

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition

Présentée et soutenue par *Nabila MOUSSAOUI*
Le 18 mars 2014

Titre : *Effets d'un épisode de séparation maternelle sur l'intégrité de la barrière intestinale et sur le transcriptome hépatique chez le nouveau-né*

JURY

<i>Pr Philippe Valet</i>	<i>Président du Jury</i>
<i>Dr. Jean-Pierre Segain</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Dr. Gaëlle Boudry</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Dr. Frédérick Barreau</i>	<i>Examineur</i>
<i>Dr. Emmanuel Mas</i>	<i>Examineur</i>
<i>Dr. Eric Houdeau</i>	<i>Directeur de thèse</i>
<i>Dr. Pascal Martin</i>	<i>Directeur de thèse</i>

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries*
Unité de recherche : *UMR 1331 INRA/INP/UPS Toxalim*
Directeurs de Thèse : *Dr. Eric Houdeau et Dr Pascal Martin*

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein de l'unité Toxalim 1331 et financés par la région Midi-Pyrénées et l'Institut National de la Recherche Agronomique de Toulouse que je remercie vivement.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury :

Je remercie le Professeur Philippe Valet, directeur de l'unité INSERM U1048 de Toulouse de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je souhaiterais remercier le Docteur Jean Pierre Segain, directeur de recherche de l'UMR INRA 1280 de Nantes et le Docteur Gaëlle Boudry, chargée de recherche à l'UMR SENAH F de INRA de Rennes pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également le Docteur Frédérick Barreau, chargé de recherche de l'unité INSERM U1149 de Paris et le Docteur Emmanuel Mas, gastroentérologue pédiatre au Centre Hospitalier Universitaire Purpan de Toulouse, pour votre participation au jury en tant qu'examineurs.

Je souhaite remercier à présent mon directeur de thèse, le Docteur Eric Houdeau, pour avoir accepté d'encadrer cette thèse. Je te remercie pour tous tes conseils, tes compétences et surtout ta rigueur scientifique qui m'ont permis d'aboutir à ce travail de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Pascal Martin, qui a assuré le co-encadrement de ma thèse. Je te remercie pour la confiance que tu m'as témoignée dès le début, pour ta disponibilité et pour la justesse de tes critiques qui m'ont été constructives et utiles.

Je tiens également à remercier le Docteur Vassilia Théodorou, pour son accueil dans l'équipe. Je vous remercie pour tous vos conseils, vos encouragements et votre soutien constant.

J'adresse mes sincères remerciements et mon profond respect à monsieur le Docteur Jean Fioramonti pour vos connaissances de la physiologie et vos conseils très constructifs.

Merci également à monsieur le Docteur Lionel Bueno pour vos compétences scientifiques remarquables et vos critiques avisées.

Je remercie chaleureusement le Docteur Viorica Braniste pour m'avoir transmis tous son savoir faire mais aussi merci pour ta gentillesse et ta persévérance qui sont pour moi un réel exemple.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Afifa Ait-Belgnaoui pour ses connaissances en microbiologie dont j'ai pu bénéficier. Merci pour ton soutien, tes conseils et ta gentillesse.

Je remercie vivement le Docteur Laurence Guzylack pour sa disponibilité et ses critiques pertinentes.

Mes sincères remerciements vont également vers le Docteur Hélène Eutamène, pour sa gentillesse et ses encouragements.

Je remercie le Docteur Laurent Ferrier pour sa sympathie et bien sûr merci pour ton aide logistique que tu as assurée au quotidien qui m'a été d'une très grande aide.

Je remercie particulièrement le Docteur Sandrine Ménard pour sa disponibilité et ses conseils. Merci encore pour toutes nos discussions scientifiques que l'on a pu avoir et qui sont pour moi toujours enrichissantes.

Je remercie également le Docteur Christine Coméra pour sa sympathie, son humour et ses critiques constructives.

Je remercie l'ensemble des personnes avec qui j'ai partagé plus qu'un bureau, Un grand merci :

Au Docteur Simona Agostini pour sa gentillesse et ses connaissances scientifiques notamment en pharmacologie que tu as su partager. Merci au Docteur Maiwenn Olier pour son écoute attentive et son aide précieuse dans le domaine de la microbiologie qui m'ont été d'une très grande aide. Merci au Docteur Thomas Sécher pour ta sympathie et ton aide. Merci aux anciennes thésardes Lara, Delphine, Isabelle, merci les filles pour vos encouragements et pour tous vos conseils !

Je remercie également Ambre, Sophie et vous souhaite une belle réussite pour vos thèses respectives ! Merci à Hanna, à Mélissa, à Stéphanie, à Orsi, à Ilona pour les bons moments partagés ensemble.

Je tiens à présenter mes remerciements à l'ensemble des personnes qui m'ont apporté leurs compétences scientifiques et techniques. Merci à

Valérie B. pour ta sympathie, ta bonne humeur et tes connaissances en biochimie et particulièrement au Western Blot que tu a su me transmettre avec plaisir, merci !

Mathilde pour ta gentillesse, ton attention, et pour tous tes conseils qui m'ont beaucoup apporté.

Eric, pour tes conseils et ton humour qui font des manip réalisées ensemble un moment toujours agréable.

Merci à Soraya, à Valérie T, à Cathy, à Cherryl, à Marion, à Valérie B, à Corinne, à Christel, à Vincent. Merci également à Patrice pour ton aide à l'animalerie, merci aussi à Colette et Caroline.

Je n'oublie pas de remercier l'ensemble des personnes de l'équipe de toxicologie intégrative et métabolisme.

Je remercie vivement le Docteur Hervé Guillou, pour ses encouragements durant mon stage de master et tout le long de ma thèse.

Je remercie chaleureusement le Docteur Laïla Mselli-Lakhal, pour son soutien et ses conseils avisés.

Je ne peux également oublier de remercier Arnaud, pour ta disponibilité, tes conseils et bien entendu ta bonne humeur. Je remercie également Frédéric Lasserre pour sa sympathie et sa disponibilité constante. Merci aussi au Docteur Nicolas Loiseau pour ta sympathie et au Docteur Alexandra Montagner pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton enthousiasme.

Merci également aux anciens thésards avec qui j'ai passé de très bons moments, merci Simon, pour l'ambiance que tu as su générer, merci Alice pour ces moments mémorables que nous avons passé ensemble.

Je souhaite remercier bien entendue ma famille et mes amis, merci pour tous vos encouragements, votre soutien et votre écoute attentive.

Merci à Thibault pour m'avoir soutenue et avoir toujours eu confiance en moi, merci.

Enfin à toute les personnes que j'ai involontairement oubliées. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont donné lieu à la publication et aux communications suivantes :

PUBLICATION

Nabila Moussaoui, Viorica Braniste, Afifa Ait-Belgnaoui, Mélissa Gabanou, Soraya Sekkal, Maiwenn Olier, Vassilia Théodorou, Pascal GP Martin, and Eric Houdeau. Changes in intestinal glucocorticoid sensitivity in early life shape the risk of epithelial barrier defect in maternal-deprived rats. **PLoS One**, 2014 - *sous presse*.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications orales

Nabila Moussaoui, Afifa Ait-Belgnaoui, Viorica Braniste, Eric Gaultier, Sandrine Ménard, Maiwenn Olier, Vassilia Théodorou, Pascal GP. Martin, Eric Houdeau. Premature gut and neonatal stress: high intestinal glucocorticoid responsiveness in early life shapes the risk of epithelial barrier defect in response to maternal separation. ***Digestive Disease Week***, 3-6 Mai 2014, Chicago, USA.

Nabila Moussaoui, Viorica Braniste, Afifa Ait-Belgnaoui, Maiwenn Olier, Yannick Lippi, Soraya Sekkal, Vassilia Théodorou, Pascal GP Martin, Eric Houdeau. Une séparation maternelle de courte durée chez le rat nouveau-né augmente la perméabilité intestinale, induit une translocation bactérienne et modifie le profil d'expression génique du foie. ***Journées Francophones d'Hépatho-gastroentérologie et d'Oncologie Digestive***, 21-24 Mars 2013, Paris, France.

Nabila Moussaoui, Viorica Braniste, Afifa Ait-Belgnaoui, Maiwenn Olier, Yannick Lippi, Soraya Sekkal, Vassilia Théodorou, Pascal GP Martin, Eric Houdeau. A short-time maternal separation in early neonate rats markedly increases intestinal permeability, induces bacterial translocation in the liver, and impacts hepatic gene expression. ***Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie***, 14-15 Juin 2012, Clermont Ferrand, France.

Nabila Moussaoui, Viorica Braniste, Afifa Ait-belgnaoui, Maiwenn Olier, Yannick Lippi, Soraya Sekkal, Vassilia Théodorou, Pascal G martin, Eric Houdeau. Short-time maternal separation in early neonate rats markedly increases intestinal permeability, induces bacterial translocation, and impacts gene expression in the liver. ***Digestive Disease Week***, 19-22 Mai 2012, San Diego, USA.

Communications affichées

Nabila Moussaoui, Viorica Braniste, Afifa Ait-Belgnaoui, Maiwenn Olier, Yannick Lippi, Soraya Sekkal, Vassilia Théodorou, Pascal GP Martin, Eric Houdeau. A short-time maternal separation in early neonate rats markedly increases intestinal permeability, induces bacterial translocation in the liver and impacts hepatic gene expression. Prix du meilleur poster ***Symposium Aliment Santé***, 18-19 Juillet 2012, Toulouse, France.

Nabila Moussaoui, Viorica Braniste, Afifa Ait-Belgnaoui , Maïwenn Olier, Yannick Lippi , Soraya Sekkal , Vassilia Théodorou , Pascal GP Martin , Eric Houdeau. A short-time maternal separation in early neonate rats markedly increases intestinal permeability, induces bacterial translocation in the liver and impacts hepatic gene expression. *Société Francophone pour la recherche et l'éducation sur les Origines Développementales, Environnementales et Epigénétiques de la santé et des maladies*, 8-9 Novembre 2012, Paris.

RESUME

Aujourd'hui, de plus en plus d'études épidémiologiques témoignent que des facteurs environnementaux apparaissant tôt dans la vie peuvent influencer le développement de l'enfant, jusqu'à le prédisposer à développer plus tard dans la vie des maladies chroniques, d'ordre métaboliques ou encore auto-immunes. Pour l'intestin de nombreuses études chez l'animal ont mis en lumière l'importance de la présence maternelle au cours des premiers jours de vie dans l'apparition à l'âge adulte de pathologies spécifiques, tels que des troubles fonctionnels digestifs, comme le syndrome de l'intestin irritable (SII). Un modèle expérimental de stress de séparation maternelle (SM) chronique s'est alors développé, permettant de mimer les symptômes associés au SII tels qu'une altération du transit intestinal, une augmentation de la perméabilité intestinale ainsi qu'une hyperalgésie viscérale. . Les défauts de barrière intestinale sont associés à une altération persistante de l'axe corticotrope et à l'action de médiateurs du stress au niveau du côlon. Toutes ces observations ont conclu qu'une SM chronique durant la période postnatale pouvait avoir des effets délétères favorisant le passage incontrôlé de bactéries vers les organes systémiques et aboutissant à un état de micro inflammation.

Alors que toutes ces manifestations ont essentiellement été décrites chez l'adulte, aucune étude n'a en retour considéré l'impact immédiat du stress accompagnant la SM chez le nouveau-né, quand celui-ci présente une barrière intestinale et des fonctions hépatiques en cours de maturation, donc sensibles à de nombreux facteurs environnementaux. C'est d'autant plus le cas chez le nouveau-né prématuré qui présente une vulnérabilité plus élevée, car plus sensible à l'action des glucocorticoïdes (GC) qui participent à la maturation des fonctions intestinales, en particulier dans le côlon. De plus, aucune étude ne s'est intéressée aux effets de la SM sur le développement des fonctions hépatiques, alors qu'elles s'établissent en lien étroit avec celui de l'intestin.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé un modèle expérimental de SM chez le rat en utilisant un épisode unique et de courte durée (4 heures) de privation maternelle telle qu'elle est pratiquée en routine lors de la prise en charge d'un nouveau-né dans les services hospitaliers, en particulier chez l'enfant prématuré. Dans l'optique d'en analyser les conséquences selon l'âge de l'individu, nous avons privilégié deux stades de développement chez le rat : 10 jours et 20 jours post-partum. D'après la littérature le rat âgé de 10 jours, constitue un modèle pertinent à plusieurs égards pour l'enfant prématuré, en particulier

concernant l'immaturation de son intestin et de ses fonctions de barrière, en plus des fonctions hépatiques. Au 20^{ème} jour post-partum, le jeune rat est à la veille du sevrage et est à un stade de maturité plus avancé, relativement comparable à celui d'un enfant né à terme. A ces deux âges, nous avons déterminé les conséquences immédiates de la SM unique sur la barrière intestinale, en étudiant les paramètres clés tels que la perméabilité intestinale et la translocation bactérienne, et étendu l'étude à l'impact sur le transcriptome hépatique, une approche sans *a priori* permettant d'apprécier l'impact global de la SM sur le foie en développement.

Les résultats de ses travaux montrent qu'une SM de 4h appliquée une seule fois chez le nouveau-né est bien un facteur de stress, augmentant la corticostéronémie tant pour le jeune rat de 10 jours que pour celui de 20 jours, mais avec des conséquences délétères sur la barrière intestinale essentiellement observées chez le raton de 10 jours. Chez ce dernier, l'impact du stress se traduit par une augmentation de la perméabilité colique aux macromolécules, déjà élevée en conditions basales, et par une translocation bactérienne systémique vers le foie et la rate. Nous avons montré que ces deux effets étaient liés à l'activité de l'enzyme MLCK impliquée dans la contraction du cytosquelette des cellules épithéliales. En amont, l'augmentation de la perméabilité intestinale était liée à l'action des GC via le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) exprimé dans l'intestin. Une augmentation de la corticostéronémie liée au stress de SM était également observée chez le rat de 20 jours, mais sans pour autant aboutir à des effets délétères sur la muqueuse intestinale. Nous avons constaté que l'intestin du rat de 20 jours était moins sensible à l'action des GC et présentait une faible expression en GR au niveau du côlon en comparaison du rat de 10 jours. Chez ce dernier, les impacts de la SM unique aboutissent également à une modification du transcriptome hépatique, tout particulièrement à une sous-expression de plusieurs gènes impliqués dans la division cellulaire. Ces effets dans le foie sont apparus transitoires et plus subtils que ceux retrouvés au niveau de l'intestin, et dont les éventuelles conséquences fonctionnelles restent à être évalués.

Les travaux de cette thèse reposant sur le modèle rat ont révélé des effets délétères de la séparation maternelle sur la barrière intestinale en cours de développement et des effets indépendants et plus subtils sur le transcriptome hépatique. Ces observations révèlent la nécessité de prise en compte du stress de la séparation maternelle, pratiquée en routine chez l'homme et notamment chez l'enfant prématuré sur la santé de l'enfant et plus tard chez l'adulte.

SUMMARY

Currently, an increasing number of epidemiological evidences suggest that environmental factors occurring early in life can influence the development of the child and predispose him later in life to develop chronic, metabolic or autoimmune diseases. Concerning the gut, many animals' studies have highlighted the importance of maternal presence during the first days of life on the development of intestinal diseases occurring later in adulthood, such as functional gastrointestinal disorders as irritable bowel syndrome (IBS). An experimental model of chronic maternal separation (MS) stress was developed to mimic symptoms associated with irritable bowel syndrome such as alteration of motility, increased intestinal permeability and visceral hyperalgesia. Alterations of the intestinal barrier were associated with a persistent impairment of the HPA axis and with the action of stress mediators in the colon. All of these observations evidenced that chronic exposure to MS during the early postnatal period could have deleterious effects on the intestinal barrier favoring bacteremia and leading to a micro inflammation state.

All these events were mostly described at adulthood but no study had investigated the immediate impact of the maternal separation stress directly in the newborn while his intestinal barrier and liver functions are still maturing and potentially sensitive to environmental stress. This is especially the case of preterm infant who are more vulnerable to stress because they are more sensitive to the action of glucocorticoids involved in intestinal functions maturation, especially in the colon. In addition, no study had investigated the effects of maternal separation on the development of liver function that are still maturing after birth and are in close crosstalk with the intestine.

In this thesis, we have developed an experimental model of maternal separation in rats using a single short-term exposure of 4 hours as it could be observed in practice in maternity, especially in prematurity birth cases. In order to analyze the consequences of MS according to the age, we focused on two stages of development in the rat: on the 10th and 20th day post delivery. The 10-day-old rat is often considered as a good model for the premature infant, notably due to an immature gut barrier. At 20 days of age, the rat is at a higher stage of maturity, comparable to the state of a full-term infant. At both ages, we determined the immediate consequences of a single MS on the intestinal barrier by studying key parameters such as intestinal permeability and bacterial translocation. We also extended the study to the

impact of a single MS on the liver transcriptome using a genome-wide approach without a priori to assess the overall impact of SM on the developing liver.

Our results show that a 4 hours-MS is a stressful event increasing corticosterone level in 10- and 20-day-old rats but associated with deleterious effects on the intestinal barrier in 10-day-old rats only. At this age, the MS stress induced an increase of colonic permeability to macromolecules, already high at baseline, and systemic bacterial translocation to the liver and spleen. Both effects were linked to the activity of the MLCK enzyme involved in the contraction of the cytoskeleton of epithelial cell. The increase of intestinal permeability was related to glucocorticoids (GC) action through intestinal glucocorticoid receptors (GR). The increase of glucocorticoid level was also observed in 20 days rats but without deleterious effects on the intestinal mucosa. We have found that the intestine of 20-day-old rats was less sensitive to GC action and expressed GR at a lower level in the colon compared to 10-day-old rats. At the younger age, the maternal separation also led to a modulation of the liver transcriptome, most notably a down-regulation of genes involved in cell division. These effects were transient and more subtle than those observed on the intestinal barrier. Their potential functional consequences remain to be evaluated.

