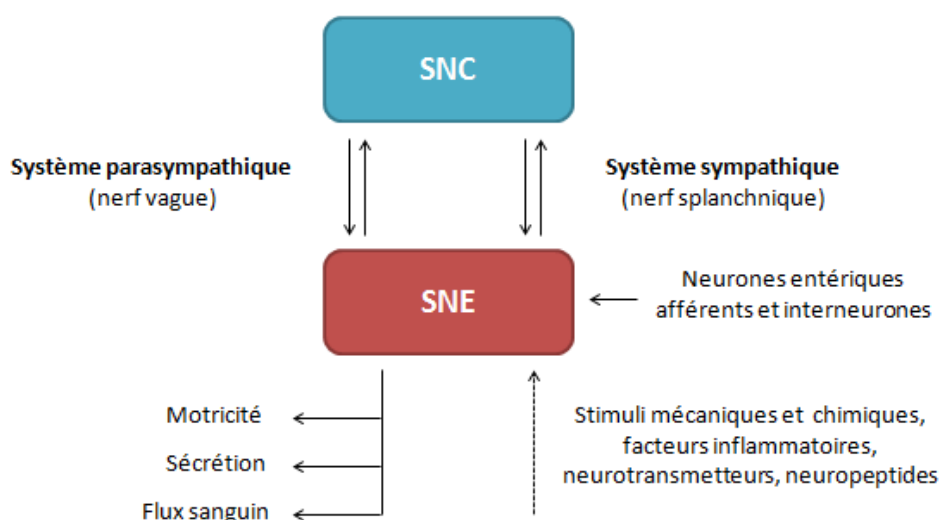


Figure 11 : Organisation de l'axe intestin-cerveau

L'organisation neuronale de l'axe intestin-cerveau montre une communication bidirectionnelle entre le système nerveux central (SNC) et le système nerveux entérique (SNE) (Adapté de Konturek *et al.*, 2004)

L'axe intestin-cerveau joue donc un rôle primordial dans la régulation de certaines fonctions vitales. Dans les conditions physiologiques, il contrôle les processus digestifs (motricité, sécrétions exocrines ou endocrines et microcirculation du TD), que nous détaillerons par la suite, le comportement alimentaire, le système immunitaire gastro-intestinal et la réponse au stress, à la douleur ou aux émotions. Dans les conditions pathologiques, une altération des interactions entre le cerveau et le TD peut conduire à des troubles digestifs (troubles digestifs fonctionnels comme le syndrome de l'intestin irritable), ou à des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI).

4.4. Rôles des neurones entériques

4.4.1. Contrôle de la motricité intestinale

La motricité digestive permet à la fois la fragmentation des aliments et le transport du bol alimentaire tout au long du tube digestif. La réalisation de ces deux tâches est permise par les contractions et relaxations synchronisées de la paroi digestive. Le mélange du bol alimentaire avec les enzymes digestives est permis par des contractions annulaires oscillantes, que l'on désigne sous le terme de fragmentation ou segmentation. L'avancée du bol alimentaire dans le sens oro-anal est quant à elle permise par le péristaltisme qui correspond à des séquences contractions/relaxations limitant le reflux du bol alimentaire en amont, et de contractions longitudinales permettant sa progression (42).

Le contrôle et la synchronisation des contractions/relaxations musculaires participant au péristaltisme et à la segmentation sont assurés par le SNE, indépendamment du SNC (30). En effet, l'étude de Furness et son équipe (1995) a pu montrer, après destruction de l'innervation extrinsèque, que le SNE était à l'origine de ce réflexe. En réponse à des stimuli mécaniques

comme la distension, ou à des stimuli chimiques (modification du pH, de la concentration en glucides et en acides gras, osmolarité), les cellules entéroendocrines de la zone soumise au stimulus libèrent de la sérotonine et activent ainsi les IPANs. Les IPANs activés libèrent des neuromédiateurs tels que l'ACh ou la SP, qui activent ainsi les interneurons ascendants et descendants (43). Les interneurons ascendants sont connectés à des neurones moteurs excitateurs de type cholinergiques qui, une fois activés, stimulent la contraction intestinale en amont du stimulus. Les interneurons descendants, connectés à des neurones moteurs inhibiteurs de type nitrergique, induisent une relaxation musculaire en aval du stimulus.

La transmission de l'influx nerveux vers les cellules musculaires lisses fait intervenir un troisième acteur cellulaire que sont les cellules interstitielles de Cajal (CIC). Elles sont localisées entre le muscle circulaire et le muscle longitudinal au niveau du plexus myentérique. Ce sont des cellules pacemaker qui génèrent des ondes électriques lentes rythmant les contractions musculaires et donc le réflexe péristaltique. Les CIC interagissent avec les cellules musculaires lisses par l'intermédiaire de GAP junctions ce qui leur permet d'assurer leur dépolarisation par l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants et ainsi être à l'origine des ondes lentes (44). Elles sont innervées par les neurones entériques et répondent à différents neurotransmetteurs car elles possèdent des récepteurs aux neurotransmetteurs inhibiteurs tels que le VIP ou le NO ainsi que des récepteurs aux neurotransmetteurs excitateurs comme les récepteurs muscariniques ou les récepteurs aux tachykinines (28). Un défaut de fonction de ces cellules conduit à des désordres moteurs sévères.

4.4.2. Contrôle des sécrétions intestinales

Parallèlement au réflexe péristaltique, les neurones entériques contrôlent également le réflexe sécrétomoteur. Les réflexes sécrétomoteurs sont initiés physiologiquement par une interaction chimique et mécanique avec le contenu luminal, mais peuvent également être induits en conditions pathologiques, par des toxines par exemple. L'augmentation de la sécrétion de mucus dans la lumière et l'accélération du transit contribue à l'élimination des pathogènes.

La stimulation mécanique de la muqueuse active la libération de sérotonine (5-HT) par les cellules entérochromaffines, ce qui induit le réflexe sécrétomoteur. La 5-HT active les IPANs qui à leur tour activent les neurones sécrétomoteurs ascendants cholinergiques et descendants VIPergiques localisés dans les plexus sous-muqueux (45). De la même manière, l'ACh et le VIP se lient ensuite à des récepteurs épithéliaux et stimulent la sécrétion d'ions chlorures dans la lumière intestinale tout en inhibant l'absorption de sodium (46). De nombreuses substances comme l'ATP ou encore le glutamate modulent l'activité des neurones sécrétomoteurs afin d'augmenter ou d'inhiber la sécrétion d'eau et d'ions par les cellules épithéliales intestinales (CEI).

Le réflexe sécrétomoteur est majoritairement réalisé par les neurones sous-muqueux. Cependant, il existe des neurones sécrétomoteurs cholinergiques et VIPergiques dans le plexus myentérique qui projettent vers la muqueuse.

4.4.3. Contrôle de l'absorption intestinale

Parallèlement au contrôle des flux d'électrolytes, les neurones du plexus sous-muqueux régulent l'absorption d'ions Na⁺. En effet, une stimulation électrique de ces neurones entraîne une diminution de l'absorption de Na⁺. Par ailleurs, le SNE peut réguler l'absorption d'acides aminés par la barrière épithélio-intestinale. Par exemple, la CGRP (Calcitonin gene-related peptide) diminue l'absorption d'alanine, de proline et de taurine par la muqueuse du jéjunum (46).

4.4.4. Contrôle du flux sanguin

Le flux sanguin est contrôlé à la fois par des neurones extrinsèques et intrinsèques. Ainsi, les vaisseaux sont innervés par des fibres vasoconstrictrices sympathiques et vasodilatatrices parasympathiques (28). Dans l'intestin grêle et le côlon, la vasoconstriction des artérioles est contrôlée par des fibres nerveuses extrinsèques sympathiques des ganglions mésentériques avec pour médiateur principal l'ATP qui active les récepteurs P2X des artérioles. La vasodilatation est assurée par une innervation extrinsèque provenant des ganglions rachidiens dorsaux via la libération de neuromédiateurs comme la SP et la CGRP et intrinsèque, par les neurones entériques sous-muqueux (SNE). Ainsi les neurones sous-muqueux sont les effecteurs primaires vasomoteurs et leur excitation entraîne une vasodilatation et donc une augmentation du débit vers la muqueuse (47).

Au niveau de l'intestin grêle les neurones cholinergiques produisent de l'ACh qui se fixe aux récepteurs muscariniques des cellules endothéliales. Ces dernières vont alors produire du NO qui diffuse dans les muscles lisses vasculaires et entraîne la relaxation et la vasodilatation. Il a également été mis en évidence au niveau du colon une implication des neurones non cholinergiques par la libération de VIP et SP. De plus, les neurones afférents servent de senseur et régulent le flux sanguin par la production de substance neuroendocrines (28).

4.4.5. Contrôle de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale

Le rôle des neurones entériques dans le renforcement des fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI) a été démontré dans de nombreuses études, du fait de leur étroite proximité avec l'épithélium. En effet la muqueuse est très innervée par des neurones sous-muqueux et myentériques. Les axones qui innervent la muqueuse intestinale contiennent un large éventail de neuromédiateurs, tels que l'ACh, le VIP ou encore la SP. Ainsi les neurones entériques sont capables de réguler la perméabilité paracellulaire de la BEI.

L'implication du contrôle nerveux dans la régulation de la perméabilité intestinale a été montrée avec un modèle de coculture de CEI et de sous-muqueuse humaine contenant le plexus sous-muqueux. Une stimulation électrique de ce réseau neuronal entraîne une diminution de la perméabilité et une augmentation de l'expression de la protéine ZO-1 via une activation VIPergique (48).

Plusieurs neurotransmetteurs sont capables de réguler la perméabilité intestinale. Ainsi, il a été montré que l'ACh augmentait la perméabilité paracellulaire et transcellulaire, et que la SP

augmentait la perméabilité paracellulaire (45). De plus, une augmentation de la perméabilité induite par une séparation maternelle est associée à une augmentation de l'expression de ChAT (Choline acetyltransferase), correspondant à l'enzyme principale responsable de la synthèse d'acétylcholine, et peut être empêchée par un traitement avec des antagonistes muscariniques et nicotiques (49). A l'inverse, le VIP est reconnu comme un neuromédiateur clé impliqué dans le maintien des fonctions de la BEI, et diminue la perméabilité paracellulaire (50).

4.5. Implication du SNE dans la motilité gastro-intestinale et la survenue de troubles digestifs

Plusieurs équipes ont montré qu'il existait un lien entre l'axe corticotrope et le SNE (51) (52) (53). Dès 1987, il a été observé que le stress pouvait induire des altérations des fonctions gastro-intestinales, par une dysrégulation de l'axe cerveau-intestin et probablement en lien avec l'axe HPA (54). Si le lien entre troubles digestifs et stress est bien connu, la physiopathologie n'en est pour autant pas clairement élucidée.

En effet le contrôle de la motilité gastro-intestinale implique des mécanismes neurologiques et hormonaux. En présence d'un stimulus neurochimique, les dépolarisations des myocytes du tractus gastro-intestinal atteignent un seuil suffisant pour y déclencher un potentiel d'action et une contraction. Le contrôle neurologique intrinsèque est principalement médié par le plexus nerveux myentérique du SNE, localisé entre la couche musculaire circulaire et la couche musculaire longitudinale. Il est doté d'une relative indépendance, mais voit son fonctionnement modulé par le système nerveux extrinsèque (innervation parasympathique, principalement excitatrice ; innervation sympathique, principalement inhibitrice), lui-même sous l'influence des centres nerveux supérieurs (systèmes nerveux central). En effet, le système myentérique est doté de neurones afférents et efférents excitateurs (neurotransmetteurs : acétylcholine, substance P) ou inhibiteurs (neurotransmetteurs : oxyde nitrique, peptide vasoactif intestinal...) qui influencent la dépolarisation des myocytes.

Par ailleurs, de nombreux médiateurs hormonaux modulent également la motilité gastro-intestinale ; ils sont sécrétés par le tube digestif lui-même (gastrine, motiline, cholecystokinine, acétylcholine, NO...) ou à distance, modulant la réponse du myocyte en concert avec les mécanismes neuronaux (55).

4.5.1. Rôle de la CRH dans l'accélération du transit colique

Parmi les neurohormones de l'axe corticotrope, le rôle de la CRH a été démontré. La CRH a une structure peptidique très bien conservée parmi une grande variété d'espèces de mammifères. Elle agit sur deux récepteurs, CRF1 et CRF2, largement distribués dans les structures cérébrales y compris les régions spécifiques liées aux troubles anxieux et digestifs (53). Cette neurohormone est impliquée dans le déclenchement de la motilité intestinale, la contractilité, l'accélération du transit colique, et l'apparition de douleurs digestives (51). Ces effets sont liés au fait que la CRH agit à la fois au niveau central et au niveau périphérique, précisément au sein du SNE, dont les neurones myentériques coliques co-expriment les deux récepteurs CRF1 et CRF2 (56).

Parmi les pathologies gastro-intestinales, le syndrome de l'intestin irritable (SII), ou Irritable Bowel Syndrome (IBS) en anglais, est la pathologie la plus en relation avec notre problématique. Il a été rapporté chez l'homme que le stress induit des contractions du côlon et que ces réponses sont exagérées chez les patients atteints du SII (51) (Figure 12).

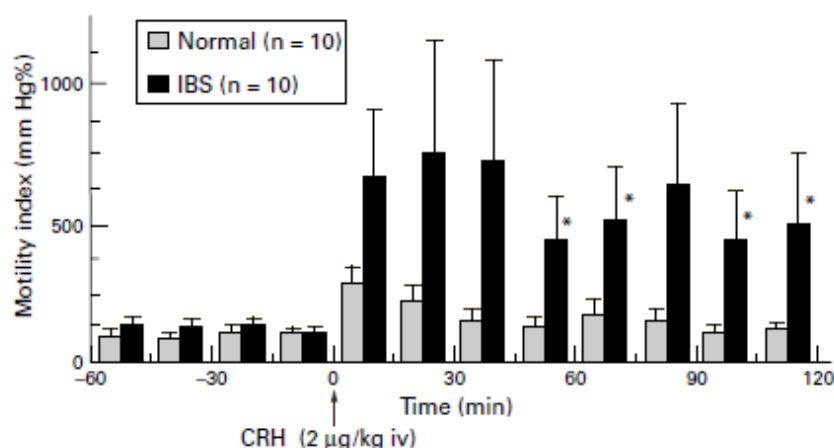


Figure 12 : Modification de la motilité intestinale du côlon distal induite par la CRH chez les patients IBS

IBS : Irritable Bowel Syndrome
La CRH a été administrée par voie intraveineuse (2µg/kg). Un enregistrement manométrique de la motilité colique montre une augmentation de la motilité chez les patients atteints du SII par rapport aux patients contrôles après stimulation par le CRH. La motilité intestinale est probablement modulée en partie par la CRH. (D'après Fukudo et al, 1998)

Le SII est une pathologie fonctionnelle du tube digestif comprenant plusieurs symptômes fonctionnels gastro-intestinaux, caractérisés par la classification de ROME IV, à savoir des douleurs abdominales récurrentes, des changements dans les habitudes intestinales (fréquence des selles), une alternance de diarrhée et/ou constipation, des ballonnements et une sensation de distension abdominale, et ce au moins 1 jour par semaine sur les trois derniers mois. Sa prévalence est élevée, elle est estimée à 11% de la population mondiale (57).

Le lien entre SII, axe corticotrope et troubles digestifs a été suggéré par l'équipe de Fukudo. Dans une étude menée sur 10 patients contrôles et 10 patients SII, ils observent, après injection de CRH humaine, que les patients SII présentent une sensibilité accrue à cette neurohormone avec une réponse hypophysaire plus forte (Figure 12). Ils montrent également que la CRH est impliquée dans le déclenchement de la motilité intestinale par activation de CRF1 (51). Ces résultats sont confirmés après l'administration d'agonistes spécifiques des récepteurs CRF1, mimant les troubles décrits par les patients souffrant du SII.

L'utilisation d'antagonistes des récepteurs CRF1 s'est montrée prometteuse dans les études de preuve de concept, induisant un blocage de la stimulation colique et de la défécation. Cependant, les études cliniques récentes suggèrent que cette thérapeutique n'est pas si concluante pour améliorer les troubles digestifs associés au SII (53) (58) (56).

Parallèlement, l'ensemble des données suggèrent l'importance du récepteur CRF2 comme piste pharmacologique pour prévenir les effets d'un stress aigu. Il joue un rôle dans la modulation de la réponse au stress induit par l'activation du récepteur CRF1, et ainsi dans

l'amélioration des fonctions coliques (59). L'administration d'urocortine 2, peptide apparenté au CRH spécifique de CRF2, prévient l'augmentation de la motricité colique, favorisée par une injection préalable de CRH (53). L'utilisation d'agonistes de CRF2 s'est cependant heurtée aux fonctions extra-digestives (vasculaires, obstétricales) de ce récepteur.

Ces données nous suggèrent qu'il existe probablement, hormis la CRH, d'autres acteurs de l'axe HPA, pouvant agir sur le tractus digestif, comme par exemple les glucocorticoïdes. À ce stade, alors que beaucoup de travaux décrivent les relations entre glucocorticoïdes et système nerveux central, peu d'études décrivent les relations entre glucocorticoïdes et système nerveux entérique.

PARTIE II :

Les Glucocorticoïdes

1. Biosynthèse et circulation

Les glucocorticoïdes sont dérivés du cholestérol. La fixation de l'ACTH au niveau du cortex surrénalien va permettre la synthèse de GCs au niveau de la zone fasciculo-réticulée. En se fixant sur ses récepteurs spécifiques, l'ACTH va permettre la phosphorylation d'enzymes hydrolysant les esters de cholestérol aboutissant après une cascade de réactions enzymatiques, à la synthèse de GCs. Le glucocorticoïde majoritaire est le cortisol chez l'homme et la corticostérone (CORT) chez le rongeur. La corticotérone ne diffère structuellement du cortisol que par un groupement hydroxyle (-OH) sur le carbone 17 du cortisol.

Comme tous les stéroïdes surrénaliens, les GCs ne sont pas stockés mais directement libérés dans le système circulatoire. Leur propriété lipophile leur permet alors de traverser aisément les membranes lipidiques, ainsi que la barrière hématoencéphalique afin de se lier à leurs récepteurs et ainsi agir sur les différentes régions cérébrales (11).

Au niveau circulatoire, les GCs circulent principalement sous forme liée à la transcortine ou CBG (pour Corticosteroid Binding Globulin). Le complexe GC-CBG représente environ 85% des GCs dans le système circulatoire, puis environ 10% est lié à l'albumine. Seulement 5 à 10% étant sous forme libre (60). La forme liée, inactive, constitue un « stock » de l'hormone qui devient active une fois libérée de ses protéines de transport, dont la CBG. Une fois libérés, les GCs peuvent se lier à leurs récepteurs : les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR ou NR3C2) ou récepteur de type 1 et aux glucocorticoïdes (GR ou NR3C1) ou récepteur le type 2. Les récepteurs MR n'étant pas spécifiques des glucocorticoïdes : ils se lient préférentiellement aux minéralocorticoïdes, principalement l'aldostérone.

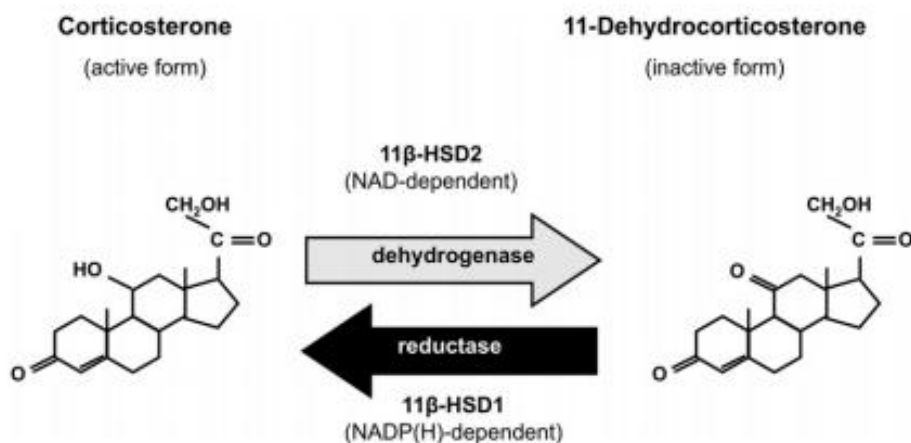


Figure 13 : Mécanisme d'activation et d'inactivation de la corticostérone

La 11β-HSD₁ active la 11-Dehydrocorticostérone en corticostérone, tandis que la 11β-HSD₂ inactive la corticostérone en 11-Dehydrocorticostérone (D'après Wyrwoll *et al*, 2011)

Au niveau tissulaire, la concentration des GCs est sous le contrôle de 2 isoenzymes : la 11-β-hydroxystéroïde déhydrogénase de type 1 et 2 (11-β-HSD₁ et 11-β-HSD₂ respectivement). Ces enzymes catalysent les réactions d'interconversion des hormones actives (cortisol et corticostérone) en leur forme inactive (cortisone et 11-déhydrocorticostérone, respectivement). La 11-β-HSD₁ possède une activité ambivalente : elle peut à la fois permettre

la déshydrogénation (actif → inactif) que la réduction (inactif → actif). Elle est fortement exprimée dans le cerveau et l'hypophyse. A l'inverse, la 11- β -HSD₂ possède exclusivement une activité déshydrogénase, c'est-à-dire qu'elle inactive le cortisol ou la corticostérone en cortisone ou en 11-déshydrocorticostérone) (61) (Figure 13). Elle est peu exprimée dans le cerveau à part dans le noyau du tractus solitaire. La 11- β -HSD₂ est aussi présente dans les tissus périphériques cibles de l'aldostérone (rein, côlon, glandes salivaires et sudoripares). Les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) ayant la même affinité pour les glucocorticoïdes que pour l'aldostérone, le rôle de cette enzyme est de protéger les MR d'une occupation prédominante des glucocorticoïdes (due à une plus forte concentration circulante) en les inactivant, créant ainsi une spécificité de ces récepteurs à l'aldostérone dans ses tissus cibles.

La demi-vie du cortisol est comprise entre 60 et 90 minutes chez l'Homme et celle de la corticostérone chez le rongeur est de 50 minutes. Une grande majorité du cortisol est réduite puis conjuguée dans les cellules cibles ainsi que dans le foie, avant d'être excrétée dans les urines. Une partie du cortisol n'est pas réduite et est donc directement éliminée dans les urines sous forme libre.

2. Les récepteurs aux glucocorticoïdes

L'action des GCs est possible grâce à la présence dans les cellules cibles de récepteurs de 2 types différents : le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR ou type 1) et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR ou type 2). Les deux récepteurs sont physiologiquement très proches mais présentent des affinités différentes pour les GCs. Le cortisol possède une affinité dix fois plus forte pour le récepteur MR ($K_d = 0,5\text{nM}$) que pour le récepteur GR ($K_d = 5\text{nM}$) (11). En conditions basales (hors épisodes de stress), le cortisol circulant agit donc principalement sur les récepteurs MR au niveau du SNC. C'est en condition de stress ou lors du pic circadien, lorsque les concentrations plasmatiques de cortisol augmentent très fortement que les récepteurs GR sont stimulés. C'est la raison pour laquelle, nous nous intéresserons plus particulièrement à GR dans cette thèse.

Ces deux récepteurs diffèrent aussi par leur distribution au sein de l'organisme. GR est ubiquitaire et sa densité varie en fonction des types cellulaires, alors que MR possède une distribution plus restreinte (rein, cœur, intestin, cerveau) (62). Au niveau du SNC, MR est localisé principalement dans les régions de l'hippocampe (HPC), l'amygdale, le septum et l'hypothalamus, alors que GR est présent dans toutes les structures avec une forte densité dans l'HPC au niveau de la corne d'Ammon 1 (aire CA1) ainsi que le gyrus denté, et le PVN de l'hypothalamus (11). Les deux types de récepteurs se retrouvent alors co-localisés dans les neurones des structures du système limbique et surtout dans l'HPC. En revanche, aucune étude dans la littérature ne décrit l'expression du récepteur GR au sein du SNE.

2.1. Le récepteur GR aux glucocorticoïdes

Le récepteur GR aux glucocorticoïdes appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il est codé chez l'Homme par le gène NR3C1, situé sur le chromosome 5, et sur le chromosome 18 chez la souris. Le gène est constitué de 10 exons, dont un est non codant. Ces exons codent pour une protéine chez l'homme de 778 acides aminés, d'une masse moléculaire de 90kDa. Son expression est ubiquitaire. Le GR agit comme un facteur de transcription hormono-dépendant, capable d'interagir avec l'ADN.

Il existe plusieurs isoformes de GR issus de l'épissage alternatif : GR α , GR β , GR γ . En effet, c'est l'épissage alternatif de l'exon 9 qui a conduit à deux isoformes principaux, d'une grande homologie structurale, GR α (formé de 777 acides aminés) et GR β (formé de 745 acides aminés). Ils ont des profils de distribution tissulaire et de régulation transcriptionnelle bien distincts chez l'homme. GR α , dont l'expression est ubiquitaire, avec une densité intracellulaire qui varie en fonction des organes, est lui-même soumis à des modifications post-traductionnelles et comporte ainsi plusieurs isoformes (8 sous-types de GR α : A, B, C1, C2, C3, D1, D2, D3). Il constitue le principal médiateur de l'action des glucocorticoïdes. En effet le GR α est actif tandis que le GR β est inactif puisqu'il est incapable de se lier au cortisol. Le GR β est d'ailleurs souvent impliqué dans les phénomènes de résistance aux corticoïdes. En effet, lors du traitement de certaines maladies chroniques par les GCs, il y a une surexpression du GR β qui conduit à une insensibilité au médicament car il exerce un effet dominant négatif sur l'activité transcriptionnelle de GR α , par la liaison à des cofacteurs ou une compétition au niveau des sites de fixation à l'ADN (63).

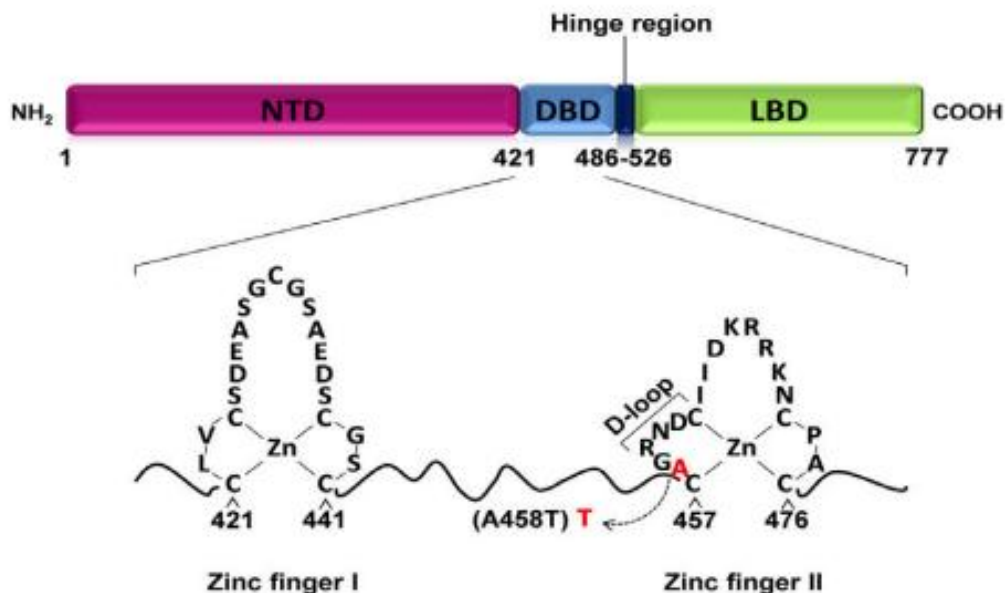


Figure 14: Structure générale du récepteur aux glucocorticoïdes

Le récepteur GR est constitué de trois domaines : un domaine N-terminal (NTD) responsable de l'activité transcriptionnelle, un domaine central (DBN) qui constitue le site de reconnaissance de l'élément de réponse au niveau de l'ADN, et un domaine C-terminal (LBD) qui permet la fixation du ligand. Le domaine DBN contient deux structures en doigts de zinc essentiels au fonctionnement du récepteur (D'après *Sofie Vandevyver, 2013*).

Au niveau structural, le GR α se différencie par trois parties distinctes (Figure 14) :

- Le **domaine de régulation transcriptionnelle** correspondant à la partie N-terminale (**NTD**). Il est composé de 410 acides aminés, il est le plus long des trois domaines. Il joue un rôle important dans l'induction de la transcription et confère au récepteur sa spécificité de liaison à l'ADN, notamment grâce à une région de transactivation majeure, AF-1 (activation function). L'AF-1 interagit avec les cofacteurs (SRC-1 : steroid receptor coactivator, TIF2 : transcriptional intermediary factor, CBP : CREB-Binding Protein) et les modulateurs de l'état de condensation de la chromatine indispensables à l'initiation de la transcription des gènes cibles.
- Le **domaine de liaison à l'ADN** correspondant à la partie intermédiaire (**DBD**). Cette partie du récepteur est hautement conservée chez tous les récepteurs aux stéroïdes. Cette région formée de 65 à 70 acides aminés, contient le site de reconnaissance des séquences d'ADN spécifiques constituant les éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE). Le DBD comprend deux structures en doigt de zinc, dont la première est impliquée dans la spécificité vis-à-vis du GRE et la seconde est responsable de l'interaction avec les séquences d'ADN et la dimérisation du récepteur.
- Le **domaine de liaison au ligand** (GCs) correspondant à la partie C-terminale (**LBD**). Il est constitué de 220 à 250 acides aminés. Cette région possède également un domaine d'activation de la transcription, AF-2. Il comprend des séquences importantes participant à la dimérisation du récepteur, à sa translocation dans le compartiment nucléaire, à sa fixation aux Hsp (heat shock protein) et à son interaction avec ses co-activateurs.

Comme évoqué précédemment, le GR α est l'acteur principal des voies d'action des GCs. Les récepteurs GR α persistent dans le compartiment cytoplasmique entre 20 à 30 heures. Cette durée est diminuée de moitié environ lorsqu'il est lié aux GCs. Le GR α sous forme non liée est localisé majoritairement dans le cytoplasme. Il passe également dans le noyau grâce à des canaux qui rendent possible son mouvement d'un compartiment cellulaire à l'autre. Dans le cytoplasme, le récepteur GR α est associé à diverses protéines dites chaperonnes : les protéines de choc thermique dont les Hsp90kDa, 70kDa, et 50kDa et une immunophiline FKBP-59 (protéines aidant l'assemblage d'autres protéines), et une cyclophiline CYP40. Les Hsp sont indispensables pour maintenir le GR α sous forme inactive en masquant deux sites de localisation nucléaire (NLS ou nuclear localization sequence) : NLS1 et NLS2 qui se trouvent respectivement proches du DBD et dans le LBD du GR α . Les HSP sont aussi nécessaires pour la conformation de haute affinité du GR α et régulent sa fixation à son ligand. L'immunophiline, quant à elle, serait impliquée dans la stabilité et la régulation de la signalisation du GR α afin de prévenir une activation non spécifique de ce récepteur (63) (64).

2.2. Le récepteur MR aux minéralocorticoïdes

Le récepteur MR aux minéralocorticoïdes, tout comme le récepteur GR, appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires, famille des récepteurs stéroïdes, liant l'aldostérone. Il est aussi localisé au niveau cytoplasmique. Il est codé par le gène NR3C2, situé sur le chromosome 4 chez l'Homme, sur le chromosome 19 chez le rat et sur le chromosome 8 chez la souris. C'est un grand gène composé de 10 exons, les deux premiers exons n'étant pas codants. Les exons codent une protéine de 984 acides aminés d'une masse moléculaire de 107kDa.

Sur le plan structural, le récepteur MR aux minéralocorticoïdes possède la structure classique des récepteurs nucléaires, de façon similaire au récepteur GR, à savoir :

- Un grand domaine N-terminal, contenant les domaines de régulation de l'activité transcriptionnelle (**NTD**)
- Une région centrale qui correspond au domaine de liaison à l'ADN (**DBN**). Le DBN est constitué par deux doigts de zinc classique de liaison à l'ADN
- Une région C-terminale, contenant le domaine de liaison du ligand hormonal (**LBD**)

Ces différents domaines vont permettre au MR d'agir comme un facteur de transcription dépendant des ligands ; tout d'abord par sa liaison à son ligand, puis par sa liaison au gène cible et enfin par sa liaison aux corégulateurs de son activité. Son mécanisme d'action est identique au récepteur GR. Les gènes activés sont néanmoins différents, les fonctions seront donc différentes également (65) (66).

- Parmi les gènes activés par le récepteur MR, il y a notamment ceux impliqués dans la réabsorption du sodium au niveau du tube collecteur distal du rein. Le MR, complexé à l'aldostérone, active l'expression du gène codant pour certaines sous unités du canal épithélial au sodium (ENaC ou epithelial sodium channel) et de la pompe sodium potassium (Na/K ATPase) qui vont permettre la réabsorption du sodium de l'urine vers le plasma. L'activité des protéines ENaC est également régulée par une kinase spécifique, la SGK1, dont le gène est induit par le MR et l'aldostérone.
- Au niveau des cellules endothéliales des gros vaisseaux, le MR active l'expression de gènes participant à la régulation de la pression artérielle. Le MR aurait une action sur l'expression de gènes codant pour les protéines qui composent la matrice extracellulaire tels que certains collagènes.

3. Mécanisme d'action des glucocorticoïdes

L'action des GCs par leurs récepteurs peut être divisée en deux catégories : l'**action non-génomique** et l'**action génomique**.

3.1.Mécanisme d'action non-génomique

Les effets non-génomiques, moins bien décrits et plus récemment identifiés, se produisent par définition sans modification de l'expression génique et surviennent plus rapidement que les effets génomiques. Les récepteurs MR seraient les seuls capables d'une action rapide non-génomique récemment identifiée. Cette action est possible par la présence de MR dans la membrane plasmique (11). Contrairement à leurs homologues cytoplasmiques, ces récepteurs MR seraient membranaires et auraient une affinité plus faible pour les GCs (67). Leur affinité serait comparable à celle des GR ce qui laisse supposer que leur activation serait dépendante de fortes concentrations en GCs. Leur présence membranaire permet à ces récepteurs d'être les acteurs des réponses rapides non-génomiques de l'organisme face à une augmentation des concentrations de GCs. En effet, les effets non génomiques s'observent essentiellement avec de fortes doses, et vont se traduire par un effet de stabilisation de membrane. Ainsi, ils peuvent réduire la libération d'enzymes lysosomiales et de granules préformés contenant en particulier des médiateurs de l'inflammation (histamine, sérotonine). D'autre part, les premières études ont démontré qu'ils pourraient agir en augmentant la neurotransmission glutamatergique et réguler le trafic de surface des récepteurs AMPA (augmentation rapide, de l'ordre de la minute) (11) (67), facilitant ainsi la transmission et la plasticité synaptique dans l'HPC.

De récentes études démontrent également un rôle important des récepteurs MR dans la survie neuronale (68) et la neurogénèse (69).

Par ailleurs, les glucocorticoïdes ont notamment un effet sur la fluidité membranaire en s'intercalant dans la bicouche lipidique membranaire bloquant ainsi les échanges ioniques, notamment la régulation des échanges membranaires de calcium et sodium et des flux d'AMP cyclique. Ces effets expliquent en partie l'inhibition de l'activité cellulaire observée avec les corticoïdes, en particulier pour les cellules de l'immunité comme les lymphocytes. Ils ont également un effet post-transcriptionnel sur les ARNm (en diminuant leur stabilité) et les protéines.

3.2.Mécanisme d'action génomique

Le mécanisme d'action classiquement connu pour les récepteurs aux GCs est surtout de moduler l'expression de gènes cibles après la fixation de leur ligand par une action génomique. Structuellement, ces récepteurs aux corticostéroïdes appartiennent, comme vu précédemment, à la superfamille des récepteurs nucléaires et agissent comme facteurs de transcription qui régulent l'expression de centaines à plusieurs milliers de gènes en fonction du type cellulaire (70).

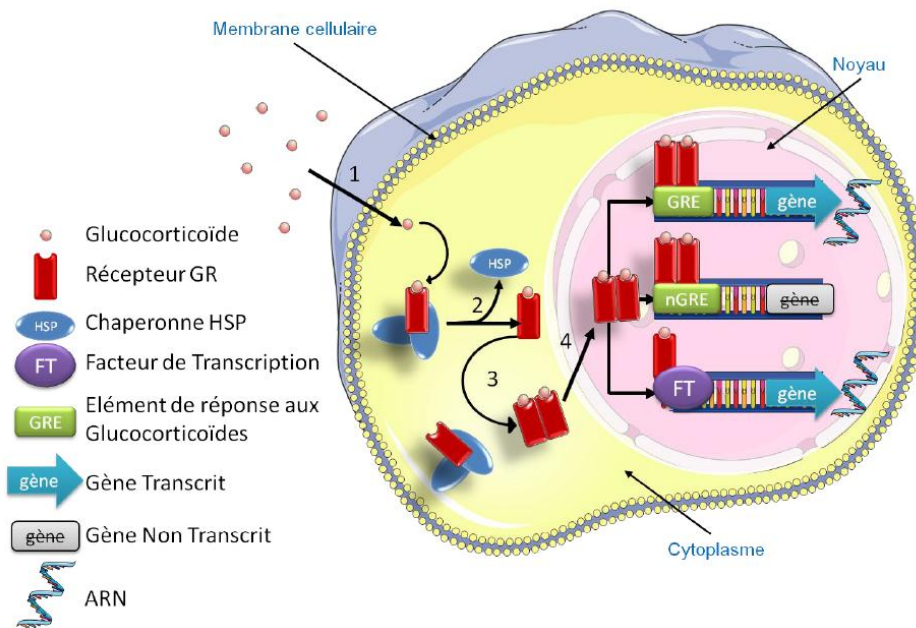


Figure 15 : Mécanisme d'action génomique des récepteurs aux glucocorticoïdes

Les GCs entrent dans la cellule et se fixent à leurs récepteurs (1). Celui-ci se sépare des chaperonnes (2) et se dimérise (3) pour entrer dans le noyau (4) afin d'agir sur les régions cibles du génome, par l'activation ou la répression de l'expression de gènes cibles. Une voie monomérique existe également grâce à la fixation du récepteur GR à un facteur de transcription (D'après *Thomas Prévôt, 2015*)

A l'état inactif, ces récepteurs sont localisés dans le cytoplasme, séquestrés dans un complexe multiprotéique comprenant des protéines de choc thermique telles que Hsp90, Hsp70 ou encore Hsp50, et des immunophilines (FKBP-59). Les GCs libres, liposolubles, diffusent librement à travers la membrane cytoplasmique pour venir à la rencontre des récepteurs présents à l'état inactif. La liaison ligand/récepteur/chaperonnes induit une modification de conformation, accompagnée d'une hyperphosphorylation du récepteur (activité kinase portée par sa région de transactivation AF-1) qui permet la dissociation du récepteur de ses protéines chaperonnes. La modification de conformation du récepteur permet ensuite l'exposition du NLS en surface du DBD (initialement masqué). Le complexe ligand/récepteur va alors pouvoir se dimériser (homodimérisation GR/GR ou MR/MR, ou hétérodimérisation GR/MR). Le récepteur dimérisé peut alors être transloqué au noyau avec l'aide de protéines recrutées par la libération de signaux spécifiques. Une fois dans le noyau, les récepteurs vont pouvoir se fixer à l'ADN sur une séquence spécifique qui reconnaît les récepteurs activés : les HRE ou Hormone Response Element. Il existe deux types de HRE dans le cas des récepteurs aux GCs : les GRE (Glucocorticoid Response Element) et les MRE (Mineralocorticoid Response Element). La fixation entraîne un changement de conformation du complexe, qui devient alors capable d'interagir avec deux structures en « doigt de zinc » de l'ADN. Ces éléments de réponse se situent sur le promoteur du gène cible. Dans le cas des GRE, on peut en distinguer 2 types : les GRE « positifs » qui activent la transcription des gènes cibles, et les GRE « négatifs » qui répriment leur transcription. Dans le cas où la transcription est activée, des ARN messagers sont produits puis traduits en protéines responsables de l'activité physiologique des GCs, notamment des protéines pro-inflammatoires comme la lipocortine, l'IL-10... (70) (Figure 15).

Cependant, cette voie d'action des GCs ne serait pas la seule à agir sur la transcription de gène cible. En effet, une voie d'action ne faisant pas intervenir les HRE serait également présente, impliquant la mise en jeu d'interactions protéine-protéine à l'état de monomère. Les récepteurs peuvent alors interagir avec d'autres facteurs de transcription comme AP-1 (activator protein-1), CRE (cAMP response element), NF- κ B, NF-IL6 ou encore c-Fos/Jun (71)(72). Ainsi, les récepteurs GR et MR peuvent réguler la transcription de gènes ne possédant pas de HRE. Le complexe récepteur-facteur de transcription (interaction protéine-protéine) se lie à l'ADN au niveau d'une séquence de promoteur reconnaissant le facteur de transcription. Le récepteur interfère avec l'action du facteur de transcription en activant de façon synergique ou en réprimant la transcription de gènes cibles. En agissant sur ces facteurs de transcription, les glucocorticoïdes contrôlent l'expression de multiples gènes de l'inflammation comme ceux de nombreuses cytokines. L'interaction entre le complexe hormone récepteur et ces facteurs de transcription constitue le principal mécanisme responsable des effets anti-inflammatoires (inhibition de la synthèse des protéines pro-inflammatoires, notamment les cytokines inflammatoires) et immunosuppresseur des GCs.

Ainsi, les glucocorticoïdes ont une large fenêtre temporelle d'action, de la milliseconde à quelques minutes pour leur action membranaire ou non-génomique jusqu'à plusieurs heures voire plusieurs jours pour leur action génomique. En effet, la translocation nucléaire dure 10 à 30 minutes, alors que la transcription et la traduction nécessitent environ 120 minutes. La différence de distribution et d'affinité des récepteurs ainsi que la présence de co-facteurs et d'autres facteurs de transcription permet une action spécifique dans certaines cellules et régions du cerveau (73).

De par leur action génomique, les GCs parviennent à induire ou inhiber la synthèse de nombreuses protéines qui sont impliquées dans de nombreuses fonctions comme l'architecture cellulaire, le métabolisme cellulaire, la transmission synaptique ou encore l'immunité. Ces protéines peuvent être des facteurs de transcription, des enzymes, des récepteurs, des facteurs de croissance, des hormones ou encore des neurotransmetteurs.

Cette double réponse, à la fois rapide et plus lente, permet une adaptation optimale face à un stress en impliquant différentes structures cérébrales comme le cortex préfrontal, qui en augmentant le vigilance, l'éveil émotionnel et l'attention, permet un traitement de l'information et une prise de décision optimisée (73).

4. Propriétés pharmacologiques des glucocorticoïdes

4.1. Actions métaboliques

4.1.1. Métabolisme glucidique

Les glucocorticoïdes permettent la protection des fonctions glucodépendantes du système nerveux central. Ainsi la formation du glucose est stimulée, tandis que son utilisation périphérique dans les tissus adipeux, la peau, et les fibroblastes est diminuée, ce qui permet son stockage sous forme de glycogène. En effet les GCs induisent une élévation de la

glycémie, d'une part, par la stimulation de la synthèse du glucagon et donc la stimulation de la glycogénolyse et d'autre part, ils réduisent le nombre et l'activité des cellules β pancréatique (74).