The work of this PhD based on the 10-day-old rat model highlighted the deleterious effects of maternal separation on the intestinal barrier during development as well as independent and more subtle effects on the liver transcriptome. These findings emphasize the need to take into account the stress induced by maternal separation, practiced routinely in humans and especially in premature infants, on the health of the child and later at adulthood.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	1
PRINCIPALES ABRÉVIATIONS	4
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	5
CHAPITRE 1 BARRIERE INTESTINALE ET AXE INTESTIN-FOIE : STRUCTURE ET FONCTIONS	6
1 La barrière intestinale et ses acteurs	6
1.1 Anatomie fonctionnelle	6
1.2 Les différents acteurs de la barrière intestinale	8
1.2.1 <i>La barrière écologique</i>	9
1.2.2 <i>La barrière chimique</i>	9
1.2.3 <i>La barrière immunologique</i>	9
1.3 L'épithélium intestinal	13
1.3.1 <i>Composition cellulaire et fonctions associées</i>	13
1.3.2 <i>La barrière épithéliale : les acteurs et leurs rôles</i>	15
a) Les jonctions intercellulaires	15
b) Régulation des jonctions serrées par le cytosquelette	18
1.3.3 <i>La perméabilité intestinale</i>	19
a) La perméabilité paracellulaire	19
b) La perméabilité transcellulaire	20
c) Reconnaissance et réponse immunitaire vis-à-vis des bactéries	22
1.3.4 <i>Méthodes d'évaluation de la perméabilité intestinale</i>	23
a) Méthodes d'évaluation non invasives	23
b) Méthode d'évaluation invasive chez l'animal	26
c) Modèle d'évaluation <i>in situ</i>	27
d) Méthode d'évaluation <i>in vitro</i>	27
1.3.5 <i>Translocation bactérienne : définition et méthodes d'évaluation</i>	28
2 Le foie	31
2.1 Anatomie et composition cellulaire	31
2.2 Principales fonctions hépatiques	33
2.2.1 <i>Fonctions métaboliques</i>	33
2.2.2 <i>Fonctions de détoxification</i>	34
2.2.3 <i>Fonctions immunitaires</i>	35
2.3 Exemples de cross talk « intestin-foie »	36
CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT PERINATAL DE L'AXE INTESTIN-FOIE	39
1 Maturation de la fonction de barrière intestinale	39
1.1 Séquence de développement de l'intestin chez l'homme	39
1.1.1 <i>Implication des glucocorticoïdes dans la maturation intestinale</i>	40
1.1.2 <i>Maturation des complexes de jonctions serrées et données de perméabilité</i>	41
1.1.3 <i>Colonisation bactérienne chez l'animal et implication dans le développement des fonctions immunitaires par rapport à l'homme</i>	43
1.1.4 <i>Evolution de la perméabilité intestinale chez l'enfant né à terme ou prématuré</i>	47
1.1.5 <i>Risques pathologiques chez le nouveau-né prématuré : NEC et infections systémiques</i>	48

1.1.6 <i>Espèces modèles pour l'étude de l'impact de facteurs exogènes sur le développement de la barrière épithéliale chez le nouveau-né et le risque de pathologies précoces</i>	49
2 Principales données sur les fonctions hépatiques du nouveau-né	52
2.1 Fonctions métaboliques	53
2.2 Fonction de détoxification	54
2.3 Fonction immunitaire	55
CHAPITRE 3 : STRESS, BARRIÈRE INTESTINALE ET FONCTIONS HEPATIQUES : DU NOUVEAU-NE A L'ADULTE	56
1 Organisation fonctionnelle de l'axe HPA et relation avec la sphère digestive	56
1.1 Les différents acteurs de l'axe HPA	56
1.2 Développement de l'axe HPA et sécrétion du cortisol chez l'homme	57
1.3 Sécrétion de la corticostérone et réactivité de l'axe HPA chez le rat en cours de développement	58
1.4 Distribution des récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'intestin et le foie	60
2 Physiopathologie du stress	61
2.1 Effets de la séparation maternelle sur l'axe HPA	61
2.2 L'axe intestin-cerveau	62
2.1.1 <i>Effet du stress sur la douleur viscérale</i>	63
2.1.2 <i>Effets du stress sur la perméabilité intestinale</i>	63
3 Séparation maternelle et conséquences sur la santé de l'adulte	65
3.1 Le modèle de séparation maternelle	65
3.2 Conséquences de la séparation maternelle sur la fonction de barrière intestinale chez l'adulte	66
4 Séparation maternelle et nouveau-né chez l'homme	66
4.1 La séparation maternelle post-partum	66
4.2 La notion du contact « peau-à-peau » à la naissance	67
4.3 La séparation maternelle : un facteur de stress pour le nouveau-né	68
OBJECTIFS DE LA THESE	70
RESULTATS EXPERIMENTAUX	73
DISCUSSION	85
I Stress de séparation maternelle et intégrité de la fonction de barrière intestinale chez le nouveau-né	86
1.1 Séparation maternelle et perméabilité épithéliale : choix des marqueurs et évaluation des voies de passage affectées chez le nouveau-né	86
1.2 Stress et corticostéronémie chez le nouveau-né : impacts sur l'intégrité épithéliale	93
1.3 Une régionalisation dans l'effet du stress de séparation maternelle : rôle des GR et de la sensibilité aux glucocorticoïdes	96
II Séparation maternelle et intestin immature : risque associé d'inflammation et/ou d'infection	100
2.1 Risque inflammatoire de la muqueuse intestinale	101
2.2 Risque d'infection systémique	103

III Impact d'une séparation maternelle de 4h sur le transcriptome hépatique du rat femelle âgé de 10 jours	108
3.1 Analyse du transcriptome par microarray ou puce à ADN	108
3.2 Evolution du transcriptome hépatique en période périnatale chez le rongeur	111
3.3 Justification des choix expérimentaux	113
3.4. Impact d'un stress unique de séparation maternelle sur le transcriptome hépatique chez le raton âgé de 10 jours	114
3.5 Un impact ciblé sur les gènes impliqués dans le cycle cellulaire	120
3.5.1 <i>Absence d'impact sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et la réponse de phase aigüe</i>	120
3.5.2 <i>Confirmation des impacts sur l'expression de gènes impliqués dans la division cellulaire</i>	121
3.6 Bilan de l'analyse transcriptionnelle et perspectives	127
CONCLUSION	129
ANNEXE 1	132
ANNEXE 2	135
ANNEXE 3	137
REFERENCES	140

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Schéma d'une coupe transversale du tube digestif (région iléale).....	7
Figure 2 Composition de la barrière intestinale	8
Figure 3 Les acteurs du système immunitaire intestinal	10
Figure 4 La différenciation des lymphocytes T	13
Figure 5 Composition cellulaire du côlon et de l'intestin grêle	15
Figure 6 Structure et composition des jonctions cellulaires dans l'épithélium intestinal	16
Figure 7 Structures des protéines des jonctions serrées	17
Figure 8 Voies de signalisations intracellulaires impliquées dans le contrôle des jonctions serrées.....	18
Figure 9 Modèle de régulation des jonctions serrées par le cytosquelette	19
Figure 10 La perméabilité paracellulaire.....	20
Figure 11 Les différentes voies de passage au travers de l'épithélium intestinal	21
Figure 12 Les différents modes de passage transcellulaire	22
Figure 13 Le système immunitaire assure une réponse de tolérance vis-à-vis du microbiote .	23
Figure 14 Méthode d'analyse de la perméabilité intestinale chez l'homme	25
Figure 15 Corrélation entre le diamètre des marqueurs et le niveau de perméabilité	26
Figure 16 Montage en chambre de Ussing.....	28
Figure 17 Gélose schaedler au sang frais et Gélose Trypcase soja.....	30
Figure 18 Les méthodes de détection bactérienne par PCR : universelle et spécifique.....	31
Figure 19 Schéma représentatif du lobule hépatique	33
Figure 20 Une modification de la composition du microbiote et de la perméabilité intestinale peut promouvoir certaines pathologies du foie	37
Figure 21 Modèle simplifié des interactions possibles entre la microflore intestinale, la perméabilité intestinale, l'endotoxémie, le TNF α et le stress oxydatif au cours des stéatohépatites alcooliques (ASH) et non alcooliques (NASH)	38
Figure 22 Perméabilité intestinale au Dextran 4 KDa durant les huit premières semaines de vie chez la souris	42
Figure 23 Incidence de la translocation bactérienne chez le rat durant les 5 premières semaines de vie.....	44

Figure 24 Développement du tractus gastro-intestinal et de son écosystème chez l'homme en comparaison de la souris	46
Figure 25 Représentation chronologique de la maturation de l'intestin chez l'homme et chez les modèles animaux du porc et du rat et périodes de sensibilité aux glucocorticoïdes.....	51
Figure 26 Représentation schématique de l'axe HPA.....	57
Figure 27 Concentration plasmatique de corticostérone chez le rat de la naissance au sevrage	59
Figure 28 Activité du récepteur aux glucocorticoïdes au niveau du foie, de l'intestin et du poumon au cours du développement chez le rat.	61
Figure 29 Sécrétion de corticostérone au cours de la séparation maternelle chez la souris de 9 jours.....	62
Figure 30 Mécanismes impliqués dans l'hyperalgésie viscérale induite par un stress de contrainte.....	65
Figure 31 Relation non linéaire entre la perméabilité au FD4 et la conductance.	88
Figure 32 Les voies de passage du FITC Dextran 4 KDa (FD4) à travers l'épithélium intestinal	89
Figure 33 Effets de la séparation maternelle sur l'expression des ARNm des jonctions serrées dans l'iléon et le côlon	93
Figure 34 Mécanismes impliqués dans l'augmentation de la perméabilité intestinale au FD4 après un seul épisode de séparation maternelle de 4 heures.....	95
Figure 35 L'activité de la myéloperoxydase dans le côlon et l'iléon du rat de 10 jours n'est pas modifiée après la séparation maternelle	102
Figure 36 La séparation maternelle de 4 heures ne modifie pas la concentration des cytokines pro inflammatoire IL1 β et TNF α dans l'iléon et le côlon du rat femelle.....	102
Figure 37 Analyse de la translocation bactérienne après l'administration d' <i>E.coli</i> chez le rat de 10 jours exposé à la séparation maternelle de 4 heures.....	106
Figure 38 Voies impliquées dans la translocation bactérienne systémique suite à la séparation maternelle.....	107
Figure 39 Principe général de l'analyse sur puce à ADN	110
Figure 40 Analyse transcriptomique des gènes impliqués dans les fonctions hépatiques au cours du développement.....	113
Figure 41 Classification des différents gènes différentiellement exprimés suite à la séparation maternelle de 4 heures et les fonctions associées.....	116

Figure 42 Expression des gènes hépatiques régulés par la séparation maternelle chez le rat en comparaison de l'expression des gènes exprimés durant l'ontogénie du foie chez la souris.	119
Figure 43 Diminution d'expression hépatique des gènes du cycle cellulaire	122
Figure 44 Effets de la séparation maternelle de 4 heures sur l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire 24 heures, 48 heures après l'exposition et au 25 ^{ième} jour.....	123
Figure 45 Effets de la séparation maternelle de 4 heures et du prétraitement au ML7 sur l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire.....	126
Figure 46 Effets de la séparation maternelle répétée de 4 heures sur l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire 24 heures après le dernier épisode de stress.....	127

PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

ACTH : adrenocorticotropic hormone

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

CRF: corticotropin releasing factor

Dex: Dexaméthasone

Dextran-FITC: dextran-fluoro-isothiocyanate

HPA: hypothalamo–pituitary–adrenocortical

UFC : Unité Formant Colonie

GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue

GC : glucocorticoides

GR : récepteur aux glucocorticoïdes

MLC : myosin light chain

MLCK: myosin light chain kinase

MLN: mesenteric lymph node

ML7: 1-(5-Iodonaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine hydrochloride

SSC: skin to skin contact

SM: séparation maternelle

TNF- α : Tumor necrosis factor α

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1 BARRIÈRE INTESTINALE ET AXE INTESTIN-FOIE : STRUCTURE ET FONCTIONS

1 La barrière intestinale et ses acteurs

1.1 Anatomie fonctionnelle

Tout le long de l'intestin, la structure pariétale se compose de quatre tuniques concentriques successives allant de l'organisme (milieu interne) vers le milieu extérieur : la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse (*Figure 1*).

La séreuse est la tunique la plus externe par rapport à l'axe du tube digestif ; elle se compose d'un tissu conjonctif lâche tapissé sur son versant externe par un épithélium simple, le mésothélium. Elle constitue un tissu de soutien de l'appareil digestif dans la cavité abdominale, contribuant notamment à limiter les forces de frottement liées aux mouvements du tube digestif.

La musculuse est constituée d'une mince couche de tissu musculaire lisse, comprenant deux feuillets : une musculature longitudinale externe doublée d'une seconde, circulaire et en position interne. Entre ces deux couches se situe le plexus nerveux d'Auerbach qui constitue un réseau dense de neurones responsables principalement du contrôle moteur.

La sous-muqueuse se compose de tissu conjonctif ainsi que de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle abrite également le plexus nerveux de Meissner responsable du débit sanguin local et du contrôle de l'activité des glandes sécrétrices et de la contraction des muscles lisses de la sous-muqueuse.

La muqueuse comporte trois couches bien distinctes :

-La *muscularis mucosae* constituée de deux couches fines de muscles lisses : longitudinale externe et circulaire interne dont les mouvements générés limitent l'adhésion de particules à la muqueuse intestinale.

-La *lamina propria* se situe en dessous de l'épithélium et se compose de tissus conjonctifs comprenant du tissu de soutien avec des cellules conjonctives, des fibres conjonctives et élastiques. Elle est parcourue par de multiples petits vaisseaux permettant de nourrir cet

épithélium et d'absorber les nutriments. Elle contient les cellules du système immunitaire et leur sécrétion ce qui permet de prévenir la pénétration d'agents pathogènes.

-L'*épithélium monostratifié* est constitué majoritairement d'entérocytes et d'autres types cellulaires moins abondants tels que les cellules caliciformes à mucus (*Goblet cells*), les cellules entéroendocrines, les cellules "M", les cellules de Paneth et les rares cellules tufts dont la fonction précise n'a pas encore été déterminée.

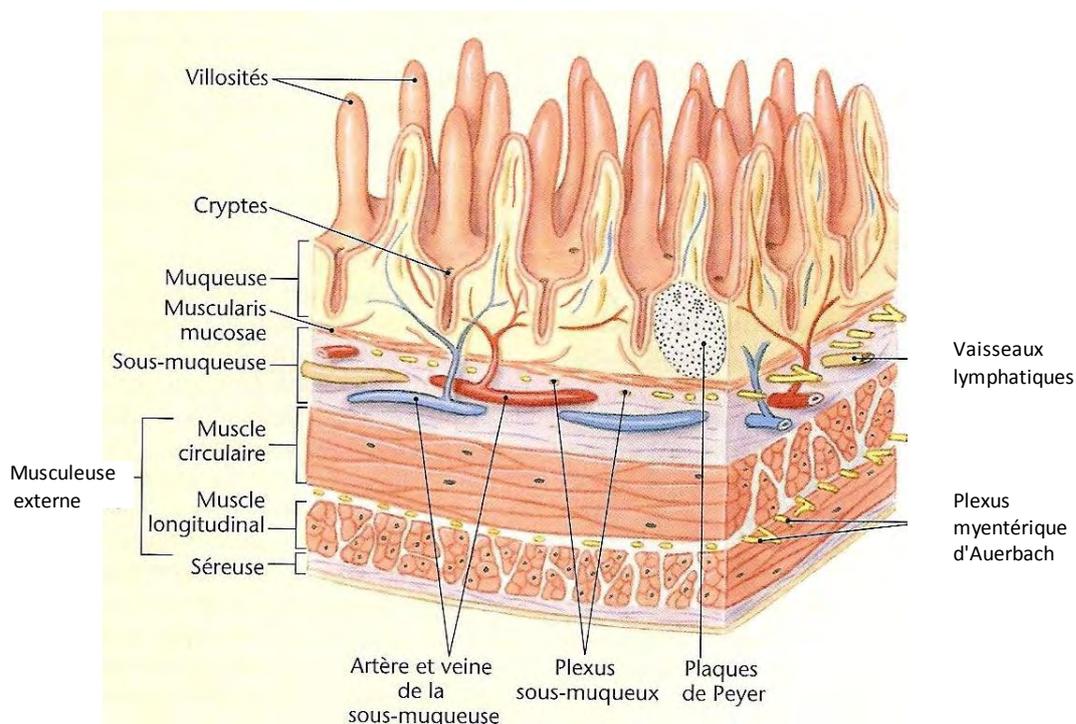


Figure 1 Schéma d'une coupe transversale du tube digestif (région iléale).

La composition et l'organisation de ces différentes tuniques varient selon le segment d'intestin, tout particulièrement entre l'intestin grêle et le côlon. La partie haute de l'intestin comprend le duodénum, le jéjunum et l'iléon dont les fonctions attribuées sont essentiellement les fonctions de digestion et d'absorption. Une fois que la majorité des nutriments sont absorbés, les mouvements péristaltiques apparaissent, permettant de limiter la prolifération des bactéries et leur absorption au travers de l'épithélium intestinal (Nieuwenhuijs *et al*, 1998). On attribue également à l'intestin grêle les fonctions de défense immunitaire permises par l'abondance du tissu lymphoïde. L'intestin grêle est décrit comme un organe clé dans la métabolisation des xénobiotiques (Kaminsky et Zhang, 2003).

Par ailleurs, il est doté d'une fonction endocrine consistant à élaborer des hormones peptidiques et des neurotransmetteurs.

Le côlon est le siège d'absorption de l'eau et des électrolytes et de la formation des matières fécales. Celles-ci sont stockées et brassées grâce à des mouvements de contraction segmentaire. On attribue également au côlon un rôle de digestion et d'absorption des produits alimentaires non dégradés au niveau de l'intestin grêle.