De plus les glucocorticoïdes facilitent la néoglucogenèse hépatique à partir des acides aminés ainsi qu'à partir du lactate et des lipides. Deux mécanismes apparaissent avec en premier lieu une facilitation de l'entrée des acides aminés dans les cellules hépatiques et de leur transformation en glucose en stimulant l'activité et la synthèse des transaminases hépatiques. Le second mécanisme est la stimulation de la synthèse d'enzymes nécessaires pour la néoglucogenèse.

L'exposition prolongée à de fortes doses de glucocorticoïdes provoque l'apparition d'une glycémie élevée à jeun, une résistance à l'insuline augmentée, une tolérance au glucose diminuée et une glycosurie. Il s'agit d'un diabète dit cortisonique (peu sensible à l'insuline) (75).

Mais actuellement, le mécanisme par lequel les glucocorticoïdes inhibent l'utilisation périphérique du glucose dans les tissus (tissu adipeux, peau) n'est pas bien connu. Ils s'opposent à l'action de l'insuline sur les tissus périphériques par un mécanisme complexe, à plusieurs niveaux : réduction de l'activité du récepteur de l'insuline, altération des post-récepteurs et accélération de la dégradation de l'insuline.

4.1.2. Métabolisme protidique

L'action catabolique protéique et l'activité anabolique glucidique sont étroitement liées. Les acides aminés circulants, mobilisés à partir de différents tissus, sont les substrats des enzymes impliqués dans la production de glucose et de glycogène par le mécanisme de néoglucogenèse.

Dans le muscle, la peau, les tissus adipeux, conjonctifs et osseux, l'incorporation du glucose et des acides aminés est diminuée. Ceci s'accompagne d'une accélération de la dégradation de l'ARN et des protéines, et de la libération des acides aminés de différents tissus, notamment du muscle. Le reflet clinique, en cas d'hypercorticisme, en est la réduction de la masse musculaire, entraînant une amyotrophie musculaire qui peut être importante, l'atrophie des tissus lymphoïdes et celle du tissu de soutien de l'os, aggravant l'ostéoporose (76).

4.1.3. Métabolisme lipidique

Les glucocorticoïdes ont deux effets principaux, la redistribution de la graisse d'une part. Une accumulation de graisse au niveau de la face et du dos, caractéristique du « faciès Cushingoid » est un signe caractéristique qui a bien été identifié, autrement appelé « bosse de bison ». Les glucocorticoïdes ont également un effet permissif des agents lipolytiques, conduisant à la libération des triglycérides à partir des tissus adipeux et du foie. Cette lipolyse va se traduire par une libération d'acides gras et de glycérol, pouvant induire une hyperlipidémie modérée. Le glycérol peut alors être utilisé comme substrat au cours de la

néoglucogénèse hépatique. Quant aux acides gras libres, ils inhibent l'utilisation du glucose par les tissus périphériques et constituent une source d'énergie (77).

Les glucocorticoïdes inhibent la synthèse des longues chaînes d'acides gras au niveau des adipocytes. De plus, ils favorisent l'action de différentes hormones lipolytiques telles que les catécholamines, le glucagon et l'hormone de croissance. Mais le mécanisme de l'action permissive des glucocorticoïdes n'est pas encore connu.

4.1.4. Métabolisme hydro-électrolytique

Les minéralocorticoïdes agissent sur le tube distal et collecteur du rein où ils régulent des canaux et pompes ioniques tels que le canal sodique ENaC et la pompe Na/K ATPase, permettant la réabsorption du sodium et l'excrétion de potassium. Le cortisol, à forte dose, mime les effets de l'aldostérone, induisant à terme une alcalose hypokaliémique. Cette action des GCs sur l'équilibre hydroélectrolytique explique les effets secondaires au niveau cardiovasculaire de la corticothérapie à long terme (hypertension volume-dépendante), et d'autant plus, les répercussions sévères de l'hypocorticisme sur le système vasculaire avec une réduction de la volémie, une augmentation de la viscosité du sang, ainsi qu'une hypotension (78).

4.1.5. Métabolisme phospho-calcique

De par leur action anti vitamine D, les GCs diminuent l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Au niveau rénal, ils favorisent l'élimination urinaire de calcium et de phosphore entraînant un bilan phosphocalcique négatif. L'hypercalciurie entraîne le risque de formation de lithiase rénale.

4.2. Activité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes diminuent le tissu lymphoïde ainsi que le nombre de lymphocytes et le nombre des éosinophiles. De plus, ils diminuent le nombre de plasmocytes et la production d'anticorps. En effet, ils agissent sur les différentes étapes cellulaires : inhibition de la reconnaissance antigénique (diminution de l'expression des molécules HLA inhibant ainsi la présentation de l'antigène par les lymphocytes T), des mécanismes d'amplification de la phase effective de la réponse immunitaire (multiplication des lymphocytes par inhibition de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires activées : IL-1, IL-6, IL-2, INF et TNF) (79).

Ces effets sont recherchés dans le cadre de pathologies où le contrôle de la réponse immunitaire est prioritaire. Les glucocorticoïdes de synthèse sont ici utilisés pour leur effet immunosuppresseur. En effet, sans modifier les réactions antigène-anticorps elles-mêmes, les glucocorticoïdes diminuent les réactions de rejet des organes greffés, par leur effet anti-inflammatoire et leucocytaire, ainsi que les symptômes de diverses maladies à composante immunologique.

4.3. Activité anti-immuno-allergique des glucocorticoïdes

Les réactions allergiques sont déclenchées par la fixation des immunoglobulines E (IgE) activées par l'allergène sur des récepteurs spécifiques exprimés par les mastocytes et les basophiles. Cette fixation entraîne la scission du phosphatidylinositol diphosphate intramembranaire, ce qui active la dégranulation cellulaire, libérant ainsi les médiateurs de l'allergie que sont l'histamine, la sérotonine ou encore les leucotriènes. Les corticoïdes, en inhibant cette scission, bloquent le relargage des médiateurs. Ainsi l'IgE fixée sur le polynucléaire basophile ou mastocyte, devient incapable d'activer ce dernier.

L'effet anti-allergique des corticoïdes est puissant et très rapide et s'exerce alors même que sont présents l'allergène et les IgE spécifiques, à tel point que leur administration à des fortes doses par voie intraveineuse est incontestable pour la prise en charge des chocs anaphylactiques (79).

5. Régulation des glucocorticoïdes : rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope

Comme nous l'avons décrit précédemment, la sécrétion des glucocorticoïdes dépend principalement de l'hypothalamus *via* la libération de la CRH et de l'AVP mais aussi de l'hypophyse antérieure *via* l'ACTH. Il existe cependant d'autres facteurs de stimulation de la sécrétion des GCs. Une variété importante de neurotransmetteurs comme le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), le PHI (Peptide Histidine Isoleucine), la GRP (Gastrin Releasing Peptide), le NPY (Neuropeptide Y) et la sérotonine stimulent la production d'ACTH et donc de GCs (11).

L'ACTH serait responsable des réponses de grande amplitude des GCs suite à un stimulus intense (comme un stress aigu) alors que l'innervation surrénalienne (splanchnique) contrôlerait cette sécrétion au niveau basal en modulant la sensibilité surrénalienne à l'ACTH.

Les GCs sont capables de contrôler leur propre sécrétion en exerçant un rétrocontrôle négatif sur la production de CRH et d'ACTH. Ce rétrocontrôle a pour but de limiter la durée d'exposition des tissus cibles aux GCs afin d'en diminuer les effets délétères. Les GCs agissent sur le PVN de l'hypothalamus et certaines structures extrahypothalamiques (formation réticulée mésencéphalique, septum, hippocampe, amygdale, thalamus) ainsi que sur l'hypophyse antérieure. Ces structures possèdent des récepteurs aux GCs dont l'activation module la sécrétion de CRH et inhibe la libération d'ACTH.

Le rétrocontrôle négatif peut être de trois types : rapide, intermédiaire ou tardif. Les rétrocontrôles rapides et intermédiaires interviennent lors d'une hypercortisolémie modérée. Le rétrocontrôle rapide inhibe la libération d'ACTH *via* la CRH. Le rétrocontrôle intermédiaire inhibe la libération d'ACTH sans effet sur sa production. La synthèse et la libération de CRH sont, elles, affectées par les glucocorticoïdes dans ce cas-là. Le rétrocontrôle tardif (3h à plusieurs jours) intervient lors d'une hypercortisolémie importante et prolongée, lors du syndrome de Cushing ou encore lors d'un traitement prolongé par des corticoïdes. L'activation des récepteurs GR, mais aussi des récepteurs MR, induit alors une

inhibition des mécanismes de synthèse du CRH, de l'AVP, et de l'ACTH ainsi qu'une inhibition de la synthèse de leurs récepteurs, par rétrocontrôle négatif.

6. Implication du récepteur GR dans les troubles digestifs

Les altérations de la fonction motrice gastro-intestinale font partie de la réponse viscérale au stress. L'inhibition de la vidange gastrique et la stimulation de la fonction motrice du côlon sont les altérations les plus fréquentes. L'équipe de *Fukuda et al.* a notamment mis en évidence l'implication de la CRH dans le déclenchement de la motilité intestinale, la contractilité, l'accélération du transit colique, et l'apparition de douleurs digestives (51) (Partie I. 4.5.1). En revanche, leur étude permet de conclure que cette neurohormone n'est probablement pas la seule actrice de l'axe HPA pouvant agir sur le tractus digestif.

Il a été reconnu que le stress psychologique accentue les maladies intestinales inflammatoires (MII) (75)(76). En effet, les études sur modèles animaux et chez l'homme montrent que les traumatismes ou les abus subis au cours de la petite enfance, associés à une forme de stress psychosocial, entraîne une prévalence plus élevée de troubles gastro-intestinaux à l'âge adulte. Plusieurs études rapportent également que la cortisolémie de personnes souffrant de troubles digestifs est plus élevée que celle des sujets sains, ceci indépendamment de tout problème surrénalien. Les études sur modèle animaux montrent notamment que le stress entraîne une modification phénotypique des neurones du SNE, laisser suggérer que les hormones du stress pourraient de ce fait agir sur le tractus digestif à travers le SNE.

Par ailleurs des changements épigénétiques transitoires ou durables dans le gène du récepteur GR aux GCs, mais aussi ceux le régulant, ont été mis en évidence chez les IBS (Intestinal Bowel Syndrom). Ces observations suggèrent un rôle du récepteur GR dans la survenue de troubles digestifs.

En effet les modifications génétiques sont relativement fréquentes. Cependant la connaissance de ces polymorphismes sur l'axe HPA est très limitée. Une étude génétique réalisée par *Decorti et al.*, a permis d'évaluer l'incidence de ces polymorphismes chez 57 jeunes patients atteints de MICI (82). Les polymorphismes étudiés dans le gène du récepteur GR étaient les suivants: le BcII dans l'intron 2, le N363S dans l'exon 2 associé à une sensibilité accrue aux GCs, et le polymorphisme ER22/23EK dans l'exon 2 qui lui est associé à une forme partielle de résistance aux GCs. Le polymorphisme BcII a été associé à une sensibilité accrue aux GCs pour les patients atteints d'une colite ulcéreuse, contrairement aux patients atteints d'une maladie de Crohn.

Par ailleurs des travaux ont été réalisés sur la protéine FKBP5 qui agit comme régulateur du récepteur aux glucocorticoïdes et de ses divers cofacteurs. Le résultat final de l'activation du récepteur GR est la transcription de nombreux gènes. La protéine FKBP5 inhibe le récepteur en diminuant son affinité pour le cortisol. FKBP5 est ainsi l'élément clé d'une boucle de régulation rétroactive qui diminue l'activité du récepteur GR aux GCs lorsque la concentration du cortisol est élevée. Cette boucle de régulation correspond au retour à la normale après activation du récepteur lors d'une situation de stress. Il a été montré que le gène correspondant à la protéine FKBP5 présente des polymorphismes, qui provoquent une induction accrue par le cortisol du récepteur GR et une moindre efficacité dans la boucle de régulation négative (83).

Aujourd'hui, l'expression du récepteur GR au sein du SNC est maintenant bien caractérisée (18)(19)(18), de même que son expression au niveau du SNP (84). Cependant, en ce qui concerne l'expression du récepteur GR au niveau intestinal, elle n'a été caractérisée qu'au niveau de la muqueuse intestinale. Plusieurs contingents cellulaires de la muqueuse intestinale expriment le récepteur GR, notamment les cellules épithéliales avec une implication dans la perméabilité intestinale (85), mais aussi les cellules immunitaires avec un rôle anti-inflammatoire et immunorégulateur (86).

A ce jour, l'expression du récepteur GR au niveau des neurones du système nerveux entérique n'a été reconnue qu'au niveau gastrique et non au niveau intestinal.

En revanche, il est reconnu que le tractus gastro-intestinal est enrichi en récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB1R) dans le SNE et dans les cellules non neuronales de la muqueuse intestinale, notamment les cellules entéroendocrines, les cellules immunitaires et les entérocytes. Il a été montré que CB1R module, par des voies neuronales et non neuronales, la motilité du tractus gastro-intestinal, mais aussi la sécrétion d'acides gastriques, de fluides, de neurotransmetteurs, ainsi que la perméabilité de l'épithélium intestinal (87).

7. Les antagonistes du récepteur GR aux glucocorticoïdes

L'un des moyens de vérifier l'implication des GCs dans les effets du stress sur la survenue de troubles digestifs est d'utiliser un moyen pharmacologique par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur GR.

7.1. Antagonistes non sélectifs du récepteur GR aux glucocorticoïdes

7.1.1. Mifépristone ou RU486

La mifépristone ou RU486 est un analogue de synthèse de stéroïde (Figure 15). Il exerce une puissante activité antiprogestative et à un moindre degré antiandrogénique et antiglucocorticoïde.

Son absorption digestive après une administration orale est rapide et le taux de liaison aux protéines plasmatiques est de 98%. Il est métabolisé au niveau hépatique (déméthylation et hydroxylation) et est éliminé par voie fécale majoritairement (88). Son métabolite déméthylé serait responsable de son effet antiglucocorticoïde (89).

Des études sur modèles murins ont montré que le RU486 est capable d'atténuer les effets du stress sur les fonctions digestives, en raison de sa forte affinité pour le récepteur GR aux glucocorticoïdes ($K_i = 0,29$) (90). L'équipe de Zheng *et al.* a montré que l'hyperalgésie viscérale chronique induite par le stress, reproduite chez des rats traités par des injections en série de corticostéroïdes ou par un stress WAS (Water Avoidance Stress) quotidien d'une durée de 1h sur une période de 10 jours, peut être prévenue par administration préalable du RU486, antagoniste de GR. Dans leur étude, suite au stress induit l'équipe de Zheng mettait en évidence une augmentation de la perméabilité intestinale paracellulaire *in vivo* sur certains segments spécifiques, particulièrement dans le côlon distal, associée à une diminution

d'expression des protéines des jonctions serrées. Ces résultats étaient reproductibles sur une série d'injections de corticostérone, et corrigés par l'administration du RU486. Ce dernier corrige également la diminution du niveau d'expression de protéines de jonctions serrées et rétablit le niveau d'expression du récepteur GR dans le côlon des rats mâles stressés (91).

Plus récemment, l'équipe d'Arrango-Lievano a travaillé sur un même modèle de souris subissant 10 jours de stress aléatoires. Ils ont observé une diminution du diamètre, de la longueur et de la densité des épines dendritiques chez les souris stressées (20). En parallèle, l'équipe de Lerch s'est intéressée aux effets du stress sur la plasticité neuronale et la croissance axonale au niveau du SNP. Leur modèle de stress était un protocole de contrainte, où la souris est placée dans un tube pendant 1h. Ils observaient que le stress augmente la pousse axonale, le nombre et la longueur des dendrites et la densité d'axones. Ces effets étaient bloqués par le RU486 (84). En revanche, ces différentes observations sont difficiles à mettre en perspective car elles ne s'intéressent pas toujours aux mêmes marqueurs et montrent parfois des résultats contradictoires.

Malgré que le RU486 soit l'antagoniste le plus utilisé jusqu'à présent pour contrer les effets des GCs, il présente le défaut majeur d'être non sélectif.

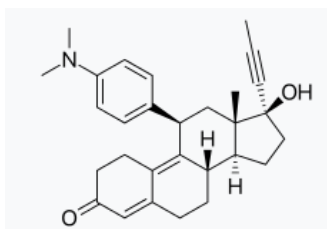


Figure 16 : Structure moléculaire du RU486 (Splitz et Bardin, 1993)

7.2. Antagonistes sélectifs du récepteur GR aux glucocorticoïdes

Récemment, de nouvelles molécules ont été employées, que sont les modulateurs sélectifs des récepteurs des glucocorticoïdes. En effet l'agonisme et l'antagonisme du récepteur GR aux glucocorticoïdes peuvent tous les deux être bénéfiques dans certaines pathologies. Cependant, puisque l'expression du récepteur est large et qu'il est impliqué dans divers processus, les bénéfices s'accompagnent souvent d'effets adverses. Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux glucocorticoïdes sont des ligands qui modifient la conformation spatiale du récepteur, ce qui ne permet l'activation que de certaines voies de signalisation en aval, associant des propriétés antagonistes et agonistes. Cette propriété est permise par le recrutement de corégulateurs, ayant une action soit activatrice soit inhibitrice. Il est toutefois important de noter, que l'expression de ces corégulateurs est dépendante du type de cellule, tout comme les domaines GRE, situés en amont du gène cible.

En outre, les composés peuvent différer dans les modes de signalisation et dans leurs interactions avec d'autres facteurs de transcription qui lient l'ADN, à proximité des GRE. A titre d'exemple, le CORT108297 a une activité anti-inflammatoire transrépressive substantielle tandis que le CORT118335 est beaucoup moins puissant à cet égard.

Les modulateurs sélectifs du récepteur GR (SGRM) conviennent dans de nombreux modèles de maladies et sont également parfois plus efficaces que l'antagoniste classique, à savoir la mifépristone. Comme le récepteur GR est exprimé dans un grand nombre de tissus, le potentiel d'utilisation des SGRM semble un avantage supplémentaire, d'autant plus qu'ils sont spécifiques du récepteur GR, et n'ont pas ou peu d'affinité pour les récepteurs aux androgènes et à la progestérone.

En revanche, bien que l'utilisation des SGRM soit prometteuse, il est très difficile de prédire quels tissus et processus seront affectés par ces composés. Par exemple, même si nous connaissons les coactivateurs qui seront recrutés par un complexe SGRM-GR, dans la plupart des cas, on ignore quelles voies de signalisation sont impliquées dans le processus de transcription engagé. Etant donné qu'il existe un grand nombre de coactivateurs, et que leur action est hautement spécifique du gène et du type de tissu, de telles analyses sont très longues. Une façon de mieux prédire l'efficacité de certains SGRM est d'avoir une vue d'ensemble des coactivateurs qui sont exprimés avec le récepteur GR dans des tissus spécifiques, de façon à distinguer les effets souhaités, des effets indésirables.

7.2.1. CORT108297

Le CORT108297 (Figure 16) a récemment été identifié comme un modulateur spécifique du récepteur GR (SGRM) (92), avec une forte affinité ($K_i=0,27\text{nM}$) et un ciblage sélectif du cerveau (90). Contrairement au RU486, il n'agit ni sur le récepteur à la progestérone (PR), ni sur celui aux androgènes (ER).

Le CORT108297 peut agir comme agoniste ou antagoniste du récepteur GR, et peut ainsi être utilisé pour séparer les effets bénéfiques des effets indésirables des glucocorticoïdes. En effet le blocage de certains effets à médiation GR peut contrecarrer l'efficacité thérapeutique potentielle d'une molécule. C'est le cas des antagonistes de GR, comme le RU486, qui interfèrent notamment avec le mécanisme de rétrocontrôle des glucocorticoïdes et entraînent une augmentation des niveaux de corticostérone.

Cette propriété s'explique par un profil d'interaction unique entre le récepteur GR et les co-régulateurs, molécules effectrices en aval, permis par le CORT108297. La molécule décrit notamment un profil d'interaction unique avec le co-régulateur SRC-1A, qui a un rôle dans l'activité transcriptionnelle du récepteur (93).

L'interaction du CORT108297 avec le co-régulateur SRC-1A lui confère une activité agoniste partielle pour l'inhibition de l'expression du gène de l'hormone hypothalamique, la CRH, induite par le stress. La molécule présente également une activité antagoniste sur la réduction de la neurogenèse de l'hippocampe médiée par GR après une exposition chronique à la corticostérone (93). Le CORT108297 montre notamment une capacité agoniste sur l'expression du BDNF, et permet ainsi de limiter certaines conséquences du stress. L'équipe de *Cotella et al* a mis en évidence son effet intéressant dans la prévention des effets du stress au cours de l'adolescence par modulation du signal induit par l'activation du récepteur GR. Une réduction de l'immobilité au cours du test de la nage forcée, une baisse de la sécrétion de corticostérone et une consolidation de la mémoire ont notamment été décrites (94)(95)(93).

Les voies de signalisation, notamment celle impliquant le co-régulateur SRC-1A, et les effets périphériques de CORT108297 restent encore à déterminer.