1.2 Les différents acteurs de la barrière intestinale

L'intestin représente la plus grande surface d'échange entre l'organisme et le milieu extérieur. Il est composé de quatre unités fonctionnelles lui conférant un rôle de barrière : écologique, chimique, immunologique et physique (*Figure 2*).

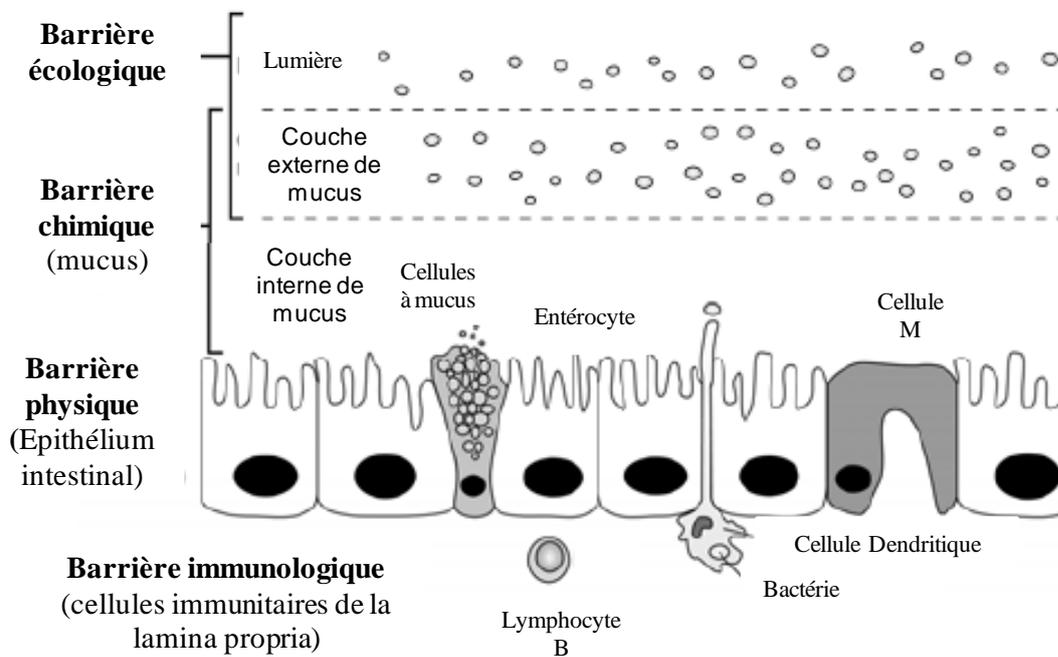


Figure 2 Composition de la barrière intestinale.
(Adapté d'Anderson *et al*, 2012).

1.2.1 La barrière écologique

Le microbiote intestinal chez l'adulte est composé de 10^{14} bactéries avec une différence qualitative et quantitative entre l'intestin grêle et le côlon. La partie haute de l'intestin comprend 10^2 UFC par gramme de contenu intestinal, avec une flore bactérienne très majoritairement aérobie, alors que le côlon en héberge plus de 10^{11} UFC/g où les bactéries anaérobies deviennent majoritaires. Plus de 500 souches bactériennes différentes ont été identifiées (Eckburg *et al.*, 2005 ; Ley *et al.*, 2006). Au niveau de l'intestin grêle, les bactéries appartiennent au genre *Lactobacillus* et *Streptococcus*, avec de manière minoritaire des bactéries de la famille des Entérobactériaceae. Au niveau colique les bactéries appartiennent aux genres *Bactéroidetes*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* et Entérobactériaceae. Le microbiote intestinal représente une réelle barrière de défense en limitant la colonisation de pathogènes tout en participant au métabolisme épithélial, à la prolifération et à la survie cellulaire (Neish *et al.*, 2009). Le microbiote est un élément essentiel au développement de l'épithélium intestinal et du système immunitaire, éléments que l'on développera par la suite.

1.2.2 La barrière chimique

Elle est représentée par la couche de mucus qui protège l'épithélium intestinal de l'invasion de pathogènes. Il est constitué essentiellement d'agents antimicrobiens et de mucines constituant un gel viscoélastique. La composition et l'épaisseur du mucus varie selon le segment intestinal, avec une viscosité plus élevée au niveau du côlon.

1.2.3 La barrière immunologique

Le système immunitaire représente une unité de défense contre des agents pathogènes pouvant pénétrer la muqueuse tout en tolérant les antigènes alimentaires et les bactéries commensales. Pour cela, l'intestin est doté d'un tissu lymphoïde associé à la muqueuse digestive appelé GALT, pour *Gut-Associated Lymphoid Tissue*. Il peut être divisé en sites effecteurs composés de lymphocytes situés dans l'épithélium et au niveau de la *lamina propria* et en sites inducteurs de la réponse immunitaire. Celle-ci est réalisée au niveau des plaques de Peyer, en plus de petits follicules lymphoïdes isolés ainsi que par des ganglions méésentériques lymphatiques distribués tout le long de la paroi de l'intestin grêle et du côlon (*Figure 3*). Les follicules lymphoïdes isolés sont comparables aux plaques de Peyer d'un point de vue anatomique et fonctionnel. En effet, ils permettent la présentation de l'antigène de la lumière aux cellules présentatrices d'antigènes, induisant ainsi une réponse immunitaire.

Le drainage lymphatique des sites inducteurs et effecteurs permet le transport des antigènes luminaux vers les ganglions mésentériques lymphatiques.

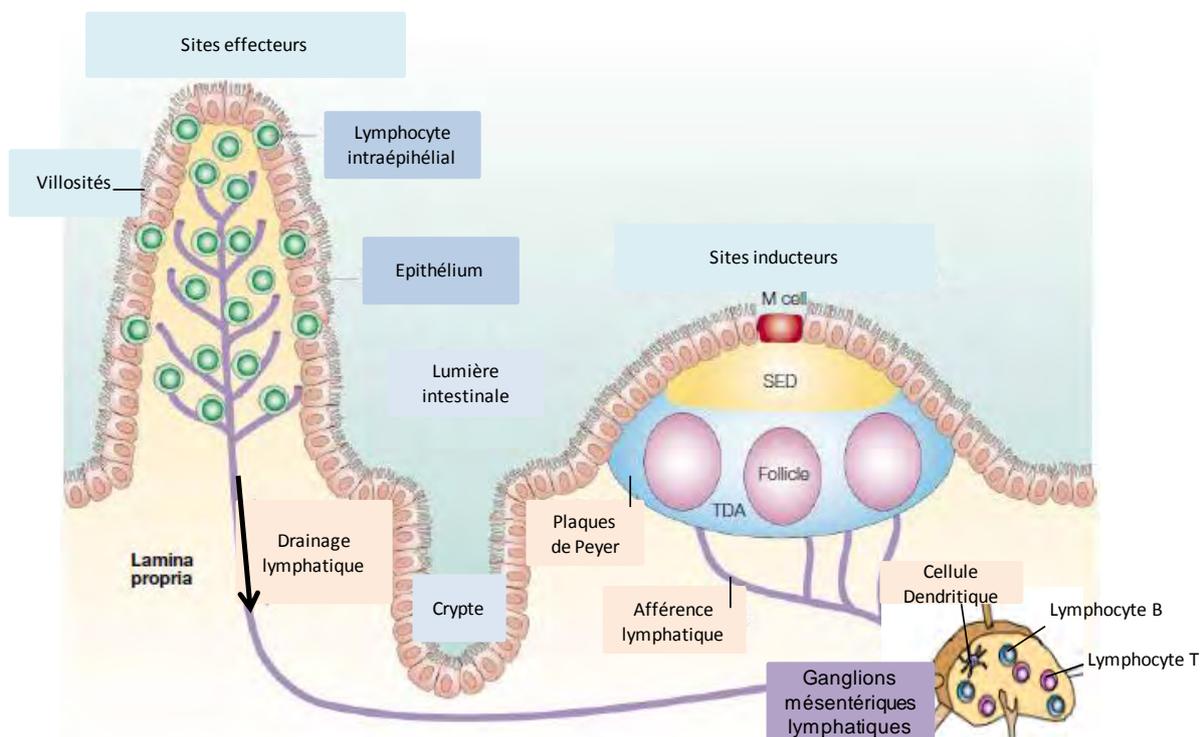


Figure 3 Les acteurs du système immunitaire intestinal.

(Adapté de Mowat *et al.*, 2003) SED : dôme sous-épithélial ; TDA : Zone Thymus-Dépendante.

Les cellules de l'immunité

L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'hôte vis-à-vis des pathogènes. Pour cela un système de détection est mis en place grâce aux récepteurs PRR pour *Pattern Recognition Receptors* qui reconnaissent les motifs présents au niveau des micro-organismes appelé PAMPS pour *Pathogen Associated Molecular Patterns*. Il existe trois systèmes de perception : extracellulaire, cytosolique et internalisé. Les récepteurs de surface sont de la famille des TLR pour « *toll-like receptor* » et les récepteurs intra-cellulaires sont nommés NOD pour « *nucleotide-binding oligomerization domain* ».

Parmi les cellules de l'immunité innée figurent les **neutrophiles** capables de digérer les antigènes et les bactéries, ce qui constitue la première ligne de défense de l'organisme. Les basophiles sont les leucocytes les plus rares (moins de 1%). De par leurs propriétés de dégranulation, permettant localement la libération de facteurs chimiotropiques, ils attirent les autres globules blancs en déversant notamment l'histamine contenue dans leurs granules. Les

éosinophiles présentent également la capacité de « dégranuler » et sont largement impliqués dans la défense contre les parasites.

Les **macrophages** sont capables de migrer de façon orientée vers le site infectieux pour phagocyter et éliminer de manière rapide les bactéries (Platt et Mowat, 2008). Les **mastocytes** contiennent des granulations contenant de l'histamine, de l'héparine, de la sérotonine et des enzymes diverses permettant de moduler la perméabilité épithéliale, la circulation sanguine, les interactions neuro-immunes, et le péristaltisme (Bischoff et Kramer, 2007). Les **cellules dendritiques** sont des cellules immunitaires avec des projections caractéristiques (dendrites) et sont spécialement conçues pour la présentation de l'antigène aux lymphocytes B et T (Hooper *et al.*, 2010). Pour cela, elles chargent des antigènes peptidiques sur des molécules de CMH de classe II qui viennent en prise avec le récepteur de cellule T et fournissent des signaux de co-stimulation. Les cellules dendritiques matures contrôlent la prolifération des lymphocytes T, mais également la différenciation et la polarisation de la réponse immunitaire (Grewal et Flavell, 1998). Pour cela, les cellules dendritiques produisent différents types d'interleukines orientant ainsi la réponse vers un profil de type Th1 (réponse pro inflammatoire) ou vers un profil de type Th2 (réponse allergique) (Coombes et Powrie 2008). Les cellules dendritiques peuvent également stimuler les cellules B au niveau des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques lymphatiques pour sécréter des immunoglobulines A (IgA). Inversement, lorsque la cellule dendritique est chargée avec des protéines alimentaires, en l'absence de molécules d'activation (comme des ligands de récepteurs *Toll-like* issus de micro-organismes pathogènes), elle induit la tolérance périphérique par les lymphocytes B et T (mise en place de la fonction de tolérance orale).

L'immunité adaptative est le moyen de défense mis en place de manière spécifique par les lymphocytes contre un antigène et faisant appel à la mémoire. On distingue les lymphocytes B responsables de la réponse humorale des lymphocytes T qui induisent une réponse cellulaire. Ces deux types cellulaires ont une double différenciation dont la première a lieu au niveau des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus) et la deuxième au niveau des organes lymphoïdes secondaires, dont notamment les plaques de Peyer. Ils sont pourvus de récepteurs membranaires pour l'antigène de type BcR (*B-cell receptor*) pour les lymphocytes B et TcR (*T-cell receptor*) pour les lymphocytes T.

Les **lymphocytes B** sont responsables de la production d'anticorps spécifiques dirigés envers l'agent pathogène. Elles peuvent se différencier en deux types cellulaires :

- Les *plasmocytes* capables de sécréter des anticorps contre l'antigène, facilitant ainsi la phagocytose de l'agent pathogène.
- Les *lymphocytes B mémoires* expriment à leur surface les anticorps spécifiques d'un antigène, permettant une réponse plus rapide si une seconde infection se présente.

Les **lymphocytes T** jouent un rôle important dans la réponse immunitaire adaptative. Les molécules CD4 et CD8 sont des déterminants majeurs des lymphocytes T et permettent de distinguer les lymphocytes auxiliaires exprimant la molécule CD4 des lymphocytes cytotoxiques exprimant la molécule CD8 qui dégradent les cellules infectées ou tumorales. Les lymphocytes auxiliaires également appelés «T helper» produisent des cytokines et stimulent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B. Une fois activés, les lymphocytes naïfs T CD4⁺ peuvent proliférer et se différencier selon l'environnement cytokinique en lymphocytes effecteurs Th1 ou Th2 sécréteurs de cytokines spécifiques (Mosmann *et al.* 1986 ; Romagnani, 1991). Les lymphocytes de type Th 1 induisent une réponse cellulaire efficace contre les agents pathogènes et sécrètent majoritairement de l'Interféron-gamma (IFN- γ), du « Tumor Necrosis Factor-alpha » (TNF- α) et de l'Interleukine 2 (IL-2). Les lymphocytes Th2 sécrètent principalement de l'IL-4, IL-5 et IL-13 et soutiennent la différenciation des lymphocytes B pour la production d'anticorps. Il existe d'autres types de lymphocytes : les **Th17** sécrètent des molécules pro-inflammatoires alors que les cellules T régulatrices (Treg) sécrètent des molécules anti-inflammatoires. Les **Treg** régulent la réponse immunitaire et permettent de maintenir une réponse de tolérance vis-à-vis des bactéries commensales. Parmi les lymphocytes Treg, sont décrites les cellules TR1 identifiées au niveau de l'intestin grêle et dont la particularité est de ne pas exprimer le facteur de transcription FOXP3 contrairement aux lymphocytes Treg tout en participant au maintien de la tolérance du microbiote (*Figure 4*).

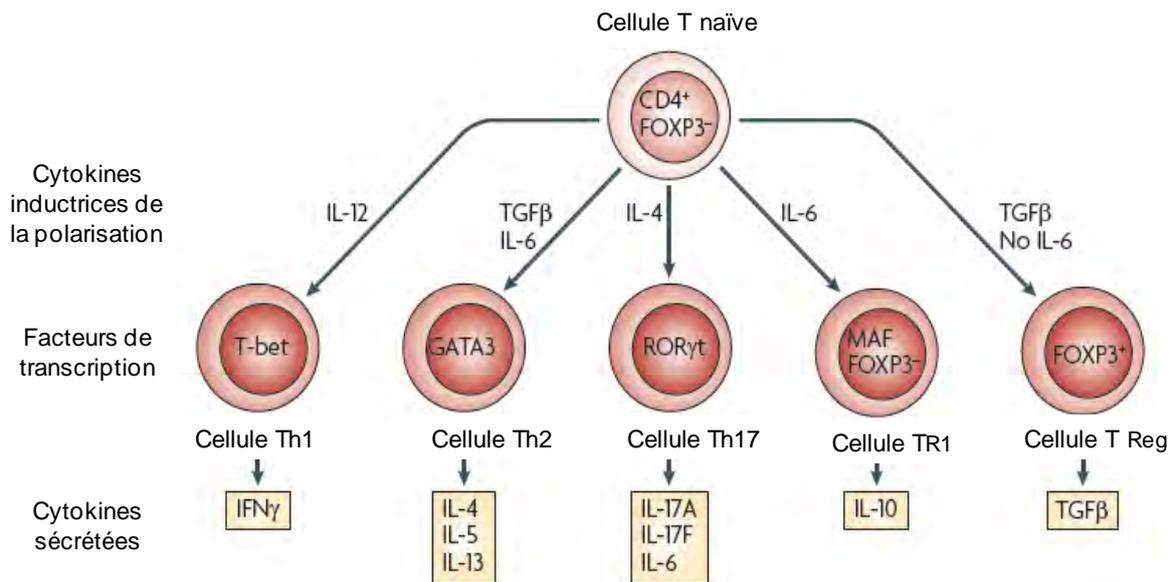


Figure 4 La différenciation des lymphocytes T.

La polarisation des lymphocytes T va être sous le contrôle des cytokines sécrétées par la cellule T naïve qui va permettre de générer les cellules de type Th1, Th2, Th17, TR1 et Treg. Ces différentes populations de lymphocytes T vont à leur tour présenter un profil de sécrétion de cytokines spécifique. (Adapté de Hooper *et al.*, 2010).

La barrière physique est représentée par l'épithélium intestinal.

1.3 L'épithélium intestinal

1.3.1 Composition cellulaire et fonctions associées

L'épithélium intestinal représente une barrière physique située à l'interface du milieu luminal et de la muqueuse limitant le passage des agents pathogènes. Il s'invagine dans la muqueuse en crypte de Lieberkühn. L'épithélium intestinal est composé principalement de cinq types cellulaires qui vont proliférer, se différencier puis atteindre la mort cellulaire (Barker *et al.*, 2008). Les cellules souches intestinales situées dans les cryptes sont à l'origine du renouvellement de l'épithélium qui est estimé chez l'homme à 4-5 jours (Van der Flier *et al.*, 2009), au lieu de 2-3 jours chez le rat. Les cinq types cellulaires majoritaires présentent des caractéristiques qui leur sont propres :

Les entérocytes (ou colonocyte dans le côlon) sont les cellules majoritaires de l'épithélium dont le rôle est d'absorber et de métaboliser les nutriments avant leur passage vers la circulation sanguine.

Les cellules caliciformes présentent une forme de calice évasé vers le haut, elles produisent du mucus dont les grains occupent les deux tiers de la surface apicale.

Les cellules entéroendocrines qui sont peu nombreuses se situent tout le long de l'épithélium intestinal et ont une activité endocrinienne. Elles synthétisent et sécrètent des

hormones et des peptides (entéroglucagon, somatostatine, substance P, sérotonine et polypeptide intestinal vasoactif) qui jouent un rôle dans le contrôle des sécrétions gastriques, pancréatiques et intestinales, ainsi que dans la motricité du système digestif.

Les cellules "M" sont des cellules présentatrices d'antigènes situées au niveau de l'épithélium et tout particulièrement dans les plaques de Peyer qui regroupent des agrégats de follicules lymphoïdes primaires et secondaires. Elles captent les antigènes de la lumière intestinale et les transmettent aux cellules immunocompétentes telles que les cellules dendritiques.

Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes. Elles ont une activité antimicrobienne en sécrétant du lysozyme, de la phospholipase A2 et plusieurs peptides de la famille des défensines. Elles contribuent donc au rôle de défense « non spécifique » de la barrière intestinale.

Au niveau structural, la muqueuse de l'intestin grêle forme des expansions en « doigts de gant » qui participent au système d'amplification de la surface d'absorption des produits de digestion. Cela est rendu possible par les nombreux replis de la muqueuse, les villosités et les microvillosités qui tapissent la face apicale des entérocytes. En revanche, le côlon ne présente pas de système d'amplification, il ne présente pas de villosités, les colonocytes sont moins nombreux et les cellules de Paneth sont absentes. Les cryptes sont riches en cellules caliciformes (*Figure 5*).

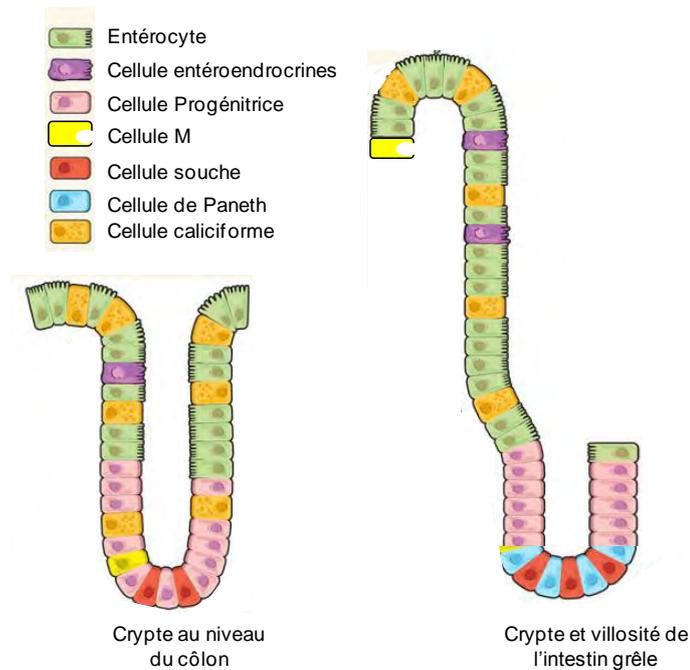


Figure 5 Composition cellulaire du côlon et de l'intestin grêle.
(Adapté de Medema et Vermeulen, 2011).

1.3.2 La barrière épithéliale : les acteurs et leurs rôles

a) Les jonctions intercellulaires

L'épithélium intestinal présente une perméabilité sélective conférant à la muqueuse intestinale une barrière de protection. Pour cela, un réseau complexe de protéines lie les cellules adjacentes entre elles. Les trois principaux complexes jonctionnels sont : les **desmosomes**, les **jonctions adhérentes** et les **jonctions serrées** (Groschwitz *et al*, 2009). Le cytoplasme des cellules est relié par des canaux intercellulaires groupés en plaques membranaires appelées jonctions communicantes (ou jonctions *gap*) et permettant les échanges intercellulaires.

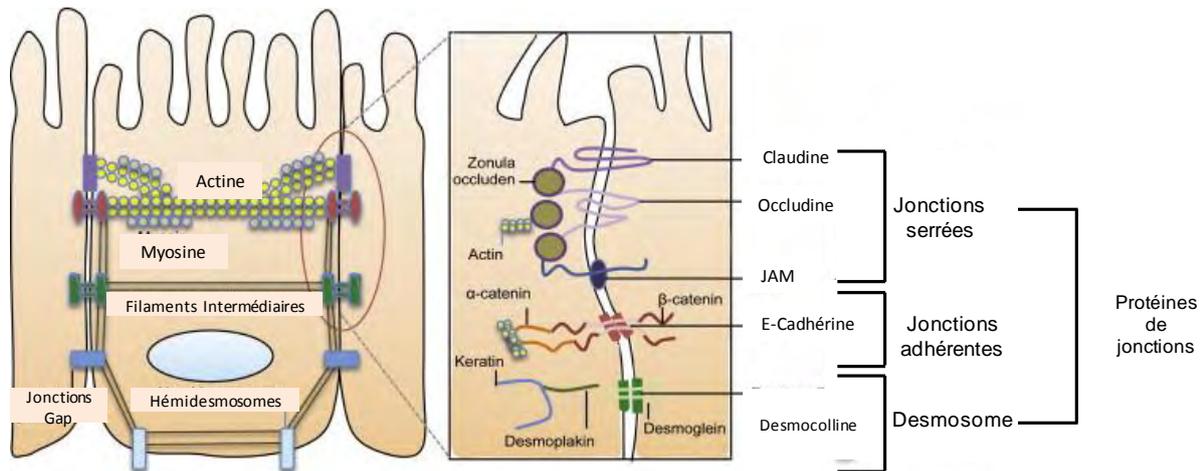


Figure 6 Structure et composition des jonctions cellulaires dans l'épithélium intestinal.
(Adapté de Natavidad et Verdu, 2013).

Les *desmosomes* et les *jonctions adhérentes* permettent de sceller les cellules entre elles et confèrent une résistance mécanique à la monocouche épithéliale. Les *desmosomes* permettent de créer un point d'adhérence entre les cellules adjacentes. Ils sont reliés au réseau de filaments intermédiaires permettant de relier le cytosquelette des cellules attenantes (*Figure 6*). Les *jonctions adhérentes* forment un complexe protéique composé notamment de Cadhérine telle que l'E-Cadhérine qui est reliée au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de caténine (alpha et beta). La fixation au cytosquelette contribue à renforcer la liaison entre les cellules (*Figure 6*).

Les *jonctions serrées* représentent un complexe multiprotéique, comportant des protéines transmembranaires de la famille des claudines, occludines et JAM (*junctional adhesion molecules*) auxquelles sont reliées des protéines intracellulaires (*zonula occludens* ou ZO). Ces jonctions sont situées au pôle apical des entérocytes/colonocytes et sont reliées à l'anneau périjonctionnel d'actino-myosine. Ces jonctions sont principalement responsables de la régulation de la perméabilité paracellulaire, c'est-à-dire du passage entre les cellules de l'épithélium (Nusrat *et al.*, 2000).

Les claudines (*Figure 7 a*) représentent une famille protéique de 27 membres (Mineta *et al.*, 2011). Elles se composent de quatre domaines transmembranaires qui forment deux boucles extracellulaires et deux domaines terminaux cytoplasmiques N-terminal et carboxy-terminal. Ce dernier possède les résidus sérine/thréonine sur lesquels peuvent avoir lieu des phosphorylations, ainsi que des motifs permettant la liaison aux protéines cytoplasmiques, telles que la ZO (Hu *et al.*, 2013). Les fonctions des claudines diffèrent selon le membre de la famille. Certaines renforcent la barrière physique de l'épithélium alors que d'autres sont

décrites comme formant des pores conférant une perméabilité sélective aux cations de petites tailles. En effet, leur boucle extracellulaire est responsable de la formation de pores paracellulaires permettant le passage d'ions entre deux cellules voisines. Ainsi, la claudine-2 constitue des pores laissant passer les cations alors que la claudine-16 ne laisse passer que les ions Mg^{2+} (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008).

L'occludine (Figure 7 b) présente une structure similaire aux claudines, mais avec un poids moléculaire plus important. L'extrémité carboxy-terminale est riche en résidus sérine, thréonine et tyrosine qui sont fréquemment phosphorylés par différentes protéines kinases. Ainsi, les occludines semblent être impliquées dans la transmission de signaux cellulaires. L'extrémité carboxy-terminale est liée avec la protéine ZO-1 qui est elle-même en interaction avec le cytosquelette. L'occludine permet de renforcer la barrière épithéliale et confère une sélectivité de passage des molécules du pôle apical au pôle basolatéral.

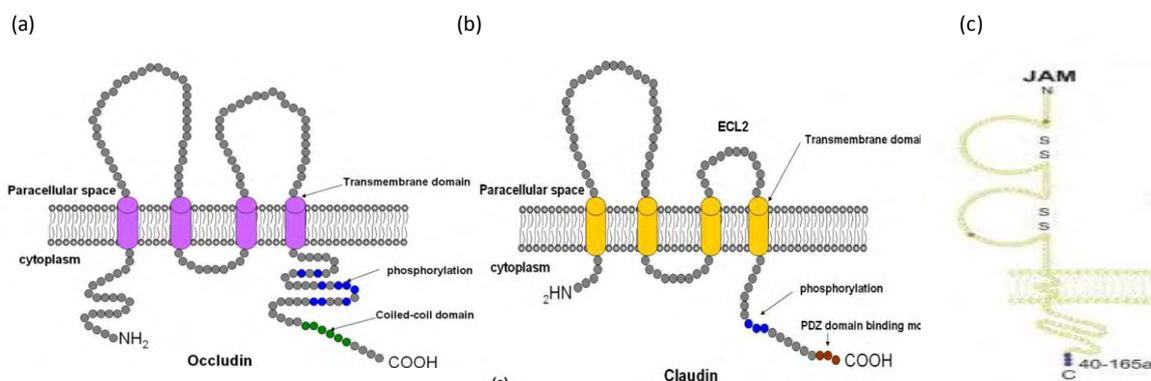


Figure 7 Structures des protéines des jonctions serrées.

(a) Claudines, (b) Occludine, (c) Jam A (Hu *et al.*, 2013, Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2007).

La molécule d'adhésion jonctionnelle-A (JAM-A) (Figure 7 c) est un membre de la famille des immunoglobulines. Cette protéine transmembranaire est constituée d'un peptide signal N-terminal, de deux domaines *Ig-like* extracellulaires, d'un domaine unique intramembranaire et d'une courte queue cytoplasmique. JAM-A est exprimée par plusieurs populations cellulaires dont les cellules épithéliales, endothéliales et les cellules de l'immunité. Cette protéine intervient dans la prolifération et la migration des cellules épithéliales. Elle joue un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de la barrière en contrôlant la perméabilité intestinale (Laukoetter *et al.*, 2007 ; Severson *et al.*, 2008 ; Nava *et al.*, 2011, Monteiro *et al.*, 2013).

Les protéines cytoplasmiques zonula occludens (ZO) comprennent trois membres : ZO-1, ZO-2, et ZO-3. Ces protéines possèdent un domaine de liaison aux protéines de jonctions adhérentes et serrées (Claudines et Occludine) ainsi qu'aux protéines du cytosquelette d'actine et de myosine. Par exemple la ZO-1 interagit avec la spectrine, elle-même reliée aux filaments d'actine du cytosquelette. Les protéines ZO jouent donc un rôle d'adaptateur permettant la liaison des jonctions serrées au cytosquelette d'actine, mais également à de multiples protéines régulatrices (Guillemot, 2008).

b) Régulation des jonctions serrées par le cytosquelette

L'assemblage des jonctions serrées est sous le contrôle de plusieurs voies de signalisations (Figure 8). Elles impliquent de multiples protéines dont celles de la famille des Kinases (protéine kinase C) et des phosphatases et celle des Rho GTPase qui vont réguler l'organisation du cytosquelette d'actine. Pour cela les Rho GTPase peuvent soit phosphoryler directement la protéine MLC (*myosin light chain*) soit inhiber la phosphatase de la MLC.

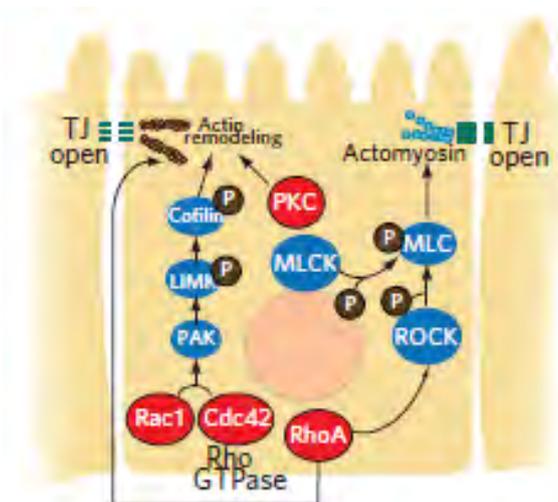


Figure 8 Voies de signalisations intracellulaires impliquées dans le contrôle des jonctions serrées. (Ashida *et al.*, 2011).

Les jonctions serrées représentent des structures dynamiques pouvant être régulées par de nombreux stimuli tels que les nutriments, les bactéries, les hormones, les cytokines et les cellules immunitaires (Nusrat *et al.*, 2000). Le cytosquelette est décrit comme un acteur important dans le maintien structural de la monocouche des cellules épithéliales. Il se compose de deux types de protéines : l'alpha intégrine qui se polymérise en microtubules et l'actine qui forme des filaments d'actine. Les microtubules jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité cellulaire, l'orientation du transport et de la sécrétion intracellulaire et

dans la coordination des mouvements des organelles. Les filaments d'actine s'associent avec la chaîne légère de myosine (MLC) et d'autres protéines pour former un anneau périjonctionnel d'actino-myosine (Turner, 2000). Celui-ci interagit avec les jonctions adhérentes et les jonctions serrées telles que la claudine et l'occludine (Mooseker MS *et al.* 1985, Turner, 2009). Lorsque l'anneau périjonctionnel est relâché (*Figure 9A*), la tension sur les jonctions serrées est réduite induisant la fermeture de celles-ci et la diminution de la perméabilité (Turner, 2000b). Les jonctions serrées peuvent ainsi être régulées par la phosphorylation de la MLC par la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) qui induit la contraction du cytosquelette (*Figure 9B*), l'ouverture des jonctions serrées (Moriez *et al.*, 2005) et ainsi une élévation de la perméabilité paracellulaire. En revanche, la présence de cytochalasine D (connue pour détruire les filaments d'actine), entraîne une importante désorganisation des microfilaments, la contraction de l'anneau périjonctionnel d'actino-myosine et par conséquent, une augmentation de la perméabilité des jonctions serrées (*Figure 9C*).

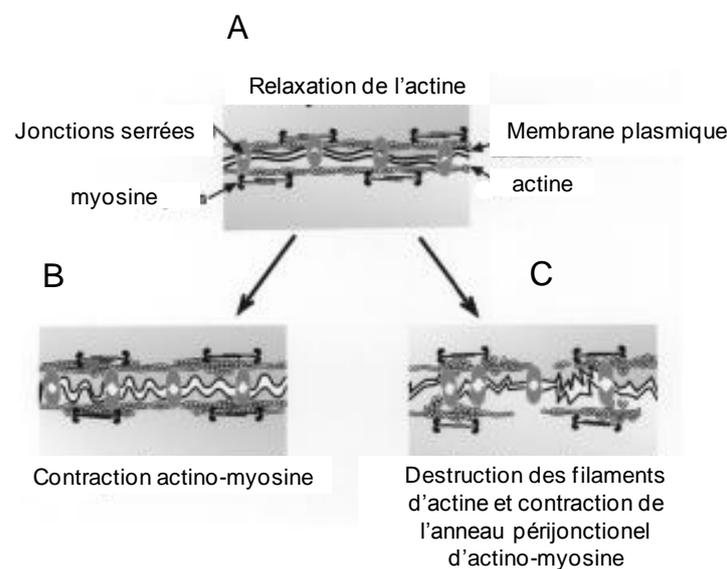


Figure 9 Modèle de régulation des jonctions serrées par le cytosquelette. (Turner, 2000).

1.3.3 La perméabilité intestinale

a) La perméabilité paracellulaire

La perméabilité paracellulaire correspond au passage des molécules entre les cellules épithéliales adjacentes. Ce sont les complexes de jonctions serrées qui régulent cette voie en permettant le passage d'ions et de molécules hydrophiles allant jusqu'à 600 Da (*Figure 10*) (Ménard *et al.*, 2010). La perméabilité paracellulaire est principalement déterminée par la taille des pores (Shen *et al.*, 2011) formés par les jonctions serrées, leur diamètre en

conditions basales étant estimé entre 4 et 9 Å au niveau des villosités et de 50-60 Å au niveau des cryptes. La diffusion des petites molécules au travers des pores dépend du gradient de concentration. En conditions physiologiques, la perméabilité paracellulaire est faible vis-à-vis des protéines de haut poids moléculaire. Pour les molécules de petite taille, la perméabilité peut être régulée par le cotransporteur de sodium et de glucose en augmentant le passage des ions et des molécules nutritives (Turner, 2000a). Cette sélectivité confère à l'organisme une barrière de protection vis-à-vis des macromolécules antigéniques (i.e. de haut poids moléculaire) dont la voie de passage préférentielle est la voie transcellulaire (Ménard *et al.*, 2010).