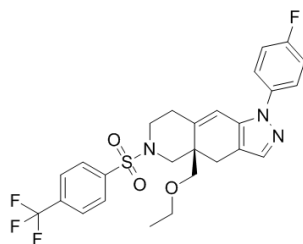


Figure 17 : Structure moléculaire du CORT108297 (Pineau et al. 2016)

Plusieurs études expérimentales ont été réalisées, notamment sur l'action métabolique du CORT108297. Des études comportementales et sur la neurogenèse ont également été réalisées dans le cadre d'un protocole de stress chronique, ou sur une application clinique, à savoir la maladie d'Alzheimer. Afin d'illustrer les utilisations potentielles du CORT108297, le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus dans différentes études :

Références	Dose	Solvant(s)	Ki	Objectifs	Effets observés
(96)	3,5mg/souris/jour pendant 4 jours (SC)	3 w/v CMC, 0,1% Tween 20 dans 0,9% de NaCl	0,9nM	Tester le CORT108297, un antagoniste sélectif du récepteur GR, chez des souris Wobber mutants atteints de sclérose latérale amyotrophique (SLA) avec une hyperactivité de l'axe HPA et des anomalies de l'hippocampe	Le CORT108297 permet une régulation et une normalisation des progéniteurs neuronaux (normalisation du nombre de cellules DCX+ et du nombre d'astrocytes, et augmentation de la forme quiescente des cellules microgliales (Iba1+))
(97)	80mg/kg/jour pendant 14 jours (gavage)	DMSO dans 0,5% HPMC + 0,1% Tween 80	0,28nM	Tester un antagoniste sélectif du récepteur GR sur un modèle de rat diabétique	Amélioration de la glycémie à jeun, perte de la masse corporelle (15%) après 10 jours de traitement
(94)	30mg/kg/jour pendant 14 jours (SC)	Polyéthylène glycol	-	Déterminer si les effets du stress chronique à l'adolescence sont médiés par la signalisation du récepteur GR via une approche pharmacologique, par +/- l'administration du CORT108297, antagoniste sélectif de GR. Il est administré à des rats soumis à un protocole de stress chronique variable de 2 semaines (CVS).	Le stress affecte de manière différente les comportements et le développement neuronal en fonction du sexe. Le CORT108297 bloque les effets du CVS sur le test à la nage forcée (réduction de l'immobilité), et module la réactivité de l'axe HPA (baisse de la corticostéronémie)
(98)	10, 20 ou 40mg/kg, 2 fois par jour (9h et 18h) pendant 1 semaine (IP)	Huile de sesame	0,27nM	Tester le CORT108297 sur un modèle de rat ayant reçu une dose de 10µg de peptide amyloïde Aβ ₂₅₋₃₅ mimant un modèle aigu de la maladie d'Alzheimer (AD), et ainsi déterminer si un modulateur sélectif du récepteur	Le CORT108297 permet de rétablir les niveaux de GCs circulant et inverse totalement les déficits synaptiques et les processus d'apoptose engagés dans

				GR pourrait offrir une approche thérapeutique intéressante dans la AD où les déficits cognitifs et symptômes psychologiques sont associés à une dérégulation précoce de l'axe HPA.	l'hippocampe (inversion de la neuroinflammation et du taux de peptide amyloïde β)
(93)	20mg/kg, 2 fois par jour pendant 5 jours (SC) pour l'étude de l'effet antagoniste du CORT108297 50mg/kg, 2 fois par jour (9h et 16h) (gavage), pendant les 4 derniers jours d'un traitement à la corticostérone (21jours), pour l'étude de l'effet du CORT108297 sur la neurogenèse	Polyéthylène glycol-300 0,1% d'éthanol dissous dans de la crème de café	0,9nM	Tester l'effet agoniste et antagoniste du CORT108297 de par son action sur l'axe HPA chez des rats ayant subi un stress de 5 jours (choc de 0,4mA) Déterminer l'étendue de la prolifération cellulaire (neurogenèse) par injection de BrdU (200mg/kg en IP) chez des rats ayant reçu de la corticostérone et +/- du CORT108297	Le CORT108297 réduit le nombre de copie d'ARNm de CRH dans l'hypothalamus (PVN). En revanche, il induit une augmentation de l'expression de c-Fos. 4 jours de traitement au CORT108297 induit une augmentation de cellules BrdU+ et restaure la différenciation cellulaire dans le gyrus dentelé, objectivé par le nombre de cellules DCX+.

7.2.2. CORT118335

Le CORT118335 a récemment été développé comme un modulateur sélectif du récepteur GR (SGRM). Il a cependant une affinité modeste pour le récepteur MR, sur lequel il agit comme antagoniste. Ce ligand a une affinité plus faible pour le récepteur GR que le CORT108297. Les propriétés agonistes et antagonistes du CORT118335 à l'égard du récepteur GR sont spécifiques aux tissus et dépendent des corégulateurs présents.

L'équipe de *Nguyen et al* a étudié les effets du CORT118335 sur les réponses neuroendocriniennes au stress, ainsi que sur les phénotypes comportementaux et les réponses centrales au stress qui y sont liés chez le rat mâle. Cette étude a été faite en comparaison aux effets d'un antidépresseur tricyclique, l'imipramine. Les antidépresseurs tricycliques augmentent l'activité du promoteur du récepteur GR, l'expression de son ARNm, et l'affinité des GCs pour GR dans les lignées cellulaires neuronales, ce qui fait de l'imipramine un témoin positif approprié pour cette étude. Au cours de l'expérimentation les rats ont reçu le CORT118335 ou l'imipramine pendant 5 jours. Le 5^{ème} jour les rats ont été placés pendant une durée de 30 minutes dans un tube de contention ventilé afin de générer un stress. Cette contention a été réalisée avant l'injection (99).

L'administration d'une des deux molécules a été réalisée une seconde fois sur les mêmes animaux, à deux semaines d'intervalle. A l'issue du 5^{ème} jour, les animaux ont été exposés au test de la nage forcée (FST) pendant une durée de 5 minutes et au test de l'Open field (OFT), dans le but de définir l'efficacité antidépressive du CORT11835 et son effet sur l'anxiété de l'animal.

La première expérimentation a permis de mesurer les réponses neuroendocriniennes au stress, et la seconde a permis de mesurer les réponses comportementales et centrales au stress.

Il apparait que, indépendamment de la dose administrée (10 ou 30mg/kg), le modulateur sélectif du récepteur GR et MR induit une baisse de la réponse à la corticostérone à l'issue de la contention et du FST, contrairement à l'antidépresseur tricyclique. A l'inverse, l'étude comportementale révèle que le CORT118335 n'a aucun effet sur l'immobilité lors du FST et de l'OFT, contrairement à l'imipramine. Le SGRM n'a donc aucun effet sur le comportement de type anxieux. Ces données suggèrent que des facteurs supplémentaires, en dehors des simples concentrations de corticostérone, sont à l'origine des différences de comportement observées dans le FST.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que le CORT118335 réduit de manière significative l'expression de c-Fos au niveau de l'aire CA1 de l'HPC, région où le récepteur GR est particulièrement exprimé (cf Partie II, 2). Ces résultats corréleront avec ceux obtenus avec le RU486, suggérant que c'est l'effet antagoniste du CORT118335 qui prédomine dans cette région. Aucun effet sur l'expression de c-Fos n'a été retrouvé dans les autres régions du cerveau (cortex, hypothalamus, et amygdale), à la différence de l'imipramine qui a également induit une réduction de l'expression de c-Fos au niveau de la région CA3 de l'hippocampe et dans l'amygdale. Dans l'objectif de réduire l'excitation neuronale induite par le stress via une sécrétion excessive de GCs, particulièrement dommageable pour l'hippocampe, les deux molécules agissent donc dans la zone CA1.

Ainsi, le CORT118335 inhibe la réponse endocrinienne, mais n'a aucun effet de type antidépresseur. Il module l'activité neuronale au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe,

corroborant avec l'étude de *Atucha et al*, qui montre que le CORT118335 bloque la transcription de gènes cibles de GR dans cette même zone (100). Ces données illustrent une dissociation entre la réponse endocrinienne et comportementale. Le phénotype endocrinien induit à l'issue d'un stress reflète les résultats obtenus avec le CORT108297 (101), modulateur du récepteur GR uniquement, suggérant que les effets du CORT118335 sur les réponses neuroendocriniennes induites par le stress sont dues à ce récepteur. Le récepteur MR ne module pas à lui seul la réponse endocrinienne.

7.3. Place des SGRM dans la stratégie thérapeutique

Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux glucocorticoïdes forment une classe pharmacologique en pleine expansion.

Au regard des récentes études qui ont été réalisées sur les SGRM, l'antagonisation du récepteur GR peut-être une option de traitement efficace en cas de dérégulation de l'axe HPA associée à une activité glucocorticoïde aberrante. On peut notamment citer, dépendamment du modulateur utilisé, la modification de l'humeur dépressive tout en limitant les effets délétères possibles en raison de la spécificité pour le récepteur GR (CORT108297), l'atténuation des anomalies neuroendocriniennes, cérébrales et comportementales induites par les stress chronique, l'obésité ou encore la maladie d'Alzheimer.

Il semble que ces composés peuvent interagir avec différents facteurs médiés par le récepteur GR pour réguler de manière différentielle la réactivité de l'axe HPA. En accord avec cette notion, la récente étude de *Zalachoras et al* (93) a souligné que le CORT108297 induit un profil d'interaction entre le récepteur GR et les facteurs en aval médiés par celui-ci qui est distinct de celui de l'antagoniste classique, la mifépristone, et de l'agoniste complet de GR, la dexaméthasone. Par ailleurs, l'ensemble des études sur les SGRM rapportent que leur administration induit une diminution significative de la réponse à la corticostérone lors de la phase initiale de stress. Cependant, tout comme la mifépristone, les SGRM n'ont pas d'effet sur le taux basal d'ACTH et de corticostérone. On remarque aussi que la mifépristone atténue dans un premier temps la réponse à la corticostérone lors d'un stress aigu, mais prolonge cette réponse à des temps ultérieurs, suggérant une altération du feedback négatif médié par GR. Ainsi l'antagonisation du récepteur GR avec un SGRM, au moins dans les situations de stress aigu, protège l'organisme d'une réactivité neuroendocrinienne et comportementale accrue face à un nouveau facteur de stress. Cette différence entre l'antagoniste non sélectif et sélectif peut s'expliquer par l'occupation des récepteurs, mais aussi l'affinité et la sélectivité. Ainsi, on ne peut pas exclure un effet additif du blocage de GR et du PR sur les réponses de l'axe HPA. Etant donné que la progestérone est sensible au stress, il est tentant d'imaginer que la différence entre ces deux composés sur l'axe HPA peut être en partie attribuable à des actions différentielles sur le récepteur PR.

En revanche, les études ne s'accordent qu'en partie sur les effets comportementaux des SGRM, ainsi que sur les effets sur l'activité neuronale (augmentation /réduction de l'expression de c-Fos).

À l'heure actuelle, les études déterminant le profil d'action des SGRM ont toutes été réalisées sur le SNC. C'est pourquoi nous avons souhaité déterminer leur profil d'action,

particulièrement pour le CORT108297, sur le SNE dans l'objectif de comprendre l'implication du récepteur GR dans la motilité intestinale en conditions de stress. Les résultats sont présentés dans la Partie III de ce document.

PARTIE III :

Résultats expérimentaux d'une étude menée au sein du laboratoire TENS

1. Contexte de l'étude

1.1. Etat des lieux

Chez l'homme, le stress est associé à des troubles gastro-intestinaux comprenant des altérations de la motilité et de la perméabilité. Cliniquement, le stress se manifeste par des flatulences, des douleurs abdominales, plus ou moins associées à une diminution de la vidange gastrique et une accélération de la vidange colique.

Plusieurs études ont montré qu'il agit sur le cerveau, mais aussi sur le tube digestif par le biais du SNE. Il exacerbe un certain nombre de pathologies, y compris les pathologies gastro-intestinales, comme le montrent les modèles animaux de stress (102) (103) (56) (52). De tels modèles, comme WAS (Water Avoidance Stress) ou stress d'évitement de l'eau, sont actuellement utilisés pour étudier ces altérations, à l'origine d'une diminution de la vidange gastrique et du temps de transit fécal, associée à une augmentation de la perméabilité, de la contractilité et de la motilité intestinale (97).

Le SNE est un réseau neuronal intégratif situé dans le tractus gastro-intestinal impliqué dans la régulation des fonctions gastro-intestinales telles que la motilité et la sécrétion (45) (104) (34).

Les relations entre le stress, le SNE et les troubles gastro-intestinaux ont déjà été beaucoup étudiées. Comme évoqué précédemment, le stress aigu ou chronique est associé à une stimulation de l'axe HPA, caractérisée par la sécrétion de CRH par l'hypothalamus, entraînant la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse, qui enfin induit la sécrétion de glucocorticoïdes par les glandes surrénales (53) (103) (11) (56) (52). Il a été démontré que la CRH contribue aux changements induits par le stress dans la motilité intestinale et les fonctions de la muqueuse intestinale. Cependant, si les antagonistes des récepteurs à la CRH préviennent les troubles gastro-intestinaux liés au stress dans des modèles animaux, leur efficacité pour soulager les maladies intestinales fonctionnelles liées au stress n'a pas été démontrée (80) (52) (51).

Outre leur rôle pléiotropique dans le métabolisme cellulaire, les GCs sont des hormones de stress aigu ou chronique. L'expression de leurs récepteurs par les cellules épithéliales intestinales ou par les cellules mononucléaires de la lamina propria intestinale est connue (105). Ainsi, le rôle des glucocorticoïdes et de leurs récepteurs dans les troubles gastro-intestinaux induits par le stress, comme l'augmentation de la perméabilité, n'est pas exclu. Cependant, ni l'expression de GR par le SNE, ni les relations entre les GCs et le SNE qui contrôle la motilité intestinale n'ont encore été décrites.

1.2. Modèles animaux de stress

Les mécanismes associés au stress diffèrent selon la durée et la régularité de ce dernier. Un stress aigu va ainsi mettre en jeu de multiples médiateurs chimiques et impliquer une réponse adaptative rapide. Un stress chronique va en revanche empêcher un retour à l'équilibre de ces médiateurs et conduire à des modifications plus durables pouvant conduire à la pathologie (11). Nous ne nous intéressons ici qu'aux modèles permettant d'étudier un stress chronique. Différents modèles de stress chronique sont utilisés. Il s'agit le plus souvent de modèles

murins. Le stress est induit par la répétition pendant plusieurs jours consécutifs d'un ou plusieurs stress aigus.

Le premier modèle, fréquemment utilisé chez le rat, est le « maternal separation ». Cette méthode consiste à séparer de manière journalière le raton de sa mère et à l'isoler dans une cage durant un temps défini par l'expérimentateur. Ce modèle est utilisé pour étudier les effets d'un stress néonatal sur la santé de l'individu adulte. Il a ainsi été montré que les rats séparés de leur mère après la naissance montraient à l'âge adulte des altérations de la barrière intestinale et de sa perméabilité (106).

Parallèlement à ce modèle, il existe un modèle animal de stress de cochon, le « Early Weaning Stress » (EWS) (107). Ce modèle consiste à sevrer le porcelet de leur truie à 15 jours (EWS) ou 28 jours de vie (LWC ou Late Weaning Control). L'étude montre que le stress induit au début de la vie des porcelets une régulation à long terme du SNE se manifestant par une augmentation de la population de neurones cholinergiques et une réponse accrue des neurones sécrétomoteurs en fonction du sexe. Ces résultats pourraient avoir des implications majeures dans la pathogenèse des maladies gastro-intestinales humaines et animales telles que le SII et les MII.

Le modèle de stress « social defeat », tout comme le modèle « Unpredictable Chronic Mild Stress », sont basés sur une altération des facteurs environnementaux. Le premier modèle est basé sur une perturbation sociale. Un individu mâle (intrus) est introduit dans la cage d'un autre individu mâle (résident). Les animaux entrent généralement en conflit, et si cette situation est maintenue pendant plusieurs jours, on entre dans un phénomène de stress chronique qui engendre des troubles dépressifs (108). Le second consiste à soumettre l'animal des stress chroniques brefs et imprévisibles, provoquant des altérations physiques et comportementales telles que la perte de poids et le déficit mnésique (109).

Un autre modèle répandu est le stress d'évitement à l'eau (WAS, Water Avoidance Stress). Il consiste à poser l'animal sur une plateforme de 3x3cm² placée au milieu d'une bassine (42x42x19cm³), remplie d'eau à température ambiante jusqu'à 1cm du haut de la plateforme. Ce stress induit notamment une augmentation du transit colique modélisée par une augmentation du nombre de fèces ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale (110).

Il existe d'autres modèles de stress validés, notamment des modèles génétiques et pharmacologiques comme le modèle CORT qui induit un état anxio-dépressif par administration régulière de glucocorticoïdes à forte dose (5mg/kg/j dans l'eau de boisson pendant 4 semaines) (111).

1.3.Données préliminaires obtenues au laboratoire

Si le lien entre troubles digestifs et stress est bien connu, la physiopathologie n'en est pour autant pas clairement élucidée. Des données préliminaires au sein de notre équipe, au laboratoire TENS, ont montré que l'implication du SNE semble être une piste intéressante.

1.3.1. Le remodelage des neurones du SNE induit des modifications fonctionnelles digestives: cas de la rectocolite hémorragique

La rectocolite hémorragique (RCH) ou colite ulcéreuse est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) qui se manifeste par une réaction immunitaire excessive de l'organisme contre des hôtes (virus ou bactéries) présents dans l'intestin. Une prédisposition familiale, l'alimentation ainsi que le stress sont autant de facteurs qui pourraient favoriser le développement de cette maladie.

Des modifications morphologiques et fonctionnelles ont été identifiées au sein du SNE dans le cas du SII. En parallèle de ces modifications, le laboratoire a pu mettre en évidence une neuromodulation neurochimique du SNE chez les patients atteints de RCH (112). Alors que la proportion de neurones ChAT + et VIP + n'est pas affectée chez les patients RCH, celle des neurones SP + est augmentée dans les zones inflammatoires et non-inflammatoires. L'augmentation de la proportion de neurones ChAT/SP + était équivalente à la diminution de la proportion de neurones ChAT +. Les neurones ChAT ont ainsi été identifiés comme la population neuronale putative qui présente une plasticité neuronale. Par conséquent, ce remodelage dans la RCH se traduit par un passage d'une innervation plutôt cholinergique à une innervation plus peptidergique. Ce changement pourrait constituer en partie, en plus d'autres facteurs identifiés tels que l'augmentation du récepteur NK-1 (Neurokinine 1), la perturbation de la motilité intestinale observée au cours de la RCH.

1.3.2. Validation de modèles animaux d'activation de l'axe HPA : le modèle MPR et le modèle WAS

Il est reconnu que les traumatismes au cours de la petite enfance sont un risque majeur pour l'apparition et l'aggravation de plusieurs maladies gastro-intestinales (GI) à l'âge adulte et notamment le SII et les maladies inflammatoires du côlon. Parmi les facteurs de stress, l'environnement nutritionnel pendant la période périnatale a un impact non seulement sur la santé néonatale mais aussi sur la santé à l'âge adulte. Cependant aucune étude chez l'homme n'a permis de démontrer les conséquences des facteurs de stress nutritionnels sur la fonction GI au cours de la vie.

L'objectif du modèle animal de rat MPR ou Maternal Protein Restriction est de déterminer les conséquences de la malnutrition maternelle au cours de la gestation sur la fonction GI, et particulièrement sur la perméabilité paracellulaire et transcellulaire, la motilité intestinale ainsi que sur le phénotype et la fonction du SNE de la descendance (113). Le modèle MPR consiste à nourrir la mère en gestation par un régime appauvri en protéines (8% de protéines contre 20% pour le groupe contrôle). Les ratons issus de la portée constituent des ratons MPR, qui après sevrage sont nourris avec une nourriture de laboratoire standard.

Le SNE a pour rôle d'intégrer des signaux locaux et systémiques pour contrôler la motilité de l'intestin et les fonctions de barrière intestinale. Les neurones entériques sont notamment sensibles aux nutriments contenus dans la lumière intestinale, induisant l'expression de neurotransmetteurs excitateurs. Les conséquences d'un traumatisme nutritionnel subi au cours de l'enfance sur la fonction GI ont été étudiés à la fois dans des conditions basales et en réponse à un stress aigu, à savoir un stress WAS.

Les résultats montrent que les rats ayant subi un traumatisme prénatal induit par l'alimentation présentent une altération à long terme des réponses GI, en particulier de la motilité intestinale objectivée par la FPO augmentée ainsi que la tension basale au niveau du muscle du côlon distal. La perméabilité aux petites molécules était également plus élevée que chez les rats témoins. Ces changements observés sur la fonction intestinale chez les rats MPR sont associés à une augmentation de la corticostérone. En effet, l'augmentation de cette hormone, a été rapportée précédemment comme médiateur de l'augmentation accrue de la perméabilité intestinale aux petites molécules (91). En revanche, de manière surprenante, un stress induit par le WAS n'a pas de conséquence sur la fonction GI des rats MPR (rats MPR/WAS versus rats MPR). Les mécanismes qui sous-tendent l'absence de réponse au WAS chez les rats MPR demeurent actuellement inconnus, mais pourraient être attribuables à une altération de l'axe HPA, et une meilleure capacité d'adaptation à l'âge adulte face à un stress.

Par ailleurs, le MPR induit un remodelage du SNE caractérisé par une augmentation de la proportion de neurones ChAT, pouvant être en partie responsable des changements fonctionnels observés en conditions basales (motilité colique).

En parallèle de l'étude de l'impact nutritionnel sur les fonctions GI, les travaux du laboratoire ont permis de mettre au point un modèle animal de stress : le modèle WAS. En effet l'application d'un stress aigu par évitement de l'eau (1 seul WAS, d'une durée d'une heure subi au dernier jour de l'étude) a montré des conséquences sur la fonction motrice intestinale. Contrairement aux rats MPR/ WAS qui n'ont pas montré de différences fonctionnelles par rapport au groupe de rats MPR, les rats WAS ont eu une corticostérolémie augmentée ainsi qu'une accentuation de la motilité intestinale (augmentation du transit objectivé par la FPO) par rapport aux rats témoins n'ayant subi aucun traitement.

Il a également été observé que l'ajout de corticostérone dans le milieu de culture primaire de SNE entraînait une neuromodulation neurochimique, équivalente à celle observée dans le modèle MPR, à savoir une augmentation de la proportion de neurones ChAT.