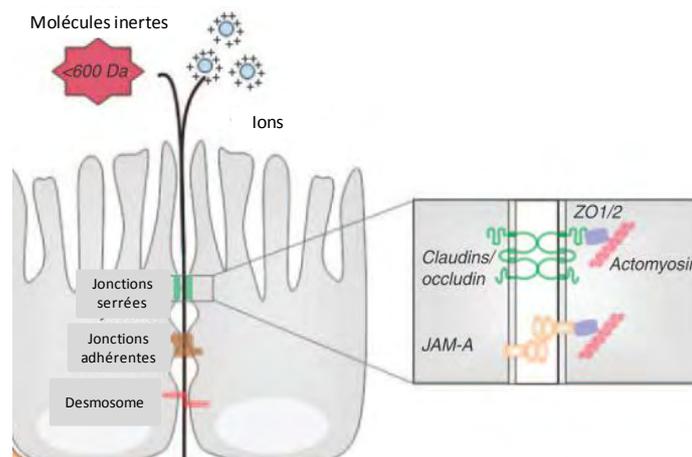


Figure 10 La perméabilité paracellulaire.

Elle correspond au passage de molécules de faible poids moléculaire au travers des pores formés par les complexes protéiques de jonctions serrées (Adapté de Ménard *et al.*, 2010).

b) La perméabilité transcellulaire

Elle est décrite comme étant le passage de molécules avec un poids moléculaire supérieur à 600 Da au travers des cellules épithéliales. Les composés lipophiles ont la capacité de diffuser au travers de la membrane plasmique et empruntent ainsi majoritairement la voie transcellulaire. En plus de cette diffusion passive, il existe des transports actifs faisant intervenir des transporteurs spécifiques comme pour les acides aminés ou le glucose. D'autres substances peuvent être transportées au sein de l'épithélium puis redirigées vers le côté luminal via des protéines d'efflux actifs, telles les P-gp qui permettent l'excrétion de xénobiotiques toxiques et de leurs métabolites (Konig *et al.*, 2013) (Figure 11).

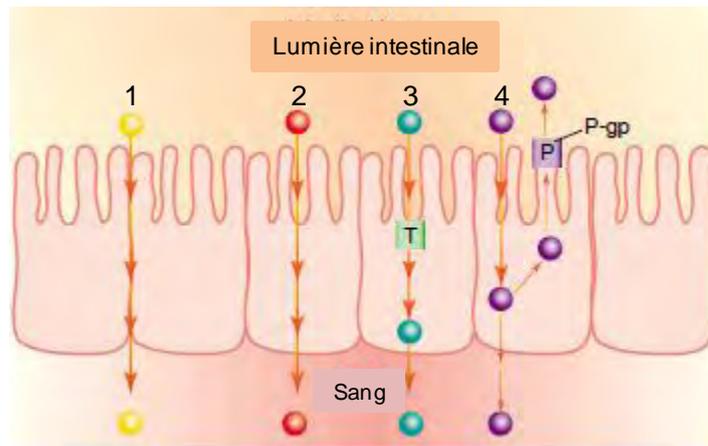


Figure 11 Les différentes voies de passage au travers de l'épithélium intestinal.

1) Voie de transport paracellulaire ; 2) transcellulaire passif ; 3) transcellulaire actif 4) transport via la protéine d'efflux P-gp (Adapté de Li, 2001).

Au sein du passage transcellulaire (*Figure 12*), il a été décrit une voie qui implique les mécanismes d'endocytose/exocytose médiés ou non par des récepteurs membranaires. Il s'agit pour les cellules épithéliales d'absorber les antigènes alimentaires pour les adresser vers deux voies différentes : i/ par la voie endosomale où l'antigène est redirigé vers la lamina propria, ii/ l'antigène partiellement dégradé est chargé en molécules de CMH de classe II pour être dirigé par exocytose vers la lamina propria, où l'interaction avec les cellules de l'immunité (cellules dendritiques) est favorisée (Raposo *et al.*, 1996). Le transport de grosses molécules comprend également celui des microorganismes dont le site majeur d'absorption est attribué aux cellules « M » et aux follicules lymphoïdes isolés. Les cellules dendritiques peuvent aussi directement échantillonner les bactéries dans la lumière intestinale, en projetant des extensions dendritiques entre les cellules (Rescigno *et al.*, 2001).

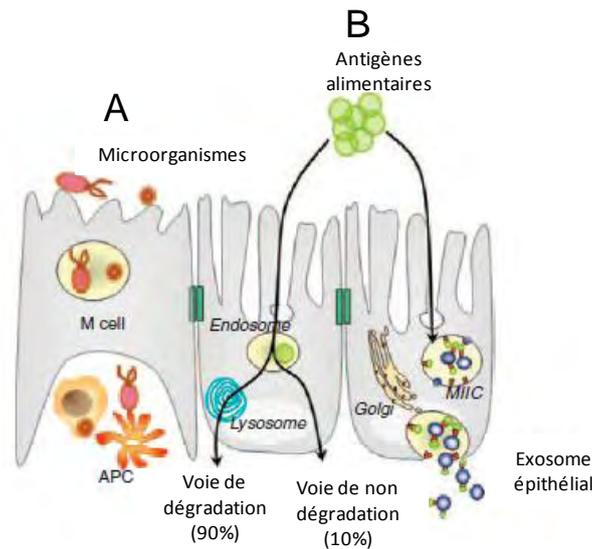


Figure 12 Les différents modes de passage transcellulaire.

Le passage des microorganismes s'effectue préférentiellement par les cellules « M » au niveau des plaques de Peyer (A) ; les antigènes alimentaires sont absorbés par les cellules épithéliales pour être adressés, via les endosomes, soit sous forme dégradés pour rejoindre la lamina propria (B côté gauche), soit être chargés en molécules de CMH de classe II et être exocytés avant d'interagir avec les cellules immunitaire (B côté droit) (adapté de Ménard *et al.*, 2010).

c) Reconnaissance et réponse immunitaire vis-à-vis des bactéries

La présence de bactéries est reconnue par les cellules de l'épithélium intestinal par un système de détection faisant intervenir notamment les TLR. Ils sont présents au niveau des cellules épithéliales et localisés du côté apical ou basolatéral. Ils sont décrits également au niveau des endosomes des cellules où ils peuvent interagir avec leurs ligands. Les TLRs se trouvent sur des cellules immunitaires : macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T, neutrophiles, cellules *natural killer* (NK), monocytes et éosinophiles. Outre le rôle de détecteur, les TLR sont impliqués dans l'activation du système immunitaire. Une fois la liaison du TLR aux PAMPS, le récepteur va moduler l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des facteurs antimicrobiens, des molécules de co-stimulation à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et des molécules du CMH. La réponse immunitaire diffère selon le pouvoir pathogène ou non des bactéries présentes dans la lumière intestinale. Ainsi l'identification des bactéries et l'activation du système immunitaire vont différer selon que la bactérie représente une menace pour l'homéostasie intestinale ou, au contraire, fait partie de la flore commensale. Dans le premier cas, le système immunitaire inné va être activé en premier dans le but de dégrader de manière rapide le pathogène, puis l'immunité adaptative prend le relais. A l'inverse, la reconnaissance des bactéries commensales implique des mécanismes dits de tolérance. Le microbiote est

maintenu à distance des cellules épithéliales intestinales et la sécrétion de cytokines promeut le pouvoir tolérogène des cellules immunitaires vis-à-vis du microbiote (*Figure 13*) (Brown *et al.*, 2013).

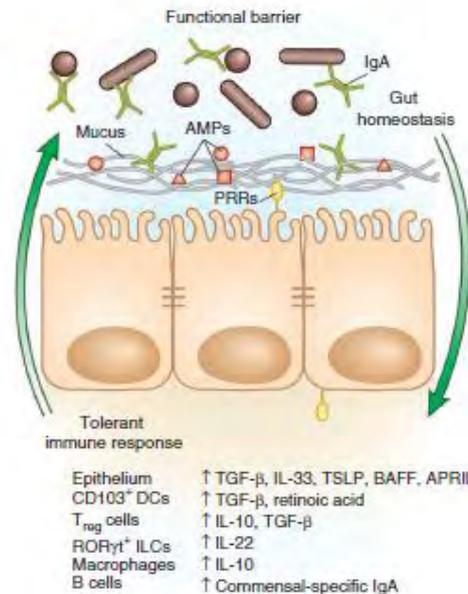


Figure 13 Le système immunitaire assure une réponse de tolérance vis-à-vis du microbiote.

La présence de PRRs, de mucus, d'AMPs et d'IgA contribuent à l'homéostasie dans le microbiote. Les bactéries commensales sont tenues à distance de l'épithélium intestinal, puis la reconnaissance des AMPs induit une réponse de tolérance par différents acteurs du système immunitaire. AMPs : Peptides antimicrobien ; PRR : Récepteurs reconnaissant les motifs bactériens (Brown *et al.*, 2013).

1.3.4 Méthodes d'évaluation de la perméabilité intestinale

La perméabilité intestinale peut être définie comme la capacité de passage d'un composé de la lumière intestinale au travers de la muqueuse vers le compartiment sanguin. Sa mesure est couramment utilisée comme index d'intégrité de la fonction de barrière. Elle peut être mesurée chez l'homme comme chez l'animal et fait appel à des méthodologies multiples. Les méthodes d'évaluation font appel à l'utilisation de molécules de taille variable, non métabolisées et non toxiques. Les marqueurs fréquemment utilisés se déclinent sous trois formes :

-*Les sucres,*

-*Les isotopes,*

-*Les polymères de polyéthylène glycols (PEG) de poids moléculaire variable.*

a) Méthodes d'évaluation non invasives

La méthode la plus utilisée pour mesurer la perméabilité intestinale chez l'homme est celle du test de perméabilité intestinale (TPI) permettant de valider biologiquement l'intégrité

ou, au contraire, la pathologie de la muqueuse intestinale (*Figure 14*). L'examen le plus fréquent consiste à faire consommer à une personne une quantité déterminée d'une solution à base de lactulose et de mannitol (0.1g/kg de poids corporel). Ces sucres sont des disaccharides et des monosaccharides respectivement. *In vivo*, le lactulose (396 Da) est considéré comme un marqueur de la voie paracellulaire et le mannitol (182.2 Da) un marqueur de la voie transcellulaire. En revanche, *in vitro*, on ne peut pas faire la distinction entre ces deux molécules (Bijlsma *et al.*, 1995). Après ingestion de lactulose et du mannitol, la personne doit rester à jeun pendant les deux heures suivantes en buvant de l'eau à volonté. Puis, les urines sont prélevées 5 heures après la prise pour mesurer la clairance urinaire du lactulose et du mannitol. Les données collectées sont étudiées en termes de variation du ratio du lactulose et du mannitol (L/R). Cette méthode de calcul permet de s'affranchir des effets de plusieurs facteurs, d'abord «pré-mucosaux» tels que la quantité réellement ingérée, la dilution par les sécrétions digestives, le temps de vidange gastrique, le temps de transit, puis «post-mucosaux» tels que la fonction rénale, la durée et le recueil des urines. Ceci a conduit à établir le principe dit de «l'excrétion urinaire différentielle de substances-test» (Menzies *et al.*, 1974) avec l'utilisation conjointe d'un disaccharide et d'un monosaccharide non métabolisables. La mesure de leurs concentrations urinaires permet d'avoir un ordre de grandeur de la taille des pores de l'intestin et par conséquent d'être un reflet de la taille des molécules exogènes qui passent dans la circulation générale.

Le lactulose est le disaccharide le plus utilisé dans les études de perméabilité intestinale, mais il existe d'autres oligosaccharides appropriés comme le mélitiose, le raffinose, le stachyose et les dextrans, qui regroupent les critères physico-chimiques requis. L'utilisation du cellobiose est à éviter du fait d'une petite activité cellobiosique intestinale (Bjarnasson *et al.*, 1995). Le L-rhamnose et le mannitol sont les monosaccharides les plus communément employés.

D'autres marqueurs tels que le $^{51}\text{Cr-EDTA}$ et le polyéthylène-glycol ont également fait l'objet de ce test. Les molécules marquées radioactivement telles que le Chrome-EDTA ($^{51}\text{Cr-EDTA}$) permettent de mesurer la perméabilité paracellulaire intestinale chez l'homme et chez l'animal de laboratoire, mais en clinique celles-ci présentent le désavantage d'être radioactives et non biodégradables. Le test au $^{51}\text{Cr-EDTA}$ possède donc des contre-indications pour l'enfant, la femme enceinte et a l'inconvénient d'être plus long que celui aux sucres. En effet le recueil des urines se fait après 24 heures, alors que pour les autres tests, le recueil se fait sur 5 heures. Même si une bonne corrélation a été décrite entre le test au

lactulose et le test au $^{51}\text{Cr-EDTA}$, l'utilisation de celui-ci, seul, reste un inconvénient qui ne permet pas de s'affranchir des facteurs pré- et post-mucosaux.

Les polymères d'éthylène glycol (PEG) sont des molécules de synthèse chimique ayant pour formule générale $\text{C}_2\text{nH}_4\text{n}+2\text{O}_\text{n}+1$ où la valeur de n varie de 4 à 150 selon le poids moléculaire. Il existe plusieurs formes de PEG utilisées pour évaluer la perméabilité intestinale (PEG 400, 600, 900, 1000, 3000 et 4000). Ils sont constitués de mélanges variables de polymères associés à des poids moléculaires différents. Le PEG 400 est le plus utilisé et contient des polymères de taille variable dont le poids moléculaire varie de 232 à 594, ce qui peut influencer directement sur la perméabilité intestinale. De plus, la voie de passage au travers de l'épithélium est discutée du fait de l'incertitude de la nature lipophile ou hydrophile des PEG. En clinique, le dosage urinaire est difficile à déterminer et n'est pas considéré comme un marqueur satisfaisant de la perméabilité intestinale (Peters *et al.*, 1988).

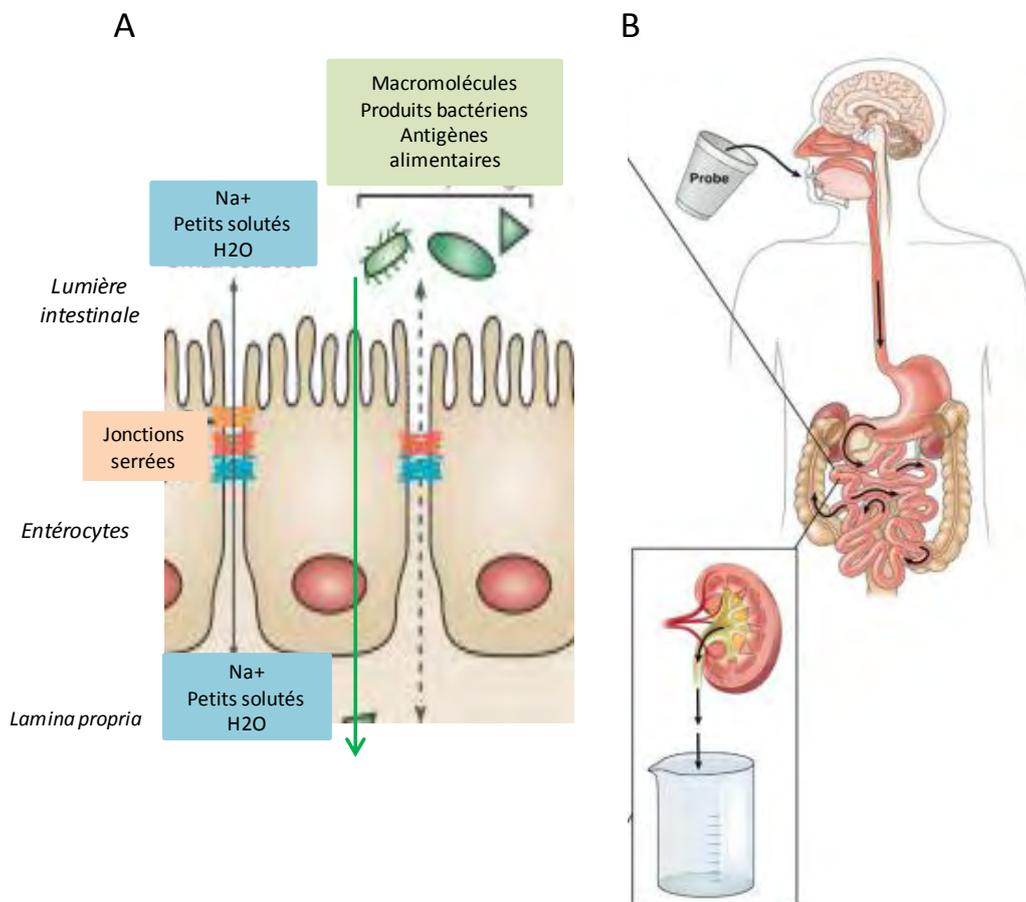


Figure 14 Méthode d'analyse de la perméabilité intestinale chez l'homme.

A L'épithélium intestinal fournit une barrière efficace aux macromolécules, aux produits bactériens et antigènes (Ag) alimentaires, mais un petit pourcentage peut traverser les jonctions serrées (flèche en pointillé). Les molécules de haut poids moléculaire et les bactéries empruntent préférentiellement la voie transcellulaire (flèche verte). **B** La perméabilité intestinale est le plus souvent estimée chez l'homme par la mesure de l'excrétion urinaire de marqueurs ingérés par voie orale (Adapté de Turner, 2009 ; Odenwald et Turner, 2013).

Bien que le poids moléculaire des marqueurs soit un facteur déterminant dans la mesure de la perméabilité intestinale, la structure et le diamètre sont également des éléments importants. C'est le cas du PEG qui présente une géométrie différente des autres marqueurs et qui doit être prise en compte. En effet une corrélation a été définie entre le diamètre des marqueurs et leur niveau de perméabilité (Figure 15). La forme linéaire des polymères de PEG pourrait donc leur permettre d'accéder à des pores aqueux (classe des aquaporines) et d'expliquer leurs taux élevés de perméabilité.

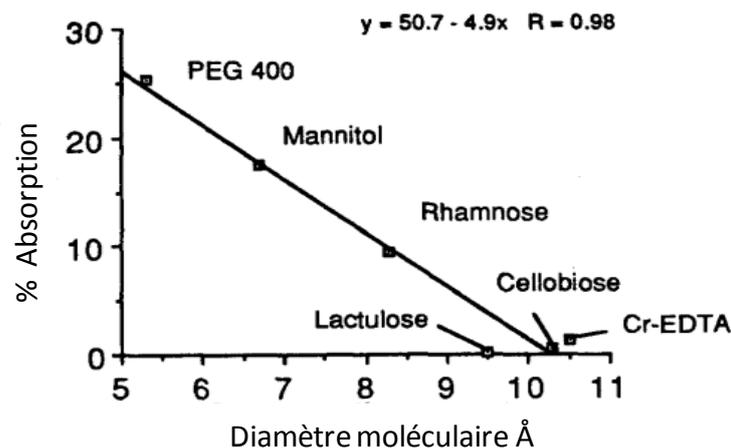


Figure 15 Corrélation entre le diamètre des marqueurs et le niveau de perméabilité. (Adapté de Bjarnasson *et al.*, 1995).

b) Méthode d'évaluation invasive chez l'animal

Les mesures *in vivo* de la perméabilité intestinale utilisent le marqueur Dextran-FITC, un polysaccharide de poids moléculaire variable couplé à un fluorophore, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Le poids moléculaire du Dextran-FITC utilisé en routine varie de 4 à 70 KDa. La technique consiste à administrer par gavage gastrique une solution de Dextran-FITC et à mesurer sa concentration plasmatique 4 heures suivant la prise. Cette durée correspond au temps nécessaire à la molécule pour arriver au niveau du côlon et permettre de déterminer une perméabilité intestinale totale. Le Dextran présente l'avantage d'être non toxique et non radioactif. Il est adapté pour mesurer la perméabilité chez le rat en période postnatale (Giannone *et al.*, 2006), puisque le dosage plasmatique permet de pallier aux difficultés liées au recueil des urines sur une longue période (au moins les 4 heures du test), rendu difficile non seulement par la faible quantité attendue, mais surtout la nécessité de séparer le raton de la mère et du reste de la portée, considéré comme facteur de stress, l'objet justement du travail de thèse.

c) Modèle d'évaluation *in situ*

La méthode consiste à injecter le marqueur par perfusion sur un segment intestinal chez un animal anesthésié. Par exemple, le $^{51}\text{Cr-EDTA}$ a été utilisé en perfusion et dosé au niveau du mésentère (Verdu *et al.*, 2008), alors qu'une autre étude utilisant le PEG a réalisé le dosage au niveau du sang porte (Gotteland *et al.*, 1989). Bien que les méthodes diffèrent selon les études, cette technique présente l'avantage de conserver la vascularisation et l'innervation des segments intestinaux. Les limites sont que l'intervention chirurgicale sous anesthésie générale pourrait modifier le débit sanguin et que cette méthode nécessite un grand nombre d'animaux.

d) Méthode d'évaluation *in vitro*

La perméabilité intestinale peut être évaluée localement sur biopsie humaine ou animale en utilisant la méthode des chambres de Ussing (*Figure 16*). Cette technique consiste à monter le segment intestinal d'intérêt entre deux compartiments correspondant aux côtés muqueux et séreux, baigné d'une solution physiologique maintenue à une température constante de 37° et oxygénée en permanence par du carbogène (95% O_2 , 5% CO_2). Cette méthode *in vitro* permet de maintenir l'intégrité fonctionnelle du tissu pendant 2 heures, une période suffisante pour apprécier la perméabilité du segment étudié, du pôle apical au pôle basolatéral, vis-à-vis de marqueurs, de tailles variables telles que le PEG, le Dextran-FITC et la *Horseradish peroxidase* (HRP). La mesure de la perméabilité est indirecte et consiste à réaliser le dosage des molécules étudiées. Les données obtenues permettent de définir la perméabilité intestinale vis-à-vis de la molécule testée qui est exprimée en fonction de la surface étudiée et du temps de la mesure ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$). Le passage transépithélial des molécules correspond au nombre de molécules ayant traversé la couche épithéliale et peut être déterminé en calculant le flux unidirectionnel exprimé en $\text{mol h}^{-1}\text{cm}^{-2}$.

La technique de mesure en chambre de Ussing permet également d'apprécier le transport actif des ions ; ces mouvements ioniques induisent une différence de potentiel de part et d'autre de l'épithélium exprimé en potentiel électrique (mV). L'intensité du courant (μA) correspond au courant ionique à travers l'épithélium. En imposant à la membrane différents potentiels on peut définir la relation entre le potentiel et le courant électrique permettant de déterminer la conductance ionique et tout particulièrement la résistance électrique du tissu exprimée en $\text{ohm}\cdot\text{cm}^2$. La résistance électrique (TER) est en lien avec le passage des ions et des petites molécules. Ces paramètres électriques permettent également de vérifier la viabilité

fonctionnelle du tissu au cours de l'étude. Ainsi, une valeur de résistance jugée trop faible peut être assimilée à une perméabilité intestinale exacerbée et non physiologique, témoignant d'une dégradation du tissu ou de son endommagement au montage.

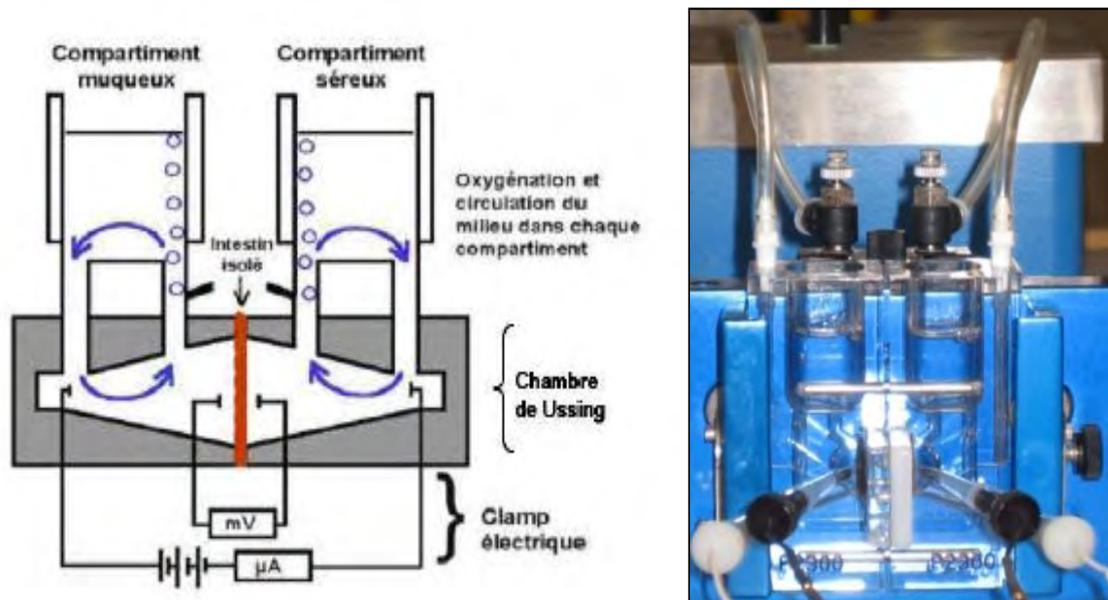


Figure 16 Montage en chambre de Ussing.

1.3.5 Translocation bactérienne : définition et méthodes d'évaluation

La barrière épithéliale, le système immunitaire et la flore intestinale sont les éléments clés dans l'homéostasie de la fonction de barrière de l'intestin. Lorsque l'un de ces trois composants est altéré, il peut se produire un phénomène dit de translocation bactérienne. (Balzan *et al.*, 2007). Il s'agit du passage de bactéries viables (bactériémie), d'endotoxines ou d'antigènes du tractus intestinal vers les ganglions mésentériques et les organes extra-intestinaux tels que le foie et la rate, pouvant s'accompagner d'une infection systémique. En conditions physiologiques, le phénomène de translocation concerne une faible quantité de microorganismes qui vont accéder à la *lamina propria* via un passage transcellulaire et favoriser une réponse immunitaire dite « de tolérance ». Cependant, ce passage est limité du fait de la perméabilité sélective de l'épithélium et de la réponse immunitaire adaptée. Ce n'est que lorsque ces derniers sont altérés que la translocation bactérienne va s'étendre au niveau systémique et devenir pathologique pour l'hôte. En condition pathologique, la translocation bactérienne a été décrite à la fois chez l'homme et chez l'animal, même si les données de la littérature s'appuient essentiellement sur ce dernier. Chez l'homme, il est montré que la translocation bactérienne est plus fréquente chez les patients atteints d'obstruction intestinale

et ceux immunodéprimés (MacFie, 2004), ainsi que dans le cas de cirrhoses (Chang *et al.*, 1998). La translocation bactérienne est associée à une forte incidence de septicémie (MacFie *et al.*, 1999). De nombreuses études ont établi un lien entre la microflore et les infections nosocomiales, mettant en évidence le rôle de l'intestin comme réservoir de bactéries et d'endotoxines (Emori et Gaynes, 1993 ; Marshall *et al.*, 1993). Cependant le lien direct entre ces observations et la translocation bactérienne au niveau intestinal n'a pas été établi. Cela reflète en particulier les difficultés à recueillir les échantillons nécessaires et le manque de méthodes non invasives suffisamment sensibles. Il existe tout de même des techniques dont le principe repose sur la détection de bactéries au niveau des ganglions mésentériques ou du sang porte, mais essentiellement accessibles dans le cas de chirurgies abdominales lourdes ou de septicémies graves (O'Boyle *et al.*, 1998). Les ganglions mésentériques et le sang porte représentent le lieu de passage des bactéries d'origine intestinale. Cependant selon les études réalisées, la corrélation entre la présence ou l'identité de la souche bactérienne présente dans l'intestin et celle retrouvée au niveau systémique reste discutée. La technique la plus répandue, aussi bien en clinique qu'en expérimentation animale, est la culture bactérienne de sang ou de ganglions lymphatiques mésentériques. Pour cela, les échantillons sont ensemencés dans des milieux de cultures à 37° pendant plusieurs jours. Ces milieux contiennent tous les éléments nutritifs (ions minéraux, facteurs de croissance, source de carbone et d'énergie) dont le microorganisme a besoin pour se multiplier. Pour ce faire, différents milieux existent avec une différence de consistance et de composition. Les milieux liquides favorisent la croissance bactérienne mais l'isolement des souches nécessite des milieux solides contenant de la gélose. D'autres peuvent être plus ou moins sélectifs et ainsi permettre de cibler une population bactérienne. Les milieux de culture non sélectifs (*Figure 17*) sont généralement composés d'une base nutritive constituée de molécules azotées (acides aminés, facteurs de croissance divers) provenant de l'hydrolyse de produit d'origine vivante (animale, végétale, mycélienne) comme les peptones, les extraits de viande ou de levure. Ces supports ne contiennent pas de molécules inhibitrices et permettent de cultiver un large spectre de bactéries. Pour pallier aux exigences de certaines souches de bactéries, il existe des milieux non sélectifs enrichis en molécules organiques apportées par le sang, le sérum, l'ascite, l'extrait globulaire ou par des suppléments polyvitaminiques. L'un des supports de culture les plus utilisés est la gélose au sang d'origine diverse (cheval, mouton, lapin), qui favorise la culture des bactéries anaérobies strictes (*Figure 17*). Pour identifier plus finement une source bactérienne, il existe des milieux sélectifs qui empêchent la culture de certaines

bactéries par sélection chimique ou antibiotique. Ces supports donnent un ou plusieurs caractères biochimiques d'orientation de la bactérie permettant son identification.



Figure 17 Gélose schaedler au sang frais et Gélose Trypcase soja.

Les bactéries les plus aptes à « transloquer » sont les bactéries « Gram négatif » (O'Boyle *et al.*, 1998, MacFie *et al.*, 1999). Un des composants de la paroi externe de celles-ci, le lipopolysaccharide (LPS), a pu être identifié grâce au développement de la technique du Lysat d'amœbocytes de limule (LAL). En clinique, lors d'infections, il existe une libération spontanée de LPS, ou provoquée lors de la lyse bactérienne induite par les antibiotiques. Ainsi le dosage sérique de cette endotoxine pourrait permettre un diagnostic précoce des infections à bactéries gram négatif. Ce test repose sur la réaction d'oxydation entre le LPS et la lymphé du crabe *Limulus ameobocyte* contenu au sein du réactif. Cependant ce test a été décrit comme étant peu sensible et peu spécifique à l'infection. Ceci semble lié au fait que la lymphé utilisée dans le LAL réagit avec plusieurs agents pathogènes, rendant le test peu spécifique (Marshall *et al.*, 2002). Un autre test : l'Endotoxin Activity (EA) s'est développé et permet de révéler la présence de LPS dans le sang par des anticorps murins anti-endotoxine marqués par le lumipol 3. Ce test semble avoir une meilleure corrélation entre le dosage d'endotoxines et les infections à bactéries gram négatif que le test LAL (Marshall *et al.*, 2004).

Pour pallier à l'absence de tissus disponibles en clinique et dans le souci d'augmenter la sensibilité de détection, des études ont suggéré d'évaluer la présence bactérienne par l'analyse de l'ADN bactérien par PCR (Réaction de Polymérisation en chaîne ; Kane TD *et al.*, 1998). Cette méthode consiste à détecter ou à identifier l'ADN par les techniques de PCR universelle ou par PCR spécifique (Figure 18). La PCR universelle présente un large spectre taxonomique consistant à amplifier un gène commun à toutes les bactéries, le gène ARN ribosomal 16S. Après l'amplification, une étape de révélation consiste à faire migrer les échantillons sur un gel d'agarose, permettant de vérifier la présence ou l'absence de bactéries. Les étapes de séquençage et de comparaison aux banques de données sont nécessaires pour identifier la bactérie en cause. En revanche, la PCR spécifique est une approche ciblée sur un

microorganisme en utilisant des amorces spécifiques. La PCR est une méthode très sensible ; elle peut dans certains cas s'appliquer directement à l'échantillon à analyser, supprimant ainsi les délais de mise en culture et les problèmes liés aux germes non cultivables. Cette méthode présente l'avantage d'être plus rapide que les méthodes classiques. Cependant elle présente le désavantage d'être non discriminante pour des bactéries génétiquement proches.

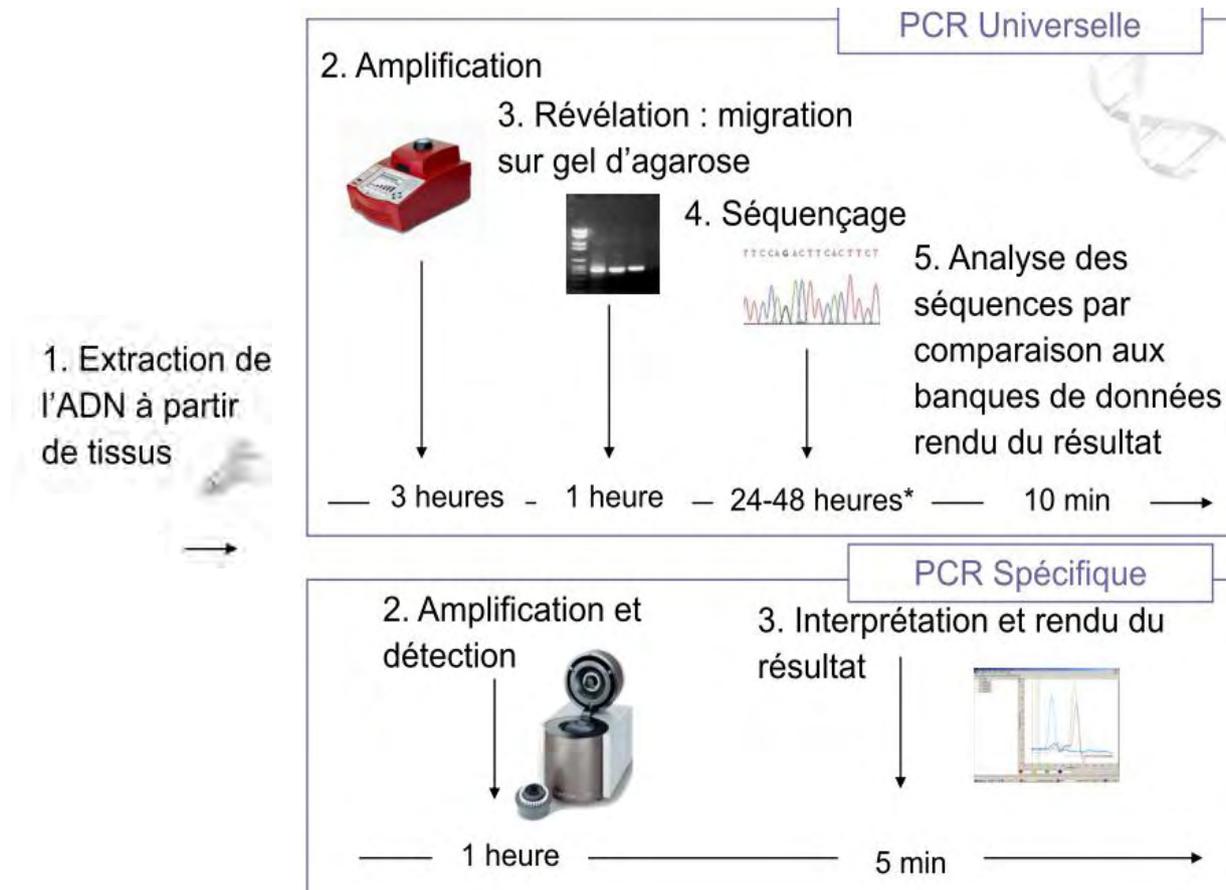


Figure 18 Les méthodes de détection bactérienne par PCR : universelle et spécifique. D'après « outils diagnostiques moléculaires », Boisset, 2008.