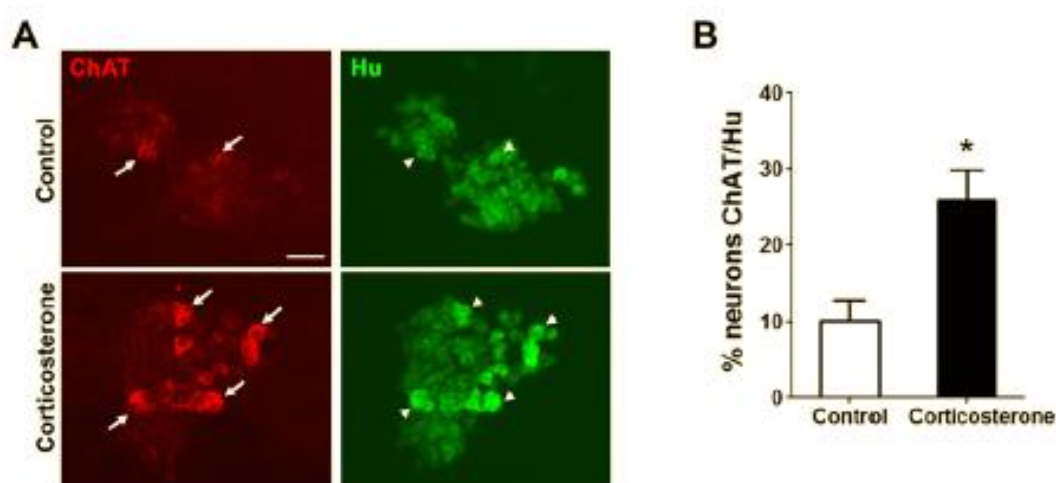


Figure 18 : La corticostérone augmente le nombre de neurones cholinergiques

Les cellules de culture primaire de SNE ont été traitées pendant 10 jours avec le véhicule (contrôle) ou avec 1 μ M de corticostérone. Le nombre de neurones totaux est déterminé par un marquage Hu (1 :5000). Le nombre de neurones cholinergiques est déterminé par un marquage ChAT (1 :1000) (n=4 ; *p< 0,05, test de Mann-Whitney) (D'après Aubert *et al*, 2018).

Ces observations nous amènent à faire l'hypothèse que le stress, par une augmentation de la concentration en corticostérone entrainerait un remodelage neurochimique des neurones du SNE tel que constaté dans le cas de la RCH ou les modèles animaux développés, et serait potentiellement responsable de désordres digestifs.

2. Objectifs de l'étude

L'objectif de notre étude était triple : déterminer si GR est également exprimé par le SNE, déterminer si le stress peut induire une modification du phénotype neuronal à l'origine de perturbations de la motilité digestive et enfin, déterminer si ces modifications fonctionnelles peuvent être médiées par GR.

Nous avons pour cela utilisé comme modèle de stress : le modèle WAS. L'objectif premier a été de caractériser l'expression de GR dans les neurones du plexus myentérique du SNE de côlon distal de souris. En effet au sein du SNE, les neurones du plexus myentérique sont des éléments clés du contrôle de la motilité digestive.

Après une caractérisation du récepteur GR dans les neurones du SNE, le second objectif de cette étude a été de déterminer si ce dernier est activé et modulé au cours du processus de stress. La mise en place d'une expérimentation animale a permis de distinguer deux groupes et ainsi comprendre la régulation du récepteur GR: un groupe de souris contrôle et un groupe de souris WAS. Les souris WAS ont été soumises à un stress d'évitement de l'eau une fois par jour, sur une durée de 4 jours. Le niveau d'expression de GR au niveau cytoplasmique et nucléaire a été déterminé par analyse immunohistochimique, dans le but de définir la variation de son activation et de sa modulation entre les deux conditions.

Par ailleurs, des variations dans l'expression des neuromédiateurs du SNE ont été impliquées dans les pathologies motrices et inflammatoires du tube digestif. Ainsi, nous avons de l'étude caractérisé dans notre modèle animal WAS le phénotype neurochimique, en particulier cholinergique et nitrergique du plexus myentérique colique, par analyse immunohistochimique, et déterminé l'impact fonctionnel de ces changements sur la réponse motrice neuro-induite.

Des analyses *in vivo* ont été réalisées au cours de l'expérimentation pour évaluer le transit colique des animaux. Puis des analyses *ex vivo* ont également été faites après sacrifice des animaux. Les côlons distaux ont été prélevés, et une analyse fonctionnelle en chambre d'organe a pu être réalisée. La réponse contractile du SNE induite par une stimulation électrique (EFS) a été étudiée en l'absence et en présence de L-NAME (inhibiteur de la NOS) et d'atropine (antagoniste des récepteurs muscariniques).

Enfin, afin d'évaluer la capacité de bloquer les effets du stress sur le SNE et les fonctions digestives, nous avons eu recours à une approche pharmacologique. Nous avons renouvelé l'expérimentation animale en introduisant un groupe supplémentaire d'animaux recevant un antagoniste spécifique du récepteur GR aux glucocorticoïdes, le CORT108297. Afin de

consolider nos données, nous avons effectué les mêmes analyses fonctionnelles et immunohistochimiques chez ces animaux.

3. Integration of stress by glucocorticoid receptors expressed by neurons of the enteric nervous system induces an increase in intestinal motility

Integration of stress by glucocorticoid receptors expressed by neurons of the enteric nervous system induces an increase in intestinal motility

J. Blin, C. Gautier, T. Durand, T. Oullier, P. Aubert, M. Neunlist, D. Masson,
K. Bach-Ngohou

Introduction

In human, association between stress and gastrointestinal disorders or visceral pain is well-known, even if all mechanisms have not yet been fully decrypted (1,2). Indeed, acute or chronic stress can induce alterations in gastrointestinal motility, epithelial secretion and enhanced epithelial barrier permeability (1,2), resulting in decreased gastric emptying and fecal transit time and increased intestinal permeability, contractility and motility (3). Several studies have shown that stress has an impact on the brain but also on the gastrointestinal tract through the enteric nervous system (ENS), as assessed by observations in animal models of stress (4). Such models, as water avoidance stress (WAS), are thus currently used to study these alterations.

The ENS is an integrative neuronal network, located within the gastrointestinal tract, involved in the regulation of gastrointestinal functions such as motility and secretion (5,6). Relations between stress, ENS and gastro-intestinal disorders have been extensively studied. Indeed, acute or chronic stress are associated with stimulation of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, characterized by secretion of CRH by hypothalamus, leading to secretion of ACTH by pituitary gland, and finally stimulation of glucocorticoides (GC) secretion by adrenal glands. (7, 8, 9, 10). CRH effects on gastro-intestinal tract have been extensively studied, and have been shown to contribute to stress-induced changes in intestinal motility and the functions of the intestinal mucosa. However, while CRH receptor antagonists prevent stress-related gastrointestinal disorders in animal models, their efficacy in relieving stress-sensitive functional bowel disease has not been demonstrated (11).

Besides CRH, in addition to their pleiotropic role in cell metabolism, GCs are acute or chronic stress hormones, namely cortisol in humans, and corticosterone in murins. Among receptors, expression of the specific glucocorticoid receptor (GR) NR3C1 by intestinal epithelial cells or by mononuclear cells of the intestinal lamina propria has already been described (12). The role of glucocorticoids and their receptors in stress-induced

gastrointestinal disorders, such as increased intestinal permeability, has already been studied. However, the relations between GCs and ENS, which control intestinal motility is not known. Indeed, the expression of GR by ENS cells has never been described yet.

In our study, we first aimed to determine if GR is expressed by ENS cells and if its expression can be modulated under stressful conditions. Then, to determine if stress induced intestinal disorders can be associated with neuronal remodeling. And, finally, if GCs could play a role on ENS neurons via GR receptors.

We will study the expression of GRs in ENS neurons in mice. The animal model of stress was water avoidance stress.

Material and methods

Animals

All protocols were carried out in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals (Agreement 02376.01). Adult male C57BL/6 mice (6-7 weeks; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) weighing 25-30g were used. Mice were housed in cages with free access to food and tap water. Animals were quarantined under controlled conditions illumination (12h light/dark cycle), temperature, and humidity.

Water avoidance stress (WAS) protocol

For stress exposure, a single 1h WAS in between 8 AM to 9 AM in the morning, was performed daily at PD35 for 4 consecutive days, corresponding to the chronic repeated acute stress. Mice were placed on a platform (3 x 3 cm²) positioned at the center of a plastic tank (42 x 42 x 19cm³) filled with water at room temperature up to 1cm of the top of the platform(13,14).

Pharmalogical treatment protocol

In a separate dose-response study, 2 groups of 5 mice were performed at random. Among this groups, one of them were injected intraperitoneal with 2mg/kg CORT108297 (15). (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) in sesame oil, 1 hour before the WAS procedure. And the second group, the control-mice group received vehicle (sesame oil).

In vivo measurement of colonic motility

To assess the fecal pellet output (FPO), control mice were placed individually in clean cages without bedding, food, or water for fecal pellet collection during 1 h. For mice subjected to WAS, the fecal pellet collection was performed for 1 h during the WAS time period. Fecal pellets were collected and counted immediately after expulsion.

Ex vivo measurement of colonic motility

At the end of the fecal pellet collection for the control mice and after the WAS treatment the fourth day, animals were killed by cervical dislocation. The distal colon was removed and portions of the distal colonic longitudinal muscles were placed in an organ chamber (Radnoti, Covina, CA, USA) with Krebs solution at 37°C and continuously aerated with 95% O₂ and 5% CO₂. The contractile response was continuously recorded using isometric force transducers (TRI202PAD; Panlab, Cornell`a, Spain) coupled to a computer equipped with a PowerLab 8/30 System and Labchart data analysis software (AD Instruments, Dunedin, New Zealand) as previously described (Rodolphe Soret Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats, *Gastroenterology*, 2010). Drugs were added sequentially: nitro-L-arginine methyl ester (L-Name, 50 µM; MilliporeSigma, Burlington, MA, USA), an inhibitor of the NOS; and then atropine (1 µM; MilliporeSigma), a muscarinic receptor antagonist. Contractile activity was determined by measuring the average tension over 2min. Next, the distal colon was washed with Krebs solution 5 times over a 10 min period and was then allowed to recover for an additional 20 min. Using bethanechol (10^{-9} - 10^{-2} M), a selective muscarinic receptor agonist (MilliporeSigma), a dose-response curve was created by measuring the area under the curve of the bethanechol-induced contraction for 2 min after bethanechol was added. All values were normalized to the tissue weight.

Blood sampling and hormone assessment

Mice were bled from their tail, at J0 and at J4 (as described in Figure 1), at the end of the 1h WAS test. Samples were obtained by quickly clipping the distal tip of the tail with a razor blade and collecting ~ 50µL of blood into EDTA containing tubes.

In order to minimize hormonal variability due to circadian fluctuations, all procedures were performed during circadian cycle of the diurnal corticosterone rhythm, before 11:00 AM. After collection blood samples were centrifuged at 3200 tr/min, for 15 min at 4°C and then plasma samples were kept at -20°C. Corticosterone plasma levels were measured by enzymatic immunoassay according to the manufacturer's instructions (Laboratoire IDS, Pouilly en Auxois, France).

Immunofluorescence staining

Distal colon segments were fixed in 0.1M PBS containing 4% paraformaldehyde at room temperature for 3h. Whole mounts of longitudinal muscle and myenteric plexus were obtained by microdissection and were permeabilized with PBS containing 10% horse serum (HS) and 4% Triton X-100 for 2h at room temperature. Tissues were then incubated with the following primary antibodies: rabbit anti-ChAT (1:1000, a gift from Pr.Shemann), mouse anti-neuronal NOS (nNOS; 610308, 1:500; BD Biosciences), rabbit anti-GR (D8H2, 3660S 1:500, Cell Signaling), human anti-Hu (POAC; 1:5000) diluted in PBS containing 10% horse serum and 0,5% Triton X-100 for 24 or 48h at room temperature. After washing, tissues were incubated for 2h at room temperature with the appropriate secondary antibodies, respectively, anti-rabbit CY5 (1:500), anti-rabbit CY3 (1:500) and anti-human FP488 (1:200) and mounted Glycerol 60% (vol/vol) (Thermo Fisher Scientific). Nuclei were stained with 4' 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI D9542; 1:10000; Sigma Aldrich, Paris, France).

Image analysis and quantification

Images from immunostained tissues were acquired with a digital camera (Axiozoom, Carl Zeiss, United States). The number of Hu-, ChAT-, nNOS- and GR-neurons was counted in 20 ganglia per animal. The data were expressed as the percentage of ChAT-, nNOS- or GR-neurons normalized to the total number of Hu-neurons.

For GR immunostaining, confocal microscopy was performed using Nikon A1R confocal inverted microscope (Nikon France SAS, Champigny sur Marne) with a Nikon X60 Plan-Apo numerical aperture (NA) 1.4 oil-immersion objective (MicroPICell core facility).

Among these 20 ganglia, 10 were used to measure the intensity of cytoplasmic and nuclear expression of GR receptor. The DAPI-GR co-labelling was used to determine the intensity of nuclear expression of the GR receptor within each neuron of a ganglion, as the Hu-GR co-labelling was used to determine the total intensity of the GR receptor expression within each neuron of a ganglion. The intensity of GR cytoplasmic expression could then be deduced. The measurement of the nucleo-cytoplasmic ratio of GR expression was determined.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Microsoft Excel (Redmond, WA, USA) and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are represented as means $\pm$ SEM. Group comparisons were made using the Mann–Whitney U test or by 2-way ANOVA and the Bonferroni post hoc test as indicated. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

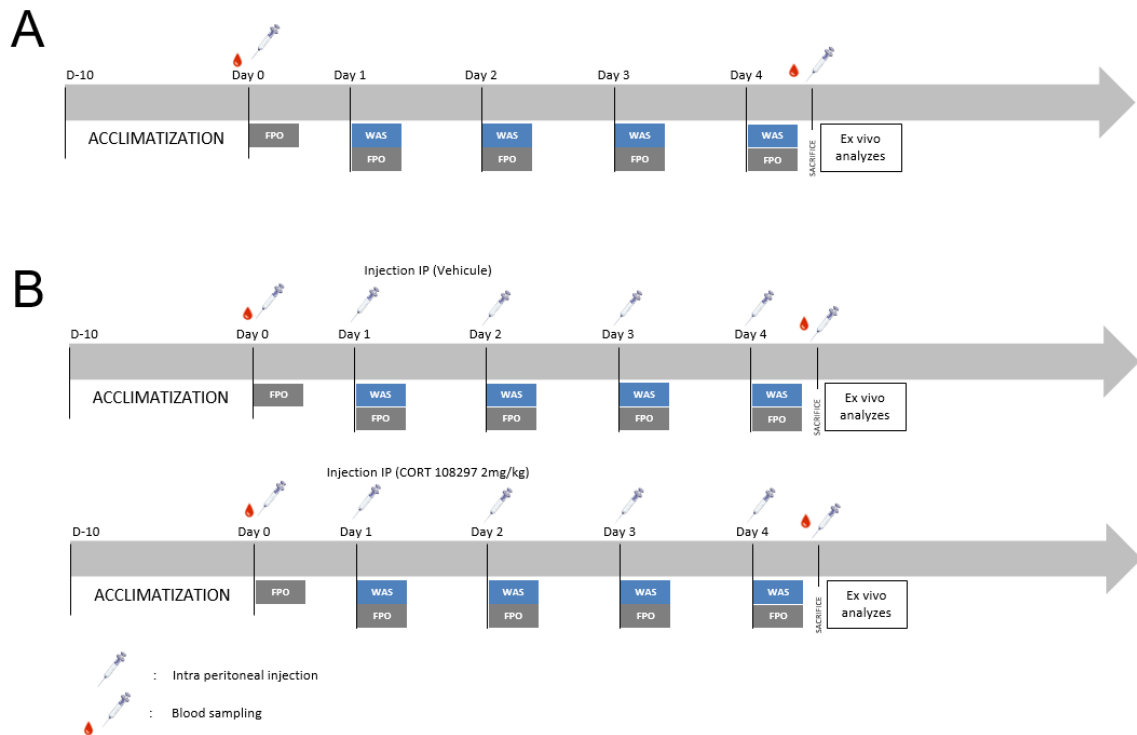


Figure 1. (A) Schematic timeline depicting the experimental design applied to control and stressed mice for the assessment of *in vivo* and *ex vivo* colonic motility. (B) Schematic timeline depicting the experimental design applied to mice treated with CORT 108297 or vehicle (sesame oil) for assessment of *in vivo* and *ex vivo* colonic motility.

Results

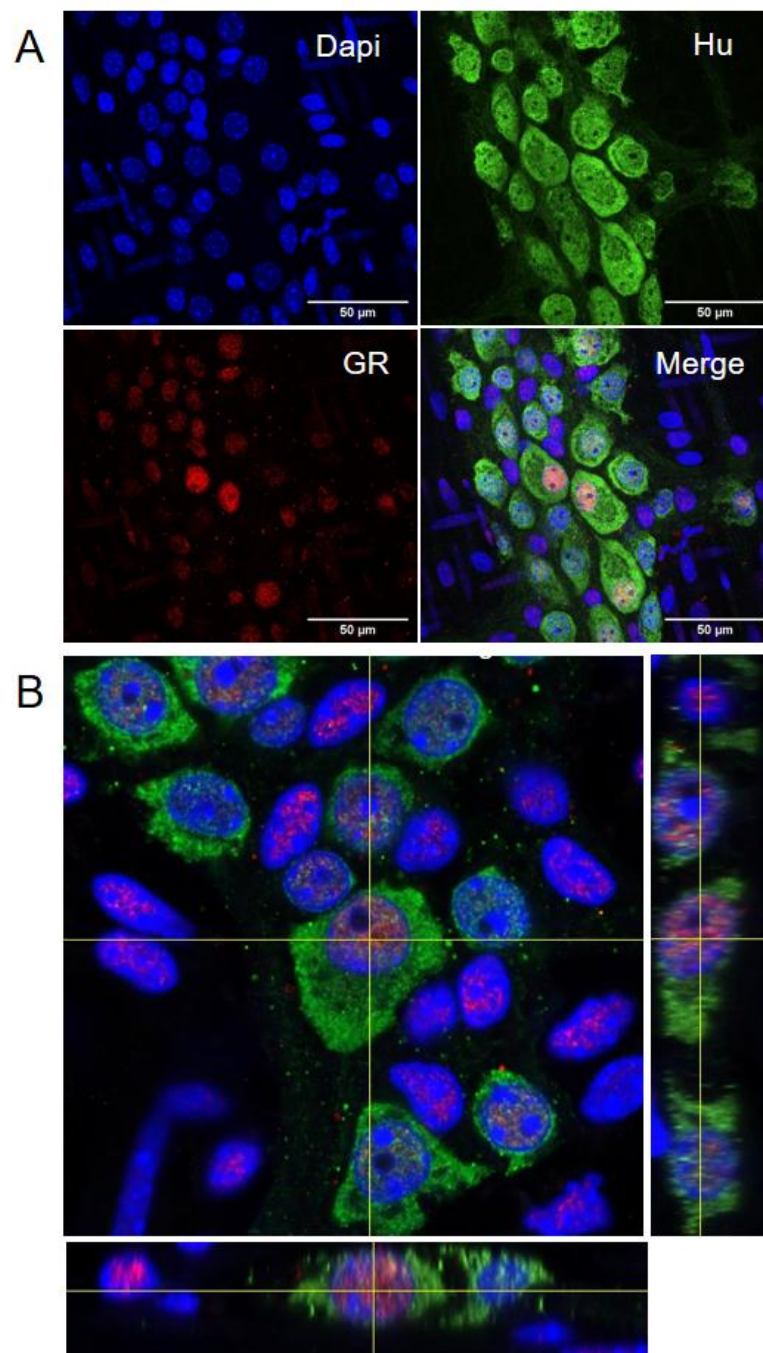


Figure 2. GR is expressed by neurons of SNE in distal colon of mice. (A) Confocal acquisition of double immunolabeling for GR (red) and Hu (green) in the myenteric plexus of mice distal colon. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used for immunolabelling of nuclei. (B) Z-reconstruction of confocal micrographs of myenteric plexus after double immunostaining with Hu and GR antibodies showing the nuclear localization of GR in the neuron.

The GR glucocorticoid receptor is expressed by enteric neurons of mice distal colon

To determine whether enteric neurons express GR, we performed GR immunofluorescence labeling in whole mounts of myenteric plexus obtained by microdissection of distal colon segments. Neurons were selectively stained using antibodies directed against neuronal protein Hu. The colocalization of a neuronal body marker and GR protein on micro-dissected myenteric plexus, using a high resolution confocal microscope shows that GR is expressed in enteric neurons (figure 2A). Representative images obtained by confocal microscopy using Hu as a marker for the neuronal bodies, DAPI for the nuclei and an antibody directed specifically against the GR protein, are presented in figure 2. The orthogonal view showed that GR is located preferably in the nucleus (figure 2B).

Serum corticosterone concentration is increased in stressed mice

We assessed the corticosterone level in control and stressed mice using water avoidance stress protocol (WAS). The serum corticosterone concentration was significantly higher in stressed than in control mice (at J4, control: 51.81 ng/ml (IC: 41.59 ; 62.04) and WAS: 282.6 ng/ml (IC : 221.9 ; 343.3)).

WAS induces nuclear translocation of GR

The level of cytoplasmic and nuclear expression of GR was measured by image analysis and quantification after DAPI labeling and immune-labeling of GR and Hu (figure 3A). The intensity of the cytoplasmic expression of GR was deduced therefrom. The nucleocytoplasmic expression ratio was thus calculated (figure 3B).

While no difference neither in the total number of neurons per ganglion, as assessed by Hu immunolabeling of the micro-dissected myenteric plexuses (figure 4B), nor in the proportion of neurons expressing GR (data not shown) were observed between control and stressed mice,

the nucleo-cytoplasmic ratio of the intensity of expression of the GR receptor was significantly higher in stressed mice, suggesting that GR receptor was translocated under stressful conditions (Fig. 3B).