2 Le foie

2.1 Anatomie et composition cellulaire

De nombreux signaux tels que des nutriments, des hormones, des antigènes potentiels et des produits bactériens (Jacob *et al.*, 1977) sont adressés par l'intestin en direction du foie par l'intermédiaire de la veine porte. Le foie présente la particularité de recevoir les 2/3 des apports vasculaires d'origine veineux et 1/3 en provenance du sang artériel. Il se compose de plusieurs lobes (Malarkey *et al.*, 2005) entre lesquels se trouve généralement la vésicule

biliaire qui reçoit, concentre et stocke la bile produite par le foie. Les sels biliaires sont acheminés via le canal hépatique qui rejoint le canal issu du pancréas pour se déverser dans le duodénum via le canal cholédoque, favorisant ainsi l'émulsion des graisses et leur absorption intestinale. La vésicule biliaire est présente chez l'homme et la souris, mais non chez le rat qui en est dépourvu : ce sont alors les canaux biliaires qui jouent un rôle analogue.

L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique (*Figure 19*) qui présente une forme polyédrique, est centré sur la veine centrolobulaire et est limité à ses angles par les espaces portes où cheminent les vaisseaux sanguins : veine porte, artère hépatique et le canal biliaire.

Les principales cellules du foie sont :

-**Les hépatocytes** représentent 60 à 80% des cellules du foie. En conditions physiologiques, ils peuvent présenter plusieurs noyaux. Ces cellules sont impliquées fortement dans les activités métaboliques (riches en mitochondries et peroxyosomes) et dans la dégradation des molécules circulant dans le sang. Elles synthétisent et sécrètent également les acides biliaires.

-**Les cellules endothéliales** appelées cellules sinusoidales bordent la paroi des vaisseaux sanguin.

-**Les macrophages résidents** appelés également cellules de Kupffer sont situées au niveau des sinusoides et présentent une activité phagocytaire permettant l'élimination des vieilles hématies et autres débris particuliers de la circulation.

On trouve également d'autres cellules de l'immunité telles que les lymphocytes B, T et les cellules NK (pour Natural Killer) qui ont une activité cytolytique vis-à-vis des cellules infectées ou tumorale.

-**Les cellules biliaires** sont les cellules épithéliales de revêtement impliquées dans les fonctions de transport entre le milieu intérieur et la bile.

-**Les cellules stellaires** ou cellules de Ito ne représentent pas plus de 1% des cellules hépatiques : elles participent notamment au stockage de la vitamine A.

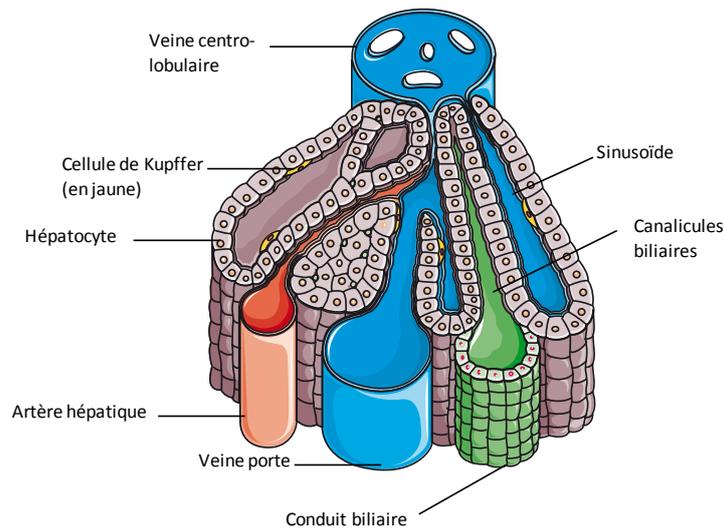


Figure 19 Schéma représentatif du lobule hépatique.
(Adapté de Servier Medical Art).

2.2 Principales fonctions hépatiques

2.2.1 Fonctions métaboliques

Le foie se trouve au carrefour de différentes voies métaboliques. Les nutriments lui sont apportés par la riche vascularisation splanchnique. Ils pourront être stockés ou bien transformés avant d'être redistribués vers la circulation générale. Cela fait du foie un organe clé dans la régulation du métabolisme énergétique. Il adapte ses fonctions de stockage ou de libération d'énergie selon les apports nutritionnels qui lui sont fournis. Ainsi le foie est impliqué dans la régulation du métabolisme des glucides, des lipides et des acides aminés. Les principaux glucides d'origine alimentaire sont le glucose, le fructose ou encore le galactose. En période post-prandiale (après un repas), le pancréas sécrète de l'insuline qui va agir sur différentes voies de transport et de métabolisme visant à favoriser le stockage des lipides et des glucides. Les glucides et les lipides vont être orientés vers différentes voies métabolique (Bechmann *et al.*, 2012) pour permettre leur stockage.

Après un repas, le glucose va emprunter trois principales voies métaboliques :

- La glycolyse** correspondant au stockage du glucose sous forme de glycogène,
- La glycolyse** permettant de fournir l'énergie à partir de glucose,
- La lipogenèse de novo** permettant la production d'acides gras à partir d'acétyl-CoA (issu de la glycolyse via la pyruvate deshydrogénase ou de la beta-oxydation des acides gras).

Les lipides alimentaires sont adressés au foie sous forme de chylomicrons, assemblés dans les entérocytes et composés majoritairement de triglycérides et dans une moindre mesure de

phospholipides et d'esters de cholestérol. Les chylomicrons sont transportés via la lymphe. Les tissus périphériques peuvent capter des acides gras issus de l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons via l'action de la lipoprotein lipase (LPL). Le foie capte les chylomicrons (intacts ou résidus de chylomicrons) via les récepteurs au LDL. Au niveau du foie, les lipides alimentaires sont ensuite utilisés, stockés, transformés et/ou sécrétés sous forme de VLDL (very low density lipoprotein) pour être distribués aux tissus périphériques via la circulation générale.

En ce qui concerne le métabolisme intracellulaire des acides gras, le foie est capable de réaliser à la fois de la synthèse de novo d'acide gras à partir d'acetyl-CoA (cf ci-dessus) et de cataboliser les acides gras. Le catabolisme des acides gras s'effectue via la voie de la beta-oxydation qui est une réaction conduisant à la formation d'ATP et qui se produit au niveau de la mitochondrie (acides gras à chaîne courte) ou du peroxysome (acides gras à longue chaîne) ou bien par la voie de l' ω -hydroxylation microsomale qui fait intervenir des cytochromes P450 de la famille 4a. Le récepteur nucléaire PPAR α , très exprimé au niveau du foie, est un acteur majeur de la régulation du catabolisme des lipides. Il peut être activé par des acides gras d'origine alimentaire (Martin PG *et al.*, 2007) et divers autres dérivés lipidiques (Montagner *et al.*, 2011), ainsi que par des médicaments de la famille des fibrates. Dans le noyau, il forme un dimère avec le récepteur RXR (Retinoid-X-Receptors) pour activer la transcription de ses gènes cible, dont plusieurs sont impliqués dans l'oxydation des acides gras. Le récepteur PPAR α est également activé lors de la réponse au jeûne.

En période de jeûne, les réserves énergétiques qui sont sous forme de glycogène, de triglycérides et de protéines vont être mobilisées de manière séquentielle. Lors de la phase initiale du jeûne, les réserves en glycogène s'épuisent rapidement conduisant à une chute de la glycémie et la voie de la néoglucogenèse réalisée à partir des acides aminés issus de la protéolyse musculaire est alors sollicitée afin d'assurer l'apport en glucose. Le foie fournit également aux tissus périphériques des corps cétoniques, produits par la céto-genèse dans les mitochondries à partir des substrats de la beta-oxydation. En parallèle, les tissus non glucodépendants, largement privés de glucose, utilisent les acides gras issus de la lipolyse du tissu adipeux comme substrats énergétiques via la voie de la β -oxydation.

2.2.2 Fonctions de détoxification

Avec l'intestin grêle, le foie joue le rôle princeps de «filtre» de l'organisme vis à vis de molécules potentiellement toxiques telles que les contaminants ou les médicaments. Ces xénobiotiques sont métabolisés en trois phases faisant intervenir différentes enzymes. La

Phase I, ou fonctionnalisation, fait intervenir préférentiellement les cytochromes P450 et consiste à ajouter un groupement polaire (-OH) au xénobiotique. La Phase II, ou conjugaison, permet de coupler le xénobiotique à une molécule polaire afin d'en faciliter le transport puis l'élimination. Cette étape est catalysée par des enzymes telles que les UDP-glucuronosyltransférases, les sulfotransférases, les N-acétyltransférases, les glutathion S-transférases, méthyltransférases et la catéchol O-méthyltransférase. La Phase III consiste à transporter le xénobiotique via divers transporteurs (ABC transporteurs, Slc...) afin d'en permettre l'élimination (Zmrzljak et Rozman, 2012).

2.2.3 Fonctions immunitaires

Le foie est doté d'un système immunitaire inné faisant principalement intervenir les cellules de Kupffer. Ces cellules peuvent être activées par des motifs bactériens tels que le LPS et présentent la capacité de dégrader les molécules opsonisées par les immunoglobulines (IgG) et les molécules du complément (C3b) qui pénètrent le foie (Parker *et al.*, 2005). Ces cellules vont ainsi initier et orchestrer les premières phases de la réponse en jouant un rôle modulateur de la prolifération et de la différenciation de populations lymphocytaires via la sécrétion de cytokines. La réponse immunitaire hépatique se traduit également par des variations dans la production des protéines dites « de phase aigüe » suite à une stimulation par des cytokines telles que l'IL6, l'IL1 et le TNF alpha. Ce groupe protéique va participer à la réponse inflammatoire, il comprend des facteurs de coagulation tels que le fibrinogène et des protéines de transport tels que l'hémopexine et l'haptoglobine (Hp) qui facilitent l'évacuation de l'agent potentiellement toxique. La protéine C réactive permet l'activation du complément et présente la capacité d'opsoniser des ligands en vue de leur phagocytose. Ces protéines ont leur concentration sanguine fortement modifiée au cours de l'inflammation et sont ainsi utilisées en clinique comme marqueurs (Cray *et al.*, 2009).

La deuxième ligne de défense vis-à-vis de pathogènes est constituée des cellules de l'immunité adaptatives : les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T. Ces derniers diffèrent des lymphocytes circulants notamment par leur profil cytokinique ; on dénombre ainsi les lymphocytes T helper (Th1 et Th 2) et les lymphocytes NK.

Les lymphocytes T peuvent interagir grâce aux molécules membranaires CD40, CD80 et CD86 avec les cellules endothéliales qui expriment des molécules de CMH de classe I et II. Cet échange va permettre la mise en place d'une tolérance des antigènes d'origine alimentaire (Racanelli et Rehermann, 2006).

2.3 Exemples de cross talk « intestin-foie »

En plus de leur proximité anatomique, l'intestin et le foie partagent donc plusieurs fonctions et de nombreuses études indiquent un dialogue plus étroit entre les deux organes (Zeuzem, 2000), comme le rôle important joué par la microflore et l'épithélium intestinal dans les maladies du foie, telle que la cirrhose (Pijls *et al.*, 2013). C'est notamment le cas des endotoxines issues des bactéries intestinales gram négatif contribuant à la pathogénèse alcoolique du foie. Chez le rat, une prise aigüe ou modérée d'alcool induit une altération de la barrière intestinale, accompagnée d'une augmentation de la perméabilité associée à une endotoxémie. Les effets délétères de l'alcool nécessitent la présence de la flore bactérienne responsable de l'oxydation de l'alcool en acétaldéhyde. L'acétaldéhyde, en stimulant les mastocytes, induit une altération de la barrière intestinale qui, à son tour, va faciliter le passage de bactéries ou d'autres antigènes luminaux (e.g. endotoxines) vers le milieu interne (Ferrier *et al.*, 2006). Ce mécanisme est responsable de l'inflammation hépatique, notamment par la sécrétion de cytokines par les cellules de Kupffer, de prostaglandines et de radicaux libres de façon inadaptée, perturbant l'équilibre fonctionnel du lobule et s'accompagnant d'une augmentation de perméabilité du sinusöide. Les effets observés au niveau de l'intestin pourraient ainsi contribuer à la pathogénèse alcoolique du foie en causant des dommages cellulaires qui comprennent une nécrose des hépatocytes, des infiltrats inflammatoires de neutrophiles et des dépôts de collagène (*Figure 20*).

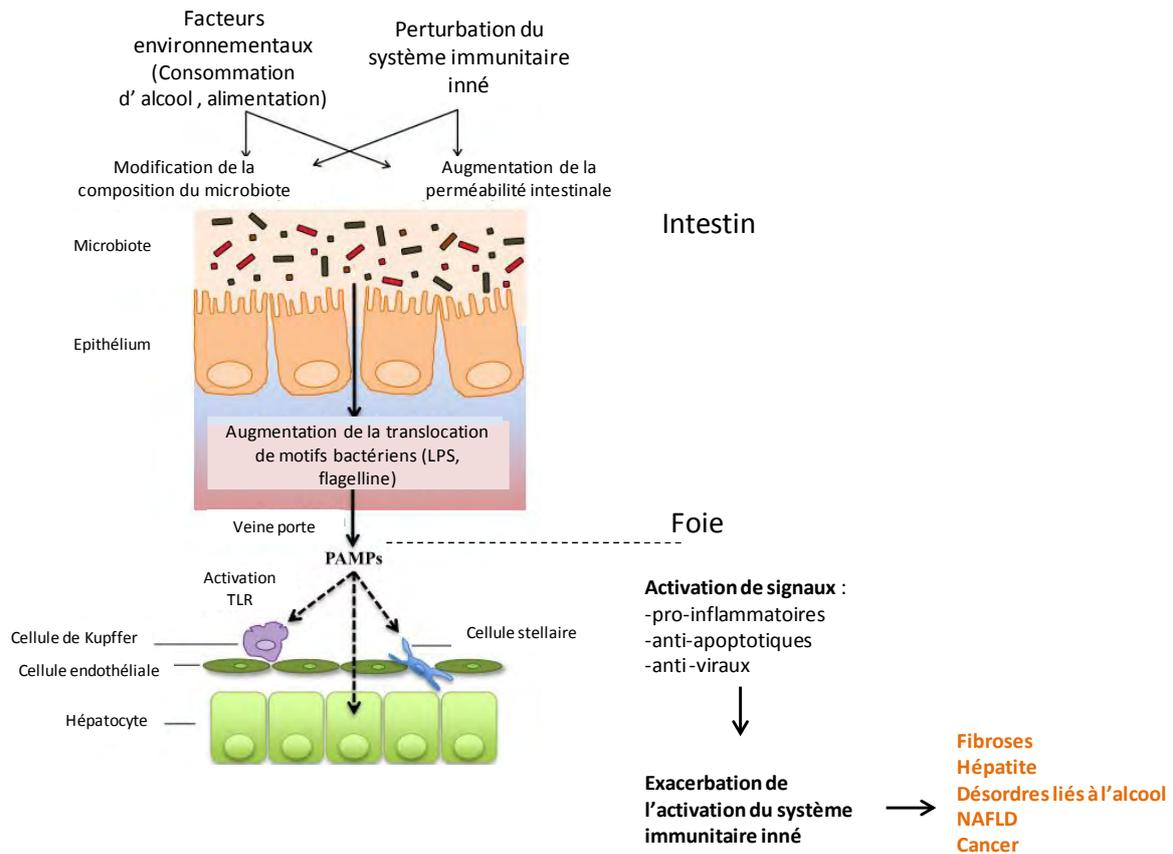


Figure 20 Une modification de la composition du microbiote et de la perméabilité intestinale peut promouvoir certaines pathologies du foie.

(Adapté de Chassaing *et al.*, 2013).

En clinique, il a été observé un taux élevé d'endotoxines chez les patients atteints de maladies hépatiques chroniques, d'autant plus dans les stades avancés de cirrhose (Lumsden *et al.*, 1988 ; Nolan *et al.*, 1989). Alors que l'alcoolisme et l'infection restent les causes majeures des pathologies hépatiques, une autre forme d'atteinte nommée NAFLD pour *Non-alcoholic fatty liver disease* a été décrite et correspond à la stéatose hépatique non alcoolique (Chassaing *et al.*, 2013). Elle est associée à l'apparition du syndrome métabolique qui comprend l'obésité, la résistance à l'insuline / diabète de type 2, l'hyperlipidémie et l'hypertension (Souza *et al.*, 2012). L'incidence de la NAFLD est estimée à 30% dans les pays industrialisés et à 10% dans les pays en voie de développement, des chiffres qui ne cessent d'augmenter (Smith et Adams, 2011). Par ailleurs, la stéatose peut évoluer en stéatohépatite non alcoolique (nommée NASH pour Non Alcoholic Steato-Hepatitis) où une inflammation souvent accompagnée d'une fibrose peut s'installer. De nombreuses études suggèrent que la microflore intestinale joue un rôle pivot dans la pathogénèse de la NAFLD (Delzenne *et al.*, 2013). En clinique, celle-ci est associée à une augmentation de perméabilité intestinale

(résultat d'une altération des protéines de jonctions serrées) ainsi qu'à une augmentation des niveaux plasmatiques de LPS (Chassaing *et al.*, 2013). La modulation de la flore microbienne reste une perspective thérapeutique envisagée dans ce contexte inflammatoire qui peut atteindre des formes plus avancées de fibrose (Frasinariu *et al.*, 2013) et est suspectée de favoriser le développement d'hépatocarcinomes (Lade *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été proposé un modèle illustrant les interactions possibles de la microflore avec la perméabilité intestinale, l'endotoxémie, le TNF α et le stress oxydatif au cours des pathologies hépatiques (Figure 21).