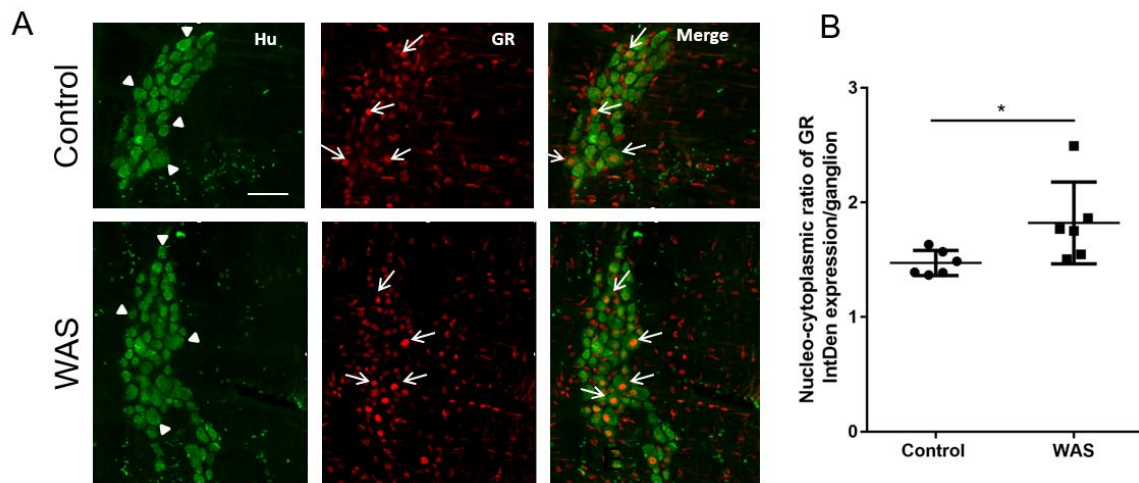


Figure 3. Stress induces a nuclear translocation of GR in neurons of the myenteric plexus (A) Double immunolabeling for Hu (green; arrowheads indicate neuron marker) and GR (red; arrows indicate glucocorticoid receptor neuron marker) in the myenteric plexus of control and stressed mice distal colon. Scale bar, 25µm. (B) Quantitative nucleocytoplasmic ratio of GR IntDen expression per ganglion. Data are represented as means $\pm$ SEM (n= 6) * $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test).

WAS induces ENS phenotypic modulation

The number and the phenotype of neurons (figure 4A) were determined by counting 20 ganglia in whole mounts of myenteric plexus obtained by microdissection of distal colon segments per mice. As stated above, the Hu immunolabeling performed on the microdissected myenteric plexuses did not show difference in the total number of neurons per ganglion between control and stressed mice (figure 4B). ChAT Immunolabeling analysis of the myenteric plexus showed that the proportion of ChAT neurons was significantly increased in stressed mice compared with control colon (Figure 4C). Conversely, no difference was found between control and stressed mice for the proportion of nNOS neurons (Figure 4D).

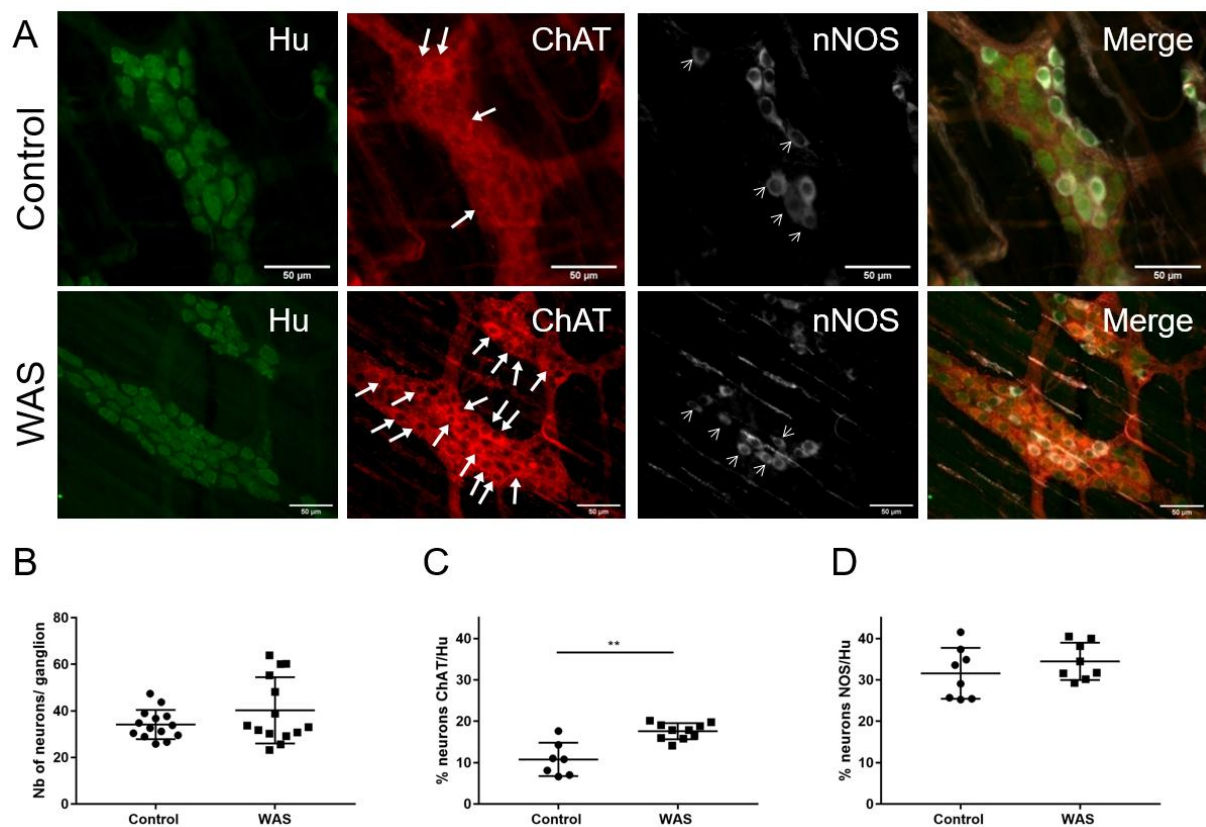


Figure 4. Modification of the neuron phenotype by stress (A) Immunolabeling for Hu, ChAT and nNOS in the myenteric plexus of mice distal colon. (Representatives images). (B) Quantitative analysis for the neurons per ganglion in control and WAS groups. (C) Proportion of ChAT neurons in control and WAS groups. (D) nNOS neurons in control and WAS groups. Data are represented as means $\pm$ SEM ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test).

WAS induces an increased colonic motility

The effect of stress on colonic motility was evaluated *in vivo* and *ex vivo*. Colonic propulsive motor function was assessed *in vivo* by measuring fecal pellet output (FPO). At the end of the last fecal pellet collection for the control mice and after the WAS treatment the fourth day, animals were sacrificed. The distal colon was removed and portions of the distal colonic longitudinal muscles were placed in an organ chamber. We then analyzed *ex vivo* spontaneous

contractile activity of longitudinal muscle strips of distal colon collected from control and stressed mice.

In basal conditions, mean resting tension was significantly higher in stressed mice compared with control group (control: 1142 mN/g; WAS: 1494 mN/g; $p = 0.035$, Figure 5B). After the addition of L-Name (50 μ M), the contractile response to EFS remained significantly higher in stressed mice than in control mice (control: 1120 mN/g; WAS: 1459 mN/g; $p = 0.046$, Figure 5B). Following the addition of atropine (1 μ M), the contractile response to EFS decreased in stressed mice as in control mice, no longer showing a significant difference between the two groups. This observation suggests that hyper contractility could be mediated by a cholinergic mechanism at least in part (control: 725 mN/ g; WAS: 810 mN/g, $p = 0.564$, Figure 5B). The muscarinic receptors agonist, bethanechol, induced a similar dose-dependent increase in contractile response in tissues of both control and stressed mice (Fig. 5D and E), indicating that there is no difference in tissue response to cholinergic stimuli. We can therefore deduce that the stronger contractile response observed in stressed mice is linked to a greater release of acetylcholine in these tissues.

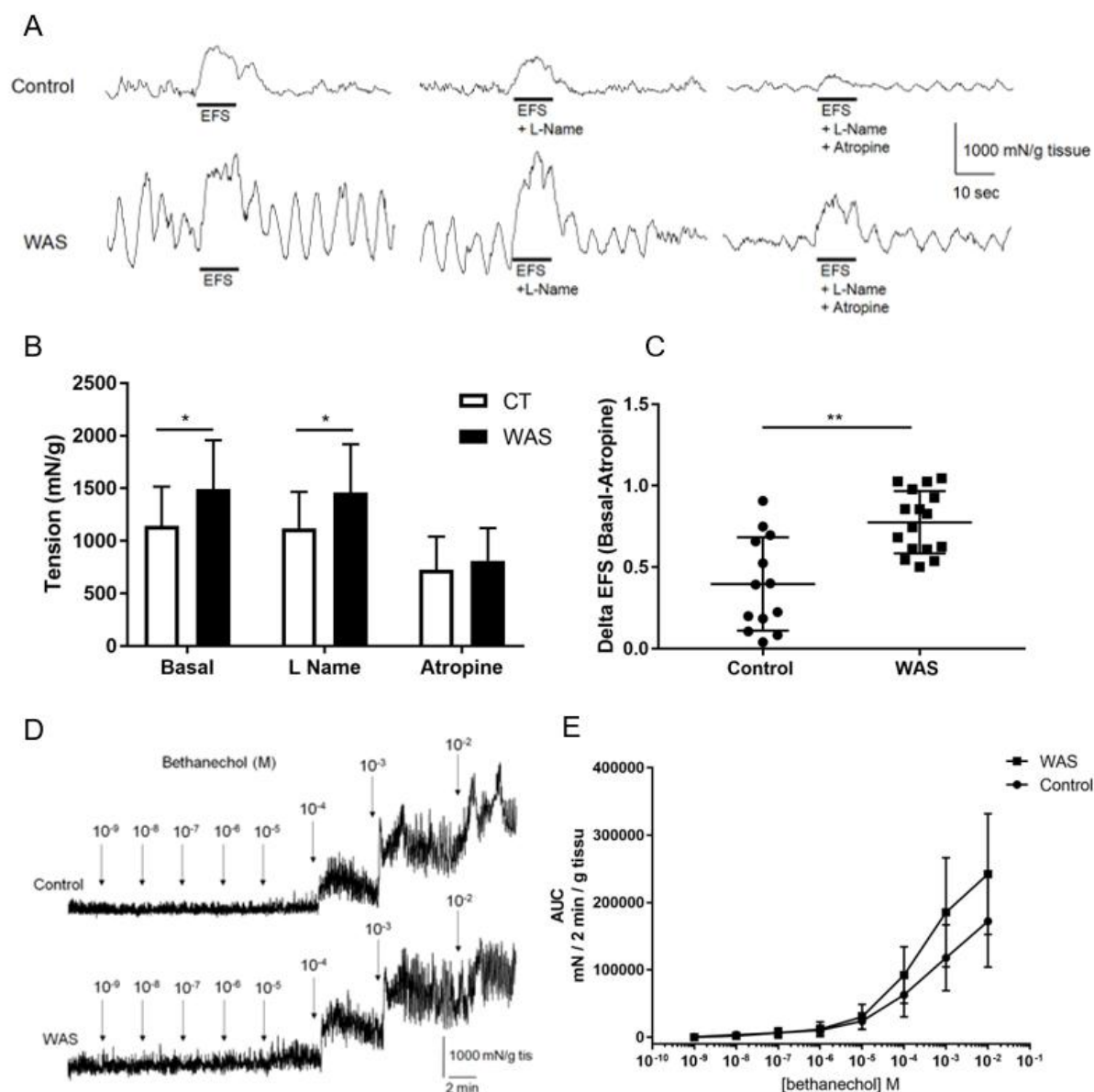


Figure 5. Stressed mice exhibit increased colonic motility. (A) Representative traces of EFS-contractile response in basal condition, with l-Name and with L-Name + Atropine in control and WAS treated mice. (B) Average tension of distal colonic longitudinal muscular segments from control and WAS treated mice in basal condition and after sequential addition of L-Name and atropine. (C) EFS response delta attributed to cholinergic response between control mice and WAS treated mice to EFS stimuli. (D) Representative traces response of isolated colon from control and WAS treated mice to increasing concentration of bethanechol. (E) Dose-response curve of distal colonic longitudinal muscular segments from control and WAS treated mice to bethanechol-induced contraction.

The increase in motility induced by the WAS treatment is caused by the activation of GR.

In order to find out whether the observed effects were mediated by a GR-dependent mechanism, we used a specific GR antagonist (CORT108297). As previously indicated, WAS treatment induces an increase in FPO without attenuation of the effect of stress over the time. FPO was significantly higher ($p = 0.0003$) at the day 4, after one hour of WAS treatment (Figure 6A). The use of CORT108297 induce an attenuation of this increase of colonic motility. Indeed, in mice treated with de CORT108297, no significant difference was made after WAS treatment, whereas those which received the vehicle still stem from an increase in FPO on day 4 (Figure 6B).

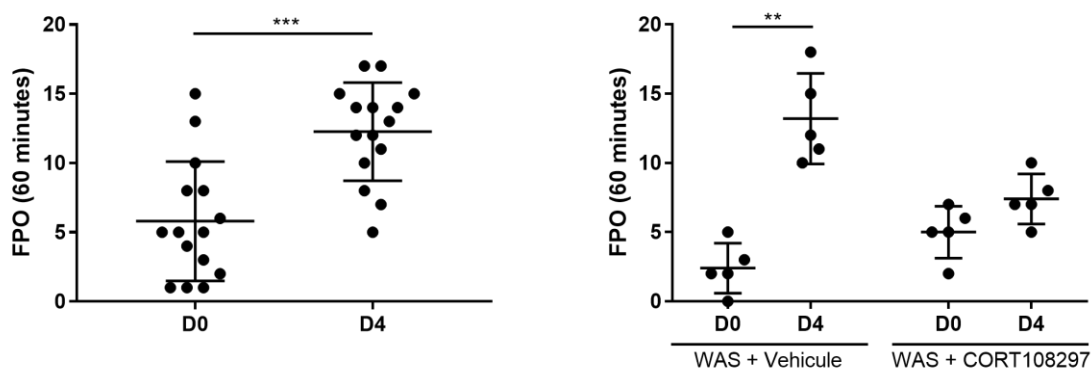


Figure 6. A specific antagonist of GR regulates the colonic motility under stressful conditions. (A) *In vivo* propulsive motor function of the colon assessed by measuring FPO for 1 h in WAS treated mice at day 0 and at day 4 after 1 hour of WAS treatment. (B) Comparison of the *in vivo* propulsive motor function between mice receiving the vehicle (sesame oil) or the CORT108297, 1h before the WAS treatment.

Discussion

Our study showed the expression of GR by enteric neurons and that the activation of these receptors resulted in their translocation, associated with remodeling of the neurochemical phenotype of ENS neurons. These phenotypic modifications are associated with a modification of colonic motricity objectified *in vivo* by an increase in FPO and *ex vivo* by an increase of neuromuscular transmission. Normalization of FPO by the use of a GR receptor antagonist CORT108297 clearly suggests a link between GR and the changes observed.

A first major finding of our study is that we identified the presence of GR receptors upon myenteric neuron that could mediate effects of psychological stress. Previous studies have shown the presence of other receptors such as CRF1 and CRF2 in enteric neurons (16,17). They tested the hypothesis that stress could impact digestive function by acting on these receptors. CRF1 is expressed in a region specific manner, it is found in the ileum and colon in rodents and in humans (18). Activation of CRF1 by CRH induces a colonic motor response similar to the stress-induced one. Conversely, the activation of CRF2 receptors would attenuate the colonic stress response. With the GR receptor, we introduce a new actor of the HPA axis potentially involved in brain-gut axis dysfunction. The expression of GR by peripheral neurons had already been validated on DRG (19) but had never been studied in the enteric neurons. Our study is the first to our knowledge to demonstrate the expression of the GR receptor by ENS neurons. The expression of MR receptors has not yet been studied. We also do not know if the expression of GR by ENS neurons is region specific since we have limited ourselves to the study of the distal colon in mice.

Stress activates myenteric neurons on colon, by induction of the nuclear phosphoprotein Fos, marker of neuronal activity in colonic myenteric neurons and stimulates propulsive motility (20).

In the basal state, GR is a cytoplasmic localization receptor. After activation by his ligand, GR translocate to the nucleus within 20 to 30 minutes (18, 19, 20). In our study, although an increase in nucleocytoplasmic ratio was observed in the control mice, we observed mostly a nuclear localization of GR, in stressed mice as in control mice. The observation of activated GR in ENS neurons of control mice could be secondary of the stressful situation of manipulation and sacrifice which is consistent with the time between leaving the animal facility and sacrifice. Among the GR-positives cells some had more intense nuclear labeling than others, we do not know if this strong expression of GR is associated with a particular neuronal phenotype. Some non-Hu cells, present in the myenteric plexus, were also observed which strongly expressed GR with nuclear localization of the labeling. We think these cells are probably glial cells.

In stressed mice we observed a higher nucleo-cytoplasmic rapport of GR expression, while we know that GR translocates to nucleus after binding of its ligand, the glucocorticoid hormones. After nuclear translocation, activated GR can modulate various genes expression (24). Interestingly we noticed an increase in neurons expressing ChAT linked with this activation. Indeed, by these experiments, we have shown that stress not only induces a release of ACh by enteric neurons but also an increase in the proportion of cholinergic neurons. Modulation of ChAT expression by GR complex has not yet been highlighted but a previous studies have already shown that the treatment of cultures of ENS with corticosterone induced an increase in the proportion of cholinergic neurons and a decrease in autophagy in the neurons (25). This increase in the proportion of cholinergic neurons is associated with an impact on intestinal motor function. Indeed, when we neurostimulate a distal colonic biopsy, we observe an increase in the contractile response. The increase in muscle contractility observed in the motricity chamber is dependent on ACh since in the presence of atropine, an antagonist of cholinergic receptors, a difference in response is no longer observed between the stressed mice and the control mice. This increase in cholinergic neurotransmission is on the

one hand linked to the activation of neurons by stress, but also linked to the fact that there is a greater proportion of cholinergic neurons secondarily to the remodeling of the ENS by a mechanism that we suspect to be induced by GR.

The ACh release by ENS neurons is associated with greater propulsive peristaltic and secretory reflexes and a decreased intestinal transit time (26,27). The observation of an increase in FPO in our stressed mice is therefore entirely consistent with this increase in the proportion of ChAT neurons. We show here for the first time that stress acts through the ENS on colonic motricity.

Finally, we were able to demonstrate that the use of a specific antagonist of the GR receptor, CORT108297 led to a decrease in FPO in our mice subjected to WAS. This observation clearly suggests that GR is implicated in this intestinal stress related alterations. This study shows a pathophysiological mechanism that can explain the effects of stress on digestive functions, with GR as a novel actor in the brain-gut disorders. The recent observation of an increase in digestive disorders in the population with adrenal insufficiency is further argument to suggest that GR plays a central role in this pathway (Article Sc. Report). The use of a specific GR antagonist such as CORT108297 has never been studied in the management of stress-related digestive pathologies. The irritable bowel syndrome (IBS) is chronic functional bowel disorder characterized by alterations in sensory and motor functions (28). While the use of CRF1 antagonists as a therapeutic strategy to improve digestive disorders associated with irritable bowel syndrome is inconclusive to date, CORT108297 could be a promising therapeutic tool in the care of patients suffering from IBS.

Studies on the consequences of inflammatory stress on the neurochemical phenotype of ENS neurons have instead shown a decrease in cholinergic neurotransmission (29). Indeed, experiences on TBNS-induced colitis showed a significant reduction in choline uptake, acetylcholine release and contractile response to stimulation of enteric nerves. TNBS-induced

colitis is associated with progressive and selective alterations in myenteric plexus structure and function, with consequent reduction of cholinergic neurotransmission and abnormality in colonic contractility (30). In inflammatory situation, the remodeling of the enteric neuron phenotype is linked to direct interaction between cytokines produced by immune cells, and neural membranes (31,32). The consequences of psychological stress on the remodeling of the neurochemical phenotype of enteric neurons therefore appear to be quite different from the effects of inflammation and therefore suggest quite independent mechanisms. Since the involvement of GR is not mentioned in the inflammatory phenomenon, the neuroplasticity observed in the inflammation is certainly very different from that of repeated psychological stress.

References

1. Meerveld BG-V, Johnson AC. Mechanisms of Stress-induced Visceral Pain. *J Neurogastroenterol Motil.* 30 janv 2018;24(1):7- 18.
2. Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol.* mars 2005;20(3):332- 9.
3. Reed DE, Zhang Y, Beyak MJ, Lourenssen S, Blennerhassett MG, Paterson WG, et al. Stress increases descending inhibition in mouse and human colon. *Neurogastroenterol Motil.* avr 2016;28(4):569- 80.
4. Taché Y, Bonaz B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest.* 2 janv 2007;117(1):33- 40.
5. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* mai 2012;9(5):286- 94.
6. Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, des Varannes SB, Rolli-Derkinderen M. The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* févr 2013;10(2):90- 100.
7. Taché Y, Kiank C, Stengel A. A role for corticotropin-releasing factor in functional gastrointestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep.* août 2009;11(4):270- 7.
8. Tache Y, Perdue MH. Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil.* avr 2004;16(s1):137- 42.
9. Moussaoui N, Braniste V, Ait-Belgnaoui A, Gabanou M, Sekkal S, Olier M, et al. Changes in Intestinal Glucocorticoid Sensitivity in Early Life Shape the Risk of Epithelial Barrier Defect in Maternal-Deprived Rats. Foligne B, éditeur. *PLoS ONE.* 20 févr 2014;9(2):e88382.
10. Gourcerol G, Wu SV, Yuan P, Pham H, Miampamba M, Larauche M, et al. Activation of Corticotropin-Releasing Factor Receptor 2 Mediates the Colonic Motor Coping Response to Acute Stress in Rodents. *Gastroenterology.* mai 2011;140(5):1586-1596.e6.
11. Tache Y, Larauche M, Yuan P-Q, Million M. Brain and Gut CRF Signaling: Biological Actions and Role in the Gastrointestinal Tract. *CMP [Internet].* 3 janv 2018 [cité 9 mai 2021];11(1). Disponible sur: <http://www.eurekaselect.com/150407/article>
12. Zheng G, Wu S-P, Hu Y, Smith DE, Wiley JW, Hong S. Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner: Corticosterone and colon tight junction protein. *Neurogastroenterology & Motility.* févr 2013;25(2):e127- 39.
13. Larauche M, Kiank C, Tache Y. CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR SIGNALING IN COLON AND ILEUM: REGULATION BY STRESS AND PATHOPHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS. 2012;27.

14. Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Okumura T. Water-avoidance stress enhances gastric contractions in freely moving conscious rats: role of peripheral CRF receptors. *J Gastroenterol*. 2014;7.
15. Meyer M, Gonzalez Deniselle MC, Hunt H, Kloet ER de, De Nicola AF. The selective glucocorticoid receptor modulator CORT108297 restores faulty hippocampal parameters in Wobbler and corticosterone-treated mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. sept 2014;143:40- 8.
16. Gourcerol G, Wu SV, Yuan P, Pham H, Miampamba M, Larauche M, et al. Activation of Corticotropin-Releasing Factor Receptor 2 Mediates the Colonic Motor Coping Response to Acute Stress in Rodents. *Gastroenterology*. 1 mai 2011;140(5):1586-1596.e6.
17. Taché Y. Corticotrophin-releasing factor 1 activation in the central amygdale and visceral hyperalgesia. *Neurogastroenterol Motil*. janv 2015;27(1):1- 6.
18. LARAUCHE M, KIANK C, TACHE Y. CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR SIGNALING IN COLON AND ILEUM: REGULATION BY STRESS AND PATHOPHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS. *J Physiol Pharmacol*. déc 2009;60(Suppl 7):33- 46.
19. Lerch JK, Alexander JK, Madalena KM, Motti D, Quach T, Dhamija A, et al. Stress Increases Peripheral Axon Growth and Regeneration through Glucocorticoid Receptor-Dependent Transcriptional Programs. *eNeuro*. août 2017;4(4).
20. Miampamba M, Million M, Yuan P-Q, Larauche M, Taché Y. Water avoidance stress activates colonic myenteric neurons in female rats. *Neuroreport*. 7 mai 2007;18(7):679- 82.
21. Williamson M, Garg R, Wells CM. PlexinB1 Promotes Nuclear Translocation of the Glucocorticoid Receptor. *Cells* [Internet]. 18 déc 2019 [cité 31 mars 2021];9(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7017238/>
22. Stavreva DA, Wiench M, John S, Conway-Campbell BL, McKenna MA, Pooley JR, et al. Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat Cell Biol*. sept 2009;11(9):1093- 102.
23. Haché RJG, Tse R, Reich T, Savory JGA, Lefebvre YA. Nucleocytoplasmic Trafficking of Steroid-free Glucocorticoid Receptor*. *Journal of Biological Chemistry*. 15 janv 1999;274(3):1432- 9.
24. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids-Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am*. févr 2016;42(1):15- 31.
25. Aubert P, Oleynikova E, Rizvi H, Ndjim M, Le Berre-Scoul C, Grohard PA, et al. Maternal protein restriction induces gastrointestinal dysfunction and enteric nervous system remodeling in rat offspring. *FASEB J*. janv 2019;33(1):770- 81.
26. Gershon MD. Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol*. juin 2005;39(5 Suppl 3):S184-193.
27. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*. 3 juill 2000;81(1- 3):87- 96.

28. Ford AC, Lacy BE, Talley NJ. Irritable Bowel Syndrome. *N Engl J Med*. 29 juin 2017;376(26):2566- 78.
29. Vieira C, Ferreira F, Magalhães-Cardoso MT, Silva I, Marques P, Correia-de-Sá P. Post-inflammatory Ileitis Induces Non-neuronal Purinergic Signaling Adjustments of Cholinergic Neurotransmission in the Myenteric Plexus. *Front Pharmacol* [Internet]. 8 nov 2017 [cité 1 avr 2021];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5682326/>
30. Poli E, Lazzaretti M, Grandi D, Pozzoli C, Coruzzi G. Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS-induced colitis. *Neurochem Res*. sept 2001;26(8- 9):1085- 93.
31. Collins SM, Hurst SM, Main C, Stanley E, Khan I, Blennerhassett P, et al. Effect of inflammation of enteric nerves. Cytokine-induced changes in neurotransmitter content and release. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;664:415- 24.
32. Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, et al. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci*. 30 juin 2006;126- 127:264- 72.

4. Conclusion

L'objectif de la présente étude était de répondre à la question suivante : En conditions de stress chronique, les glucocorticoïdes peuvent-ils activer les neurones du SNE via les récepteurs GR et induire des changements dans la motilité intestinale ?

Les résultats de notre étude ont montré, par le biais de notre modèle animal WAS, qu'un stress psychologique répété peut moduler la fonction motrice intestinale.

Le modèle de stress WAS, ou Water Avoidance Stress, que nous avons utilisé consistant en l'application d'une heure de stress d'évitement de l'eau répétée pendant 4 jours consécutifs, a été validé par notre laboratoire et nous apparaît adapté à la problématique étudiée notamment concernant son effet sur l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (HPA) et la motilité intestinale, notre critère d'étude principal. Il est apparu que ce modèle provoque d'une part une activation de l'axe HPA, que nous objectivons par l'hypercorticotéronémie chez les souris stressées. D'autre part, ce modèle induit une modification de la motricité colique mis en évidence *in vivo* par une augmentation du nombre de fèces émises au bout d'une heure (FPO), et *ex vivo* par une accentuation de la réponse motrice colique objectivée par une augmentation de la tension basale en réponse à une EFS.

Les données de la littérature ont consolidé le choix de notre modèle. Plusieurs équipes (102) (52) (114) (91) (114) (115) ont clairement établi que le stress aigu, notamment le WAS, stimule le transit colique et la défécation, diminue la vidange gastrique, et augmente la perméabilité intestinale. Les modèles de WAS décrits dans la littérature portent principalement sur une durée de protocole de 10 jours, qui contraste avec notre modèle WAS/4 jours. Liang et ses collaborateurs mettaient en évidence une augmentation de la motilité colique *in vivo* et *ex vivo* (115). Leur étude s'intéressait à un modèle de rats subissant un stress par WAS pendant 1h, 10 jours consécutifs. Ils ont observé une FPO significativement plus élevée chez les rats WAS par rapport aux rats contrôles au bout de 5 jours de stress. Ils ont également mis en évidence une différence dans l'amplitude et la fréquence des contractions spontanées de fragments du côlon proximal entre les deux groupes, associée à une désynchronisation des peptides de l'axe cerveau-intestin et des hormones gastro-intestinales. Leur étude a également montré que les rats WAS se sont adaptés au stress chronique ; le test du FPO n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes au bout de 10 jours de stress. Ces résultats sont conformes à l'observation clinique selon laquelle les patients atteints du syndrome de l'intestin irritable (SII) ne sont pas intolérants aux événements stressants journaliers mais développent un côlon irritable ou spastique sous l'effet de divers facteurs de stress aigus.

Le choix de notre modèle a ainsi été étayé par l'appui des données issues de la littérature, ajoutées aux résultats préliminaires obtenus au laboratoire, ainsi que par l'optimisation de la durée du protocole et la méthode peu agressive de stress utilisée.

Le système nerveux entérique est un réseau intégratif constitué de plus de 200 millions de neurones situé tout le long du tube digestif. Il participe à la régulation des fonctions gastro-intestinales telles que la motilité et la sécrétion (45) (104) (34). Les relations entre le SNE et

les troubles gastro-intestinaux ont largement été étudiées. En effet, le stress aigu ou chronique est associé à une stimulation de l'axe HPA, caractérisée par la sécrétion de CRH par l'hypothalamus, entraînant la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse, qui enfin stimule la sécrétion de glucocorticoïdes (GCs) par les glandes surrénales (53) (103) (56) (52).

Il est aujourd'hui reconnu que les hormones du stress agissent sur le tractus digestif. Il a notamment été démontré que la CRH contribue aux changements induits par le stress dans la motilité intestinale et les fonctions de la muqueuse intestinale. Cela s'explique par le fait que les neurones entériques expriment les récepteurs CRF1 et CRF2 (56) (80). CRF1 est exprimé de manière spécifique dans l'iléon et le colon chez les rongeurs et chez l'homme (52). L'activation de CRF1 par la CRH induit une réponse motrice colique similaire à celle induite par le stress. A l'inverse, l'activation du récepteur CRF2 atténuerait la réponse au stress. Cependant, si les antagonistes des récepteurs à la CRH préviennent les troubles gastro-intestinaux liés au stress dans des modèles animaux, leur efficacité pour soulager les maladies intestinales fonctionnelles chez les patients n'a pas été démontrée (80) (53) (52) (102).

Avec le récepteur GR, nous introduisons un nouvel acteur de l'axe HPA potentiellement impliqué dans la dysfonction motrice intestinale liée au stress. L'expression du GR par les neurones périphériques avait déjà été validée dans les neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale (DRG) (84). En réponse aux GCs, la croissance des neurites des DRG augmente par des mécanismes impliquant la transcription de gènes dépendant du GR. *In vivo*, l'exposition préalable à un stress aigu augmente la régénération des nerfs périphériques, soulignant la capacité des GCs à induire une plasticité neuronale.

En revanche, l'expression du GR n'avait jamais été démontrée dans les neurones entériques. Au-delà de son expression ubiquitaire dans quasiment la totalité des types cellulaires (foie, prostate, glandes salivaires, glande thyroïde, poumon, muscle...), au niveau intestinal l'expression du récepteur GR en périphérie n'est connue que dans d'autres contingents cellulaires que les neurones, à savoir les cellules épithéliales, les myocytes, les cellules immunitaires, les fibroblastes, etc. Elle a néanmoins été largement étudiée au niveau du SNC (116).

Notre étude est la première, à notre connaissance, à démontrer l'expression du récepteur GR par les neurones du plexus myentérique du SNE de colon distal. L'analyse par microscopie confocale a révélé une localisation préférentielle du récepteur GR dans le noyau des neurones, en utilisant un triple marquage (ciblant la protéine neuronale Hu, le récepteur GR et le noyau des neurones (marquage DAPI)). Nous ne savons pas si l'expression du récepteur GR par les neurones du SNE est spécifique à une région, puisque nous avons limité l'étude au côlon distal chez la souris.

L'objectif de l'étude étant de comprendre si les GCs peuvent activer les neurones du SNE via le récepteur GR conduisant aux troubles digestifs observés en conditions de stress. Il a été montré que les souris WAS présentaient une corticostérolémie significativement plus élevée que les souris du groupe contrôle. En condition basale, le récepteur GR a une localisation cellulaire cytoplasmique. Il se dimérise puis se transloque au noyau après fixation de son ligand (le cortisol chez l'homme et la corticostérone chez les rongeurs). Dans notre étude, bien que nous ayons observé une localisation nucléaire du récepteur GR dans les neurones du

SNE de souris contrôles, le rapport nucléo-cytoplasmique de la localisation de GR était significativement plus élevé dans le groupe de souris stressées. Ce résultat peut être dû à l'effet de la corticostérone des souris WAS, expliquant cette activation de GR. L'observation du récepteur GR sous forme activé dans les neurones des souris contrôles peut s'expliquer d'une part par l'activation constitutive du récepteur impliqué dans de nombreux processus métaboliques, et d'autre part par les conditions expérimentales. En effet, les souris contrôles ont également été manipulées et sacrifiées au cours de l'étude, et par conséquent étaient aussi quelque peu stressées.

Nous avons également mis en évidence des cellules non-Hu, présentes dans le plexus myentérique, qui expriment fortement GR avec une localisation nucléaire du marquage. Ces cellules sont probablement des cellules gliales ou des fibroblastes.

Après sa translocation nucléaire le récepteur GR activé peut moduler l'expression de divers gènes (117). De manière intéressante, nous avons remarqué une augmentation des neurones exprimant la ChAT dans le groupe de souris stressées. Le lien entre l'activation du complexe GR et la modulation de l'expression de la ChAT n'a pas encore été démontré. Cependant une étude précédente a mis en évidence que le traitement de cultures cellulaires de SNE par la corticostérone induisait une augmentation de la proportion de neurones cholinergiques (113). A l'inverse, l'analyse de plexus myentérique par immunohistofluorescence n'a révélé aucune modification dans la proportion de neurones nitrergiques NOS, impliqués dans la relaxation musculaire, entre les deux groupes.

Cette augmentation de la proportion de neurones excitateurs cholinergiques est associée à une dérégulation de la fonction motrice intestinale dans le groupe de souris WAS. La neurostimulation de biopsies de côlon distal issues de souris WAS induit une augmentation de la réponse contractile en conditions basales, par comparaison aux souris contrôles. Par ailleurs l'analyse pharmacologique a montré d'une part que la réponse contractile à l'EFS du côlon distal reste plus élevée après l'ajout de L-Name, un inhibiteur nitrergique, chez les souris stressées que chez les souris contrôles, et d'autre part qu'elle reste inchangée entre les deux groupes après l'ajout d'atropine, antagoniste cholinergique. L'agoniste des récepteurs muscariniques, le betanechol, a induit une augmentation dose-dépendante similaire de la réponse contractile dans les tissus des souris contrôles et stressées, indiquant qu'il n'y a pas de différence dans la réponse des tissus aux stimuli cholinergiques. On peut ainsi en déduire que cette augmentation de la réponse contractile semble liée à une libération accrue d'acétylcholine alors que la sensibilité du muscle à l'ACh reste la même.

La libération d'ACh par les neurones du SNE est associée à des réflexes péristaltiques et sécrétoires accrus et à une diminution du temps de transit intestinal (118). L'observation d'une augmentation de la FPO chez nos souris stressées est donc tout à fait cohérente avec cette augmentation de la proportion de neurones ChAT. Nous montrons ici pour la première fois que le stress agit via le SNE sur la motricité colique.

Enfin, nous avons pu démontrer que l'administration d'un antagoniste spécifique du récepteur GR, le CORT108297, à une dose de 85mg/kg pendant 4 jours, permet une diminution de la FPO chez nos souris soumises au WAS. Cette restitution de la motricité intestinale n'apparaît pas au premier jour de traitement, probablement en raison de la présence d'autres facteurs qui

la régulent également, notamment la CRH. Cette observation suggère clairement que GR est impliqué dans ces altérations liées au stress.

L'utilisation d'un antagoniste spécifique du GR tel que le CORT108297 n'a jamais été étudiée dans la gestion des pathologies digestives liées au stress. En revanche, plusieurs équipes se sont penchées sur l'administration du RU486, un antagoniste non sélectif de GR, pour traiter les désordres digestifs liés au stress. Une étude a précédemment montré qu'un blocage pharmacologique du récepteur GR au niveau de l'amygdale par une administration de RU486 bloquait les altérations de motricité intestinale et l'hypersensibilité viscérale dues au stress chronique (119). Le noyau central de l'amygdale (CeA) permet par l'innervation directe et indirecte du noyau du tractus solitaire, du locus coeruleus et des noyaux hypothalamiques, une modulation des réponses de l'axe HPA, de la vidange gastrique et la motilité du colon. Dans leur étude, l'équipe de Zheng *et al.* se sont intéressés à un modèle de rats subissant un stress WAS pendant 1h, 10 jours consécutifs. Ils ont observé une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées, associée à une augmentation de la perméabilité dans le côlon seulement. Ces résultats étaient reproduits par une série d'injections de corticostérone, et corrigés par l'administration du RU486 (91).

Cependant, l'antagoniste utilisé n'est pas sélectif du récepteur GR aux glucocorticoïdes. En plus de son effet antiglucocorticoïde, le RU486 a un effet antiprogestatif par son action sur le récepteur PR à la progestérone, et un effet antiandrogénique de par son action sur le récepteur AR aux androgènes. L'administration du RU486 peut conduire à l'induction d'effets secondaires non souhaités et à une incertitude sur son mécanisme d'action.

Le CORT108297 a récemment été mis en évidence comme antagoniste sélectif du récepteur GR. Les études décrivent une forte affinité de l'antagoniste pour le récepteur GR, avec un K_i mesuré sur culture cellulaire *in vitro* variant de 0.27nM (hépatocytes de rat) à 0.9nM (cellules mammaires cancéreuses de souris). Cette variabilité s'explique par les différents isoformes du récepteur exprimés par les espèces murines (rat et souris). Des études antérieures indiquent que l'administration de CORT108297 pendant une durée de 5 jours réduit la sécrétion de corticostérone à la suite d'une épreuve de nage forcée chez des rats non stressés préalablement (101). L'équipe de Zalachoras *et al.* a montré que le CORT108297, en agissant sur l'hippocampe, réverse la répression des gènes régulés par GR et bloque la suppression de la neurogenèse induite par la corticostérone. Il favorise l'expression du facteur neurotrophique BDNF. Ils ont aussi montré qu'en agissant sur le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, l'agent pharmacologique induit une augmentation de l'expression de c-Fos, facteur de transcription nucléaire favorisant l'induction de la transcription d'un gène (93).

Le CORT108297 nous a par conséquent semblé plus adapté, compte-tenu de son profil pharmacologique, pour bloquer GR et confirmer ou non son implication dans les altérations de la motilité digestive.

Le syndrome du côlon irritable (SII) est un trouble fonctionnel chronique de l'intestin caractérisé par des altérations des fonctions sensorielles et motrices (120). A l'heure actuelle, aucune stratégie thérapeutique n'a clairement été identifiée pour améliorer les troubles digestifs associés au SII. Bien que l'utilisation d'antagonistes agissant à plusieurs niveaux de l'axe HPA (antagoniste du récepteur CRF1 et le RU486, antagoniste non sélectif du récepteur GR) se soit avérée efficace dans des modèles murins, aucun n'a semblé concluant chez

l'homme. A ce jour, les résultats préliminaires obtenus avec le CORT108297 nous laissent penser qu'il pourrait être un outil thérapeutique prometteur dans la prise en charge des patients souffrant du SII.

5. Perspectives

Ce premier travail a permis de répondre à notre problématique : le récepteur GR semble être impliqué dans les troubles de la motricité digestive associés à un stress chronique.

Cependant il doit être complété par des analyses complémentaires, actuellement en cours de réalisation. En effet les cibles de GR sont variées et sont cellules et tissus dépendants. Aucune étude ne permet de prédire quels gènes sont sous la direction de GR, probablement car beaucoup de paramètres rentrent en jeu : le récepteur peut agir de façon directe, indirecte, en interaction avec des facteurs de transcription... Pour ces raisons il est difficile d'établir la relation directe entre l'activation de GR et la neuromodulation du SNE associée, à savoir l'augmentation de la proportion de neurones ChAT.

Une précédente étude a montré que le traitement de cultures cellulaires de SNE par la corticostérone induisait une augmentation de la proportion de neurones cholinergiques (113). Par ailleurs, nous avons pu confirmer ces travaux *in vivo* en ayant montré à travers notre modèle WAS qu'un stress chronique induisait cette neuromodulation neurochimique. Ce même modèle favorise la translocation nucléaire du récepteur GR. Nous avons également montré par le biais d'un traitement pharmacologique, que l'on peut restituer de façon progressive la fonction motrice intestinale avec un antagoniste spécifique du récepteur GR. Il reste à voir si cette restitution fonctionnelle est associée à une remodulation phénotypique du SNE.

Une étude du décryptage moléculaire entre l'activation de GR et la neuromodulation de la ChAT est en cours afin d'établir un lien. Pour cela, une étude par RNA-seq permettra de déterminer le profil transcriptomique de l'activation de GR au niveau neuronal. Cette analyse constituera la preuve du concept selon laquelle l'activation de GR des neurones du plexus myentérique du SNE induit une neuromodulation neurochimique. Il sera alors nécessaire de faire le lien entre l'expression des gènes activés par GR, dont potentiellement la ChAT, et la neuromodulation associée. En effet, l'augmentation de l'expression de la ChAT en conditions de stress n'est pas nécessairement directement reliée à l'activation de GR dans un premier temps, et à la conséquence fonctionnelle, à savoir l'augmentation de la motilité intestinale dans un second temps.

Ainsi dans le but de récupérer des tissus de colons distaux, l'expérimentation animale a été renouvelée. Contrairement à la première série d'expérimentation où nous avons uniquement isolé, après microdissection des colons distaux des animaux, le plexus myentérique, nous isolerons le LMMP (Longitudinal Muscle Myentérique Plexus) qui correspond à l'isolement du muscle longitudinal associé au plexus myentérique et sous-muqueux. En effet, il est difficile d'isoler les neurones du plexus myentérique. En isolant le LMMP, nous enrichirons en tissu neuronal, facilitant notre analyse. Nous pourrions ainsi déterminer quels sont les gènes du LMMP spécifiquement activés par le stress (et notamment GR) et si le stress induit une

activation de GR dans les neurones, et non dans d'autres contingents cellulaires du tube digestif.

Enfin, compte-tenu de la cinétique de translocation du récepteur, nous prévoyons d'utiliser un modèle cellulaire de culture primaire de SNE stimulé par la corticostérone et en présence ou en absence de l'antagoniste sélectif de GR, le CORT108297. Nous pourrions alors établir quels sont les gènes neuronaux qui subissent une régulation transcriptionnelle sous l'action des glucocorticoïdes par l'analyse du profil transcriptomique de GR, et vérifier que ces gènes sont surexprimés, à la fois en culture primaire et dans le LMMP isolé.

Bibliographie

1. Moussaoui N, Jacobs JP, Larauche M, Biraud M, Million M, Mayer E, et al. Chronic Early-life Stress in Rat Pups Alters Basal Corticosterone, Intestinal Permeability, and Fecal Microbiota at Weaning: Influence of Sex. *J Neurogastroenterol Motil.* 30 janv 2017;23(1):135-43.
2. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* juill 2009;5(7):374-81.
3. Davies KJA. Adaptive homeostasis. *Mol Aspects Med.* juin 2016;49:1-7.
4. McEwen BS. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiol Rev.* juill 2007;87(3):873-904.
5. Mason JW. A Historical View of the Stress Field. *J Human Stress.* juin 1975;1(2):22-36.
6. Schneiderman N, Ironson G, Siegel SD. Stress and Health: Psychological, Behavioral, and Biological Determinants. *Annu Rev Clin Psychol.* avr 2005;1(1):607-28.
7. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci.* juin 2002;3(6):453-62.
8. Larrieu T, Sandi C. Stress-Induced Depression: Is Social Rank a Predictive Risk Factor? *BioEssays.* juill 2018;40(7):1800012.
9. LeDoux JE. Emotion Circuits in the Brain. :31.
10. Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM. The Influence of Stress Hormones on Fear Circuitry. *Annu Rev Neurosci.* juin 2009;32(1):289-313.
11. Moisan M-P, Le Moal M. Le stress dans tous ses états. *médecine/sciences.* juin 2012;28(6-7):612-7.
12. Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS. Stress-Induced Norepinephrine Release in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus and Pituitary-Adrenocortical and Sympathoadrenal Activity: In Vivo Microdialysis Studies. *Front Neuroendocrinol.* avr 1995;16(2):89-150.
13. Chan S, Debono M. Review: Replication of cortisol circadian rhythm: new advances in hydrocortisone replacement therapy. *Ther Adv Endocrinol Metab.* août 2010;1(3):129-38.
14. Spencer RL, Deak T. A users guide to HPA axis research. *Physiol Behav.* sept 2017;178:43-65.
15. Schwabe L, Wolf OT, Oitzl MS. Memory formation under stress: Quantity and quality. *Neurosci Biobehav Rev.* mars 2010;34(4):584-91.
16. Diamond DM, Campbell AM, Park CR, Halonen J, Zoladz PR. The Temporal Dynamics Model of Emotional Memory Processing: A Synthesis on the Neurobiological Basis of Stress-Induced Amnesia, Flashbulb and Traumatic Memories, and the Yerkes-Dodson Law. *Neural Plast.* 2007;2007:1-33.

17. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci.* juin 2002;3(6):453-62.
18. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci.* janv 2012;13(1):22-37.
19. de Quervain DJ-F, Aerni A, Schelling G, Roozendaal B. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol.* août 2009;30(3):358-70.
20. Arango-Lievano M, Lambert WM, Bath KG, Garabedian MJ, Chao MV, Jeanneteau F. Neurotrophic-priming of glucocorticoid receptor signaling is essential for neuronal plasticity to stress and antidepressant treatment. *Proc Natl Acad Sci.* 22 déc 2015;112(51):15737-42.
21. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci.* juin 2009;10(6):423-33.
22. McEwen BS, Morrison JH. The Brain on Stress: Vulnerability and Plasticity of the Prefrontal Cortex over the Life Course. *Neuron.* juill 2013;79(1):16-29.
23. Moghaddam B. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry.* mai 2002;51(10):775-87.
24. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* juin 2005;6(6):463-75.
25. Chaouloff F, Groc L. Temporal modulation of hippocampal excitatory transmission by corticosteroids and stress. *Front Neuroendocrinol.* janv 2011;32(1):25-42.
26. Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.* janv 2002;70(7):735-44.
27. Gray JD, Kogan JF, Marrocco J, McEwen BS. Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nat Rev Endocrinol.* nov 2017;13(11):661-73.
28. Hansen MB. The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification. *Pharmacol Toxicol.* mars 2003;92(3):105-13.
29. Bernex F. Les cellules interstitielles de Cajal : études histologique et physiopathologique. Ou l'histoire d'une cellule encore bien mystérieuse au 21^{ème} siècle. *Bull Académie Vét Fr.* 2006;(1):247.
30. Bayliss WM, Starling EH. The movements and the innervation of the large intestine. *J Physiol.* 31 déc 1900;26(1-2):107-18.
31. Langley JN, Magnus R. Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. *J Physiol.* 8 sept 1905;33(1):34-51.
32. Paillusson S, Lebouvier T, Pouclet H, Coron E, Bruley des Varannes S, Damier P, et al. Système nerveux entérique et maladie de Parkinson. *Rev Médecine Interne.* juin 2012;33(6):335-8.
33. Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci.* juin 2007;8(6):466-79.

34. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* mai 2012;9(5):286-94.
35. Olsson C, Holmgren S. Autonomic control of gut motility: A comparative view. *Auton Neurosci.* nov 2011;165(1):80-101.
36. Benarroch EE. Enteric nervous system: Functional organization and neurologic implications. *Neurology.* 13 nov 2007;69(20):1953-7.
37. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* mai 2012;9(5):286-94.
38. Berthoud H-R, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci.* déc 2000;85(1-3):1-17.
39. Brégeon J, Coron E, Da Silva ACC, Jaulin J, Aubert P, Chevalier J, et al. Sacral nerve stimulation enhances early intestinal mucosal repair following mucosal injury in a pig model: Sacral nerve stimulation enhances intestinal mucosal repair. *J Physiol.* 1 août 2016;594(15):4309-23.
40. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* déc 2007;33(6):599-614.
41. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. BRAIN-GUT AXIS AND ITS ROLE IN THE CONTROL OF FOOD INTAKE. :18.
42. Costa M. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut.* 1 déc 2000;47(90004):15iv-19.
43. Furness J. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol.* janv 1998;54(1):1-18.
44. Ward SM. Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission. *Gut.* 1 déc 2000;47(90004):40iv-43.
45. Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, des Varannes SB, Rolli-Derkinderen M. The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* févr 2013;10(2):90-100.
46. Hansen MB. The Enteric Nervous System II: Gastrointestinal Functions: THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM AND GASTROINTESTINAL FUNCTIONS. *Pharmacol Toxicol.* juin 2003;92(6):249-57.
47. Galligan JJ, Jiang MM, Shen KZ, Surprenant A. Substance P mediates neurogenic vasodilatation in extrinsically denervated guinea-pig submucosal arterioles. *J Physiol.* 1 janv 1990;420(1):267-80.
48. Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Labois CL, et al. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* nov 2003;285(5):G1028-36.
49. Gareau MG, Jury J, Perdue MH. Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* juill 2007;293(1):G198-203.

50. Conlin VS, Wu X, Nguyen C, Dai C, Vallance BA, Buchan AMJ, et al. Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium* -induced colitis. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. oct 2009;297(4):G735-50.
51. Fukudo S, Nomura T, Hongo M. Impact of corticotropin-releasing hormone on gastrointestinal motility and adrenocorticotrophic hormone in normal controls and patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 1 juin 1998;42(6):845-9.
52. Larauche M, Kiank C, Tache Y. CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR SIGNALING IN COLON AND ILEUM: REGULATION BY STRESS AND PATHOPHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS. 2012;27.
53. Taché Y, Million M. Role of Corticotropin-releasing Factor Signaling in Stress-related Alterations of Colonic Motility and Hyperalgesia. *J Neurogastroenterol Motil*. 1 janv 2015;21(1):008-24.
54. Fukudo S, Suzuki J. Colonic motility, autonomic function, and gastrointestinal hormones under psychological stress on irritable bowel syndrome. *Tohoku J Exp Med*. 1987;151(4):373-85.
55. Dive A. Troubles de la motilité gastro-intestinale chez le patient critique. *Réanimation*. juill 2008;17(5):454-61.
56. Gourcerol G, Wu SV, Yuan P, Pham H, Miampamba M, Larauche M, et al. Activation of Corticotropin-Releasing Factor Receptor 2 Mediates the Colonic Motor Coping Response to Acute Stress in Rodents. *Gastroenterology*. mai 2011;140(5):1586-1596.e6.
57. Enck P, Aziz Q, Barbara G, Farmer AD, Fukudo S, Mayer EA, et al. Irritable bowel syndrome. *Nat Rev Dis Primer*. 22 déc 2016;2(1):16014.
58. Sweetser S, Camilleri M, Nord SJL, Burton DD, Castenada L, Croop R, et al. Do corticotropin releasing factor-1 receptors influence colonic transit and bowel function in women with irritable bowel syndrome? 2009;296:8.
59. Nozu T, Okumura T. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 interaction in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol*. août 2015;50(8):819-30.
60. Breuner C, Orchinik M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol*. 1 oct 2002;175(1):99-112.
61. Wyrwoll CS, Holmes MC, Seckl JR. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: From zero to hero, a decade of progress. *Front Neuroendocrinol*. août 2011;32(3):265-86.
62. Agarwal MK. Perspectives in receptor-mediated mineralocorticoid hormone action. *Pharmacol Rev*. mars 1994;46(1):67-87.
63. Lu NZ, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol*. juin 2006;16(6):301-7.
64. Vandevyver S, Dejager L, Libert C. On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back: Nuclear Transport of Glucocorticoid Receptor. *Traffic*. mars 2012;13(3):364-74.
65. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger J-D, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*. févr 1994;367(6462):463-7.

66. Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, et al. SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 1 févr 2001;280(2):F303-13.
67. Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joels M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci.* 27 déc 2005;102(52):19204-7.
68. Munier M, Law F, Meduri G, Le Menuet D, Lombès M. Mineralocorticoid Receptor Overexpression Facilitates Differentiation and Promotes Survival of Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. *Endocrinology.* 1 mars 2012;153(3):1330-40.
69. Le Menuet D, Lombès M. The neuronal mineralocorticoid receptor: From cell survival to neurogenesis. *Steroids.* déc 2014;91:11-9.
70. Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* nov 2013;132(5):1033-44.
71. Lecomte P. Résistance aux glucocorticoïdes - Glucocorticoid resistance. *Métabolismes Horm Diabètes Nutr.* 2006;10.
72. Arnett MG, Muglia LM, Laryea G, Muglia LJ. Genetic Approaches to Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation. *Neuropsychopharmacology.* janv 2016;41(1):245-60.
73. Arnsten AFT, Raskind MA, Taylor FB, Connor DF. The effects of stress exposure on prefrontal cortex: Translating basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder. *Neurobiol Stress.* janv 2015;1:89-99.
74. Gagliardi L, Le Jeune C. Corticothérapie et diabète. *Presse Médicale.* avr 2012;41(4):393-9.
75. Darmon P, Dadoun F, Boullu-Ciocca S, Grino M, Alessi M-C, Dutour A. Insulin resistance induced by hydrocortisone is increased in patients with abdominal obesity. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* nov 2006;291(5):E995-1002.
76. Mitch WE. MECHANISMS ACCELERATING MUSCLE ATROPHY IN CATABOLIC DISEASES. :13.
77. Samra JS, Clark ML, Humphreys SM, MacDonald IA, Bannister PA, Frayn KN. Effects of Physiological Hypercortisolemia on the Regulation of Lipolysis in Subcutaneous Adipose Tissue1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 févr 1998;83(2):626-31.
78. Oprea A, Bonnet NCG, Pollé O, Lysy PA. Novel insights into glucocorticoid replacement therapy for pediatric and adult adrenal insufficiency. *Ther Adv Endocrinol Metab.* janv 2019;10:204201881882129.
79. Jacqz-Aigrain E, Burtin P, Azevedo I, Cavaillon J, Cezard J, Czernichow P, et al. Les corticoïdes: pharmacologie et indications des cures courtes en pédiatrie. *Arch Pédiatrie.* avr 1995;2(4):353-64.
80. Taché Y, Bonaz B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest.* 2 janv 2007;117(1):33-40.
81. Mawdsley JE. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut.* 1 oct 2005;54(10):1481-91.

82. Decorti G, De Iudicibus S, Stocco G, Martelossi S, Drigo I, Bartoli F, et al. Glucocorticoid receptor polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Gut*. juill 2006;55(7):1053-4.
83. Binder EB. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*. déc 2009;34:S186-95.
84. Lerch JK, Alexander JK, Madalena KM, Motti D, Quach T, Dhamija A, et al. Stress Increases Peripheral Axon Growth and Regeneration through Glucocorticoid Receptor-Dependent Transcriptional Programs. *eneuro*. juill 2017;4(4):ENEURO.0246-17.2017.
85. Boivin MA, Ye D, Kennedy JC, Al-Sadi R, Shepela C, Ma TY. Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. févr 2007;292(2):G590-8.
86. Ahmed A, Schmidt C, Brunner T. Extra-Adrenal Glucocorticoid Synthesis in the Intestinal Mucosa: Between Immune Homeostasis and Immune Escape. *Front Immunol*. 25 juin 2019;10:1438.
87. Shenglong Zou, Ujendra Kumar. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*. 13 mars 2018;19(3):833.
88. Spitz IM, Bardin CW. Clinical pharmacology of RU 486—an antiprogestin and antiglucocorticoid. *Contraception*. nov 1993;48(5):403-44.
89. Heikinheimo O, Pesonen U, Huupponen R, Koulou M, Lahteenmaki P. Hepatic metabolism and distribution of mifepristone and its metabolites in rats. *Hum Reprod*. 1 juin 1994;9(suppl 1):40-6.
90. Sindelar DK, Carson MW, Morin M, Shaw J, Barr RJ, Need A, et al. LLY-2707, A Novel Nonsteroidal Glucocorticoid Antagonist That Reduces Atypical Antipsychotic-Associated Weight Gain in Rats. *J Pharmacol Exp Ther*. janv 2014;348(1):192-201.
91. Zheng G, Wu S-P, Hu Y, Smith DE, Wiley JW, Hong S. Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner: Corticosterone and colon tight junction protein. *Neurogastroenterol Motil*. févr 2013;25(2):e127-39.
92. Meyer M, Gonzalez Deniselle MC, Hunt H, Kloet ER de, De Nicola AF. The selective glucocorticoid receptor modulator CORT108297 restores faulty hippocampal parameters in Wobbler and corticosterone-treated mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. sept 2014;143:40-8.
93. Zalachoras I, Houtman R, Atucha E, Devos R, Tijssen AMI, Hu P, et al. Differential targeting of brain stress circuits with a selective glucocorticoid receptor modulator. *Proc Natl Acad Sci*. 7 mai 2013;110(19):7910-5.
94. Cotella EM, Morano RL, Wulsin AC, Martelle SM, Lemen P, Fitzgerald M, et al. Lasting Impact of Chronic Adolescent Stress and Glucocorticoid Receptor Selective Modulation in Male and Female Rats. *Psychoneuroendocrinology*. févr 2020;112:104490.
95. Viho EMG, Buurstede JC, Mahfouz A, Koorneef LL, van Weert LTCM, Houtman R, et al. Corticosteroid Action in the Brain: The Potential of Selective Receptor Modulation. *Neuroendocrinology*. 2019;109(3):266-76.

96. Meyer M, Gonzalez Deniselle MC, Hunt H, Kloet ER de, De Nicola AF. The selective glucocorticoid receptor modulator CORT108297 restores faulty hippocampal parameters in Wobbler and corticosterone-treated mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* sept 2014;143:40-8.
97. Beaudry JL, Dunford EC, Teich T, Zaharieva D, Hunt H, Belanoff JK, et al. Effects of Selective and Non-Selective Glucocorticoid Receptor II Antagonists on Rapid-Onset Diabetes in Young Rats. Tuckermann JP, éditeur. *PLoS ONE.* 18 mars 2014;9(3):e91248.
98. Pineau F, Canet G, Desrumaux C, Hunt H, Chevallier N, Ollivier M, et al. New selective glucocorticoid receptor modulators reverse amyloid- β peptide-induced hippocampus toxicity. *Neurobiol Aging.* sept 2016;45:109-22.
99. Nguyen ET, Streicher J, Berman S, Caldwell JL, Ghisays V, Estrada CM, et al. A mixed glucocorticoid/mineralocorticoid receptor modulator dampens endocrine and hippocampal stress responsivity in male rats. *Physiol Behav.* sept 2017;178:82-92.
100. Atucha E, Zalachoras I, van den Heuvel JK, van Weert LTCM, Melchers D, Mol IM, et al. A Mixed Glucocorticoid/Mineralocorticoid Selective Modulator With Dominant Antagonism in the Male Rat Brain. *Endocrinology.* 1 nov 2015;156(11):4105-14.
101. Solomon MB, Wulsin AC, Rice T, Wick D, Myers B, McKlveen J, et al. The selective glucocorticoid receptor antagonist CORT 108297 decreases neuroendocrine stress responses and immobility in the forced swim test. *Horm Behav.* avr 2014;65(4):363-71.
102. Million M, Zhao J-F, Luckey A, Czimmer J, Maynard GD, Kehne J, et al. The Newly Developed CRF1-Receptor Antagonists, NGD 98-2 and NGD 9002, Suppress Acute Stress-Induced Stimulation of Colonic Motor Function and Visceral Hypersensitivity in Rats. Price TJ, éditeur. *PLoS ONE.* 6 sept 2013;8(9):e73749.
103. Moussaoui N, Jacobs JP, Larauche M, Biraud M, Million M, Mayer E, et al. Chronic Early-life Stress in Rat Pups Alters Basal Corticosterone, Intestinal Permeability, and Fecal Microbiota at Weaning: Influence of Sex. *J Neurogastroenterol Motil.* 30 janv 2017;23(1):135-43.
104. Paillusson S, Lebouvier T, Pouclet H, Coron E, Bruley des Varannes S, Damier P, et al. Système nerveux entérique et maladie de Parkinson. *Rev Médecine Interne.* juin 2012;33(6):335-8.
105. Aranda CJ, Arredondo-Amador M, Ocón B, Lavín JL, Aransay AM, Martínez-Augustin O, et al. Intestinal epithelial deletion of the glucocorticoid receptor NR3C1 alters expression of inflammatory mediators and barrier function. *FASEB J.* déc 2019;33(12):14067-82.
106. Söderholm JD, Yates DA, Gareau MG, Yang P-C, MacQueen G, Perdue MH. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 1 déc 2002;283(6):G1257-63.
107. Medland JE, Pohl CS, Edwards LL, Frandsen S, Bagley K, Li Y, et al. Early life adversity in piglets induces long-term upregulation of the enteric cholinergic nervous system and heightened, sex-specific secretomotor neuron responses. *Neurogastroenterol Motil.* sept 2016;28(9):1317-29.
108. Hollis F, Kabbaj M. Social Defeat as an Animal Model for Depression. *ILAR J.* 1 janv 2014;55(2):221-32.
109. Katz RJ, Hersh S. Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* juin 1981;5(2):265-71.

110. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, et al. International Union of Pharmacology. LXV. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors. *Pharmacol Rev.* déc 2006;58(4):782-97.
111. David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang J-W, Marsteller D, Mendez I, et al. Neurogenesis-Dependent and -Independent Effects of Fluoxetine in an Animal Model of Anxiety/Depression. *Neuron.* mai 2009;62(4):479-93.
112. Neunlist M. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut.* 1 janv 2003;52(1):84-90.
113. Aubert P, Oleynikova E, Rizvi H, Ndjim M, Berre-Scoul CL, Grohard PA, et al. Maternal protein restriction induces gastrointestinal dysfunction and enteric nervous system remodeling in rat offspring. :12.
114. Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Okumura T. Water-avoidance stress enhances gastric contractions in freely moving conscious rats: role of peripheral CRF receptors. *J Gastroenterol.* 2014;7.
115. Liang C, Luo H, Liu Y, Cao J, Xia H. Plasma Hormones Facilitated the Hypermotility of the Colon in a Chronic Stress Rat Model. *PLoS ONE.* 2012;7(2):9.
116. Arango-Lievano M, Lambert WM, Bath KG, Garabedian MJ, Chao MV, Jeanneteau F. Neurotrophic-priming of glucocorticoid receptor signaling is essential for neuronal plasticity to stress and antidepressant treatment. *Proc Natl Acad Sci.* 22 déc 2015;112(51):15737-42.
117. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids. *Rheum Dis Clin N Am.* févr 2016;42(1):15-31.
118. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 2000;10.
119. Myers B, Greenwood-Van Meerveld B. Differential involvement of amygdala corticosteroid receptors in visceral hyperalgesia following acute or repeated stress. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* janv 2012;302(2):G260-6.
120. Ford AC, Lacy BE, Talley NJ. Irritable Bowel Syndrome. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med.* 29 juin 2017;376(26):2566-78.

Nom – Prénoms : Gautier Camille

Titre de la thèse : Augmentation de la motilité intestinale en conditions de stress : implication des récepteurs GR exprimés par les neurones du système nerveux entérique

Résumé de la thèse :

Le système nerveux entérique (SNE) régule la motilité intestinale et les fonctions de la barrière épithélio-intestinale. Il est aujourd'hui admis que le stress est associé à des troubles gastro-intestinaux, parmi lesquels le syndrome de l'intestin irritable. La physiopathologie n'en est pour autant pas clairement élucidée. La réponse biologique au stress implique l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (HPA), initiant une sécrétion de glucocorticoïdes (GCs). L'objectif de notre étude a été de montrer si, dans des conditions de stress, les GCs peuvent activer les neurones du SNE et induire des changements dans la motilité intestinale. Grâce à notre modèle animal de stress par évitement de l'eau (WAS), nous avons pu reproduire les effets du stress en induisant une augmentation de la motricité colique. Nous avons également pu montrer une translocation nucléaire des récepteurs aux GCs (GR) dans les neurones entériques coliques des souris WAS ainsi qu'une neuromodulation neurochimique. La normalisation de la motricité intestinale par l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs GR, le CORT108297, suggère un lien entre GR et les modifications observées.

MOTS CLÉS

AXE CERVEAU-INTESTIN, SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE, MOTILITÉ INTESTINALE, RÉCEPTEUR AUX GLUCOCORTICOÏDES, STRESS, WATER AVOIDANCE STRESS (WAS)

JURY

PRESIDENT: Mr Jean-Marie BARD, PU-PH de Biochimie et Biologie moléculaire

ASSESEURS: Mme Kalyane BACH-NGOHOU, MCU-PU de Biochimie
Mr Damien MASSON, PU-PH de Biochimie spécialisée
Mr Michel NEUNLIST, Directeur de recherche de l'unité Inserm U1235 (TENS)
Mr Denis DAVID, Professeur de Pharmacologie à l'Université Paris-Saclay, CESP-Inserm, équipe MOODS

Adresse de l'auteur : 23c rue des champs de haut, 35600 REDON