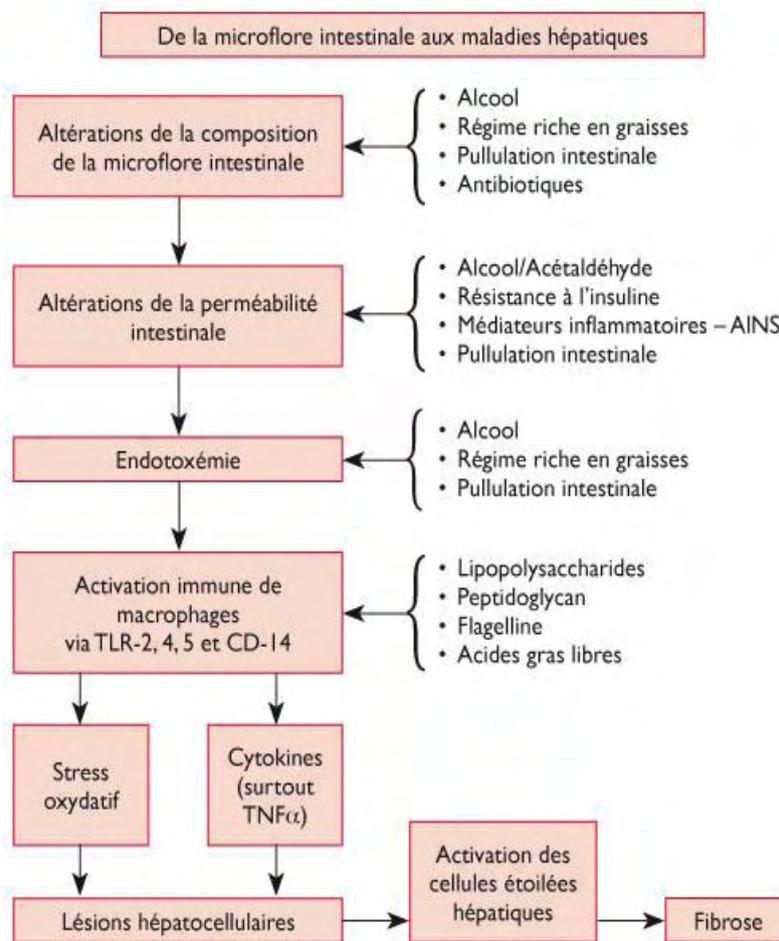


Figure 21 Modèle simplifié des interactions possibles entre la microflore intestinale, la perméabilité intestinale, l'endotoxémie, le TNF α et le stress oxydatif au cours des stéatohépatites alcooliques (ASH) et non alcooliques (NASH). (D'après Seirafi *et al.*, 2011).

CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT PERINATAL DE L'AXE INTESTIN-FOIE

1 Maturation de la fonction de barrière intestinale

1.1 Séquence de développement de l'intestin chez l'homme

L'épithélium intestinal se développe dès les premiers stades embryonnaires et les structures de bases sont formées à la fin du premier trimestre de gestation (Montgomery *et al.*, 1999), passant d'un épithélium stratifié à une monocouche de cellules cylindriques. De façon contemporaine s'établit l'axe crypto-villositaire. Les villosités vont disparaître au niveau colique en semaine 30 de gestation. Le processus de maturation est fortement influencé par l'action de facteurs de croissance et de cytokines présents dans le liquide amniotique et la circulation sanguine, respectivement. Le facteur de croissance épidermique (EGF : Epidermal Growth Factor), le facteur de croissance de transformation (TGF β : transforming Growth Factor) et le facteur de croissance apparenté à l'insuline (IGF : Insulin-like Growth Factor) sont des régulateurs clés de la croissance et de la différenciation de l'intestin (Pacha *et al.*, 2000). Les principales cellules de l'épithélium vont émerger d'une même cellule souche indifférenciée et apparaître dès la semaine 8 de gestation pour les entérocytes, les cellules entéroendocrines et les cellules caliciformes. La production de l'épithélium n'est pleinement effective qu'à partir de la 12^{ième} semaine de gestation. Les protéines de jonctions serrées vont quant à elle apparaître dès la semaine 10 de gestation.

Les cellules de l'immunité sont formées entre les 12 et 19^{ième} semaines de gestation. C'est le cas notamment des cellules de Paneth identifiables dès la 12^{ième} semaine, qui commencent à produire des molécules de type défensines à la semaine 13 et du lysozyme à la semaine 20. Les cellules M et les plaques de Peyer apparaissent aux semaines 17 et 19 de gestation, respectivement. La présence des cellules dendritiques et des zones distinctes des lymphocytes T et B sont identifiables à la 19^{ième} semaine de gestation (Maheshwari et Zemlin, 2009).

La transition du stade foetal à la naissance se fait notamment par la croissance et la maturation de l'épithélium intestinal, fortement influencées par les hormones telles que les corticoïdes, l'insuline et les facteurs de croissance présents dans le lait maternel (Cummins *et al.*, 2002) et par la colonisation bactérienne qui va s'installer progressivement, pour atteindre dès la première année de vie un profil, certes distinct mais convergeant à celui d'un adulte (Hooper *et al.*, 2004).

1.1.1 Implication des glucocorticoïdes dans la maturation intestinale

Dans le modèle murin, il a été décrit que les GC favorisaient la maturation de l'épithélium intestinal en période postnatale précoce. Pour le mettre en évidence, il a été montré que l'inhibition de l'enzyme 11β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11β -Hsd) impliquée dans la conversion de la corticostérone (forme active) à la 11-dehydrocorticostérone (forme inactive), et augmentant ainsi l'accès de la corticostérone au récepteur des glucocorticoïdes (GR), s'accompagnait d'une stimulation de la croissance de l'intestin grêle, ainsi que d'une augmentation de la taille des villosités et de la profondeur des cryptes chez les rats exposés au 8^{ème} et au 14^{ème} jour postnatal, un effet perdurant 10 jours (Pacha *et al.*, 2003). Chez la souris âgée de 20 jours, l'inhibition de la 11β -Hsd est sans conséquence sur ces paramètres, suggérant une sensibilité âge-dépendante de l'action des GC dans le développement morphologique de l'épithélium intestinal (Pacha *et al.*, 2003). Un effet comparable a été relevé au niveau du côlon chez le rat, où la profondeur des cryptes et la longueur des villosités étaient plus élevées chez les nouveau-nés traités aux GC au 8^{ème} ou au 10^{ème} jour de vie par rapport au groupe contrôle, alors que ce même traitement était sans effet s'il est administré à 14 jours postnatal. Dans l'ensemble, ces données ont suggéré une sensibilité différentielle de l'intestin aux GC circulants selon l'état de maturité de l'organe (Solomon *et al.*, 2001, Gartner *et al.*, 2001).

Par ailleurs, il a été décrit que l'administration d'hydrocortisone à des rats en période de lactation accélérât le processus de maturation intestinale, en augmentant la galactosylation et fucosylation des glycoprotéines, deux marqueurs biochimiques associés à une maturation cellulaire de l'intestin grêle et normalement visibles qu'après le sevrage (Biol-N'garagba *et al.*, 2003). Au niveau cellulaire, d'autres données chez le rat ont montré que le traitement à l'hydrocortisone durant la période de sevrage (18-24 jours) induisait la formation de jonctions serrées au niveau des entérocytes, la maturation des microvillosités et la réorganisation du réticulum endoplasmique et du trans golgi (Quaroni *et al.*, 1999).

Chez la souris âgée de 8 jours, l'exposition à la Dexaméthasone, un GC de synthèse, induit une modification rapide et significative d'un grand nombre de gènes impliqués dans de multiples fonctions de l'intestin grêle (comme le métabolisme), avec un effet apparent entre 2 et 6 heures après le traitement et une perte d'effet 24 heures après traitement (Agbemafle *et al.*, 2005). *In vitro*, l'exposition à l'hydrocortisone a des effets sur la différenciation et la prolifération des cellules intestinales de fœtus et sur les fonctions enzymatiques digestives (Arsenault et Menard, 1985). Les GC seraient impliqués dans la maturation des fonctions

enzymatiques, qui correspond notamment à une diminution de l'activité de la lactase et à une augmentation des activités de la sucrase, de la maltase et de la peptidase (Henning *et al.*, 1975). Plus récemment, une analyse transcriptomique à haut débit a permis d'identifier les gènes modulés suite à une exposition à l'hydrocortisone d'une lignée de cellules d'entérocytes humains (Lu *et al.*, 2011). Les résultats soulignent notamment des catégories de gènes participant à la différenciation et à la maturation des entérocytes. De manière intéressante, on constate que certaines protéines participant à l'adhésion, à la polarisation et d'autres impliquées dans le complexe des jonctions serrées étaient affectées, en particulier pour certaines protéines de la famille des claudines dont l'expression de l'ARNm était augmentée après traitement aux GC.

En clinique, il a été montré que les nouveaux nés prématurés ayant reçu une thérapie anténatale aux GC présentaient un haut niveau de gastrine (régulateur des sécrétions gastriques) à la naissance et de motiline (régulateur de la motilité) plasmatique en période de lactation. Ces données suggèrent un rôle stimulateur des GC dans la sécrétion de peptides impliqués aussi bien dans le contrôle des fonctions digestives que dans le développement structurel et fonctionnel de l'intestin. Mais il reste encore à vérifier si ces effets résultent de l'augmentation de l'absorption des nutriments (Costalos *et al.*, 2003).

Sur un modèle de xénogreffe intestinale chez la souris immunodéprimée, correspondant à la transplantation d'un intestin grêle issu de fœtus au stade 20 semaines de gestation, il a été montré que la cortisone accélérât la maturation de l'activité de la lactase (Nanthakumar *et al.*, 2003). De plus, ce modèle a montré une atténuation de la réponse inflammatoire après un traitement aux GC. En effet, après induction d'une inflammation par l'IL1-beta ou par du LPS sur une culture d'organe réalisée à partir de la xénogreffe, les cytokines IL8 et IL6 présentaient un niveau de sécrétion plus faible après traitement aux GC par rapport au groupe contrôle (Nanthakumar *et al.*, 2005). De manière intéressante, il a été mis en évidence que ces effets observés au stade 20 semaines ne l'étaient plus à 30 semaines, suggérant l'existence d'une période de sensibilité aux GC chez l'homme, à l'instar de ce qui a été précédemment décrit chez le rongeur en période postnatale.

1.1.2 Maturation des complexes de jonctions serrées et données de perméabilité

Les modèles rongeurs contribuent largement à l'acquisition de connaissances sur le développement de la barrière épithéliale, tout particulièrement sur la régulation de sa perméabilité. Il a été notamment décrit le profil d'évolution périnatale de protéines de jonctions serrées impliquées dans la régulation de la voie paracellulaire. Chez la souris, pour

laquelle on dispose d'outils et d'informations génétiques plus développées, le profil d'expression de l'occludine, des claudines, de la JAM et de la ZO-1 a été caractérisé par qRT-PCR (*Quantitative real-time PCR*) et les protéines localisées par la technique d'immunohistochimie au sein du tractus intestinal en cours de développement (Holmes *et al.*, 2006). Il a été rapporté que seule l'expression et la localisation des protéines de la famille des claudines sont fortement modifiées de la naissance à l'âge adulte, les autres protéines ayant un niveau d'expression stable au cours de cette période. L'ensemble des protéines de la famille des claudines sont déjà exprimées à la naissance, majoritairement au niveau du jéjunum, à l'exception de la claudine 19 qui n'est exprimée qu'aux jours 1, 14 et 28 postnatal. Il se distingue deux catégories au sein de cette famille avec un groupe dont l'expression va augmenter (claudines 3, 4, 7, 12, 15) au cours du développement et d'autres, au contraire, montrant leur expression diminuer, comme les claudines 1, 2 et 8. Les fortes différences d'expression observées se situent entre le 14^{ième} et le 28^{ième} jour, période qui coïncide avec le sevrage.

Les observations microscopiques ont permis d'identifier une différence de localisation de certaines protéines au niveau de l'axe crypto-villositaire, notamment la claudine 15 qui progresse selon cet axe de la naissance au 28^{ième} jour de naissance, contrairement à la claudine 2 dont la localisation va évoluer de manière opposée.

L'étude de Patel *et al.* en 2012 a permis de décrire l'évolution de la perméabilité intestinale à la macromolécule de Dextran 4 KDa en période postnatale chez la souris (Patel *et al.*, 2012). Le niveau de perméabilité est stable durant les deux premières semaines de vie puis diminue brutalement au cours de la troisième semaine pour évoluer vers une diminution plus progressive à la 4^{ème} semaine et à l'âge adulte (*Figure 22*).

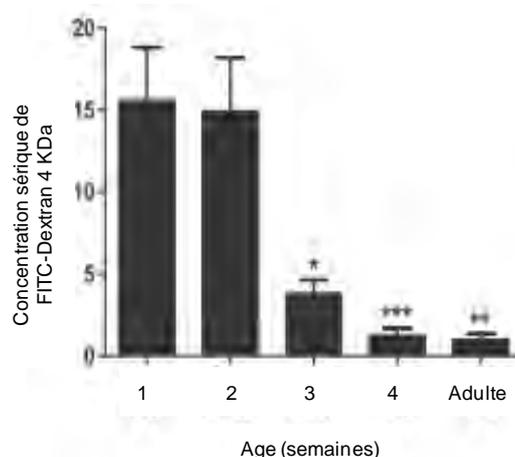


Figure 22 Perméabilité intestinale au Dextran 4 KDa durant les huit premières semaines de vie chez la souris.
(Adapté de Patel *et al.*, 2012)

De manière intéressante, l'auteur décrit un profil d'expression de la claudine 3 inversement proportionnelle à l'évolution de la perméabilité et que ce profil peut être accéléré par la colonisation d'une bactérie commensale, *Lactobacilles rhamnose GG*, favorisant la maturation de la barrière épithéliale. L'influence de la flore intestinale sur la maturation a déjà fait l'objet d'études et montre notamment son implication dans l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la production du mucus, dans l'absorption des nutriments et dans le renforcement de la barrière intestinale (Hooper *et al.*, 2001).

1.1.3 Colonisation bactérienne chez l'animal et implication dans le développement des fonctions immunitaires par rapport à l'homme

La composition bactérienne de la flore intestinale du rat a été caractérisée durant la période de lactation et montre une dominance des entérobactéries, des lactobacilles et des entérocoques (Yajima *et al.*, 2001). La microflore fécale retrouvée chez les rats de 10 jours a été comparée à celle retrouvée chez la mère et montre que le nombre de bactéries n'est pas significativement différent, mais que le ratio des souches bactériennes diffère grandement (Yajima *et al.*, 2001). En effet, à 10 jours le rat nouveau-né présente majoritairement des bactéries dites aérobies, telles que les entérobactéries, les entérocoques et les streptocoques, alors que les bactéries anaérobies ne sont pas détectables bien qu'elles soient majoritaires chez la mère. De même, le nombre de lactobacilles est plus faible chez le rat nouveau-né en comparaison de la mère (Yajima *et al.*, 2001).

Chez l'homme, bien qu'il soit communément admis que le nouveau-né est stérile jusqu'à la naissance et que la colonisation bactérienne commence à ce moment là, des études ont montré la présence de bactéries dans l'environnement intra-utérin (Jimenez *et al.*, 2008).

A la naissance, les premières bactéries retrouvées au niveau fécal sont dites aérobies-anaérobies facultatives (Fanaro *et al.*, 2003) et comprennent par exemple les Staphylocoques, les Streptocoques et les Entérobactérie, ces dernières étant majoritaires et vont générer un environnement pauvre en oxygène et laisser place aux bactéries anaérobies telles que les Bifidobactéries, les Bactéroidetes et les Clostridium (Palmer *et al.*, 2007).

Une forte influence de la mère et tout particulièrement du mode de délivrance (vaginale ou par césarienne) a été démontrée sur cette colonisation précoce et tout particulièrement sur le nombre de Bifidobactéries. D'autres facteurs tels que le mode d'alimentation, l'exposition aux facteurs environnementaux et le temps de gestation peuvent influencer la colonisation bactérienne durant la période postnatale (Matamorosb *et al.*, 2013).

Le microbiote intestinal participe activement au métabolisme, à la digestion des aliments qui ne peuvent être pris en charge par le nouveau-né et joue un rôle important dans la maturation de l'épithélium et du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (Hooper *et al.*, 2004). Pour exemple, il a été montré que les interactions bactériennes avec les cellules de Paneth pouvaient façonner l'expression d'angiogénine 4 considérée comme protéine à activité bactéricide durant la période de développement postnatale de l'intestin.

Chez le rat, la translocation bactérienne se produit naturellement au début de la période de lactation au niveau des nœuds mésentériques (MLN) (Steinwender *et al.*, 1996). Plus précisément, la présence de bactéries au niveau des MLN est observée dès le 4^{ème} jour de naissance, pour être maximale au 7^{ème} jour et diminuer progressivement pour ne plus être détectable à la 5^{ème} semaine (Figure 23). Les bactéries retrouvées majoritairement dans les MLN correspondent aux entérobactéries et aux lactobacilles, deux espèces dominantes, mais on y retrouve également des staphylocoques qui restent néanmoins minoritaires.

Age (jours)	n	MLN		Foie	Rate	Sang
		Incidence*	Log quality†	Incidence	Incidence	Incidence
4	5	3 (60)	1.2 ± 0.8	1 (20)	n.d. (0)	n.d. (0)
7	22	20 (91)	1.48 ± 0.57	n.d. (0)	n.d. (0)	n.d. (0)
10	21	15 (71)	1.04 ± 0.73	n.d. (0)	n.d. (0)	n.d. (0)
14	20	12 (60)	0.78 ± 0.63	n.d. (0)	n.d. (0)	n.d. (0)
21	5	4 (80)	0.57 ± 0.89	n.d. (0)	n.d. (0)	n.d. (0)
5	6	n.d. (0)	n.d.‡	n.d. (0)	n.d. (0)	n.d. (0)

Figure 23 Incidence de la translocation bactérienne chez le rat durant les 5 premières semaines de vie. (Adapté de Yajima *et al.*, 2001). n = nombre de rat testés ; Incidence* : nombre de rat positif pour la translocation bactérienne (% nombre de rat positif), log quality : log₁₀ UFC. Unités formant des colonies par rat ± écart type, n.d. : non détectable, < 2 UFC par rat.

La présence des staphylocoques montre que la translocation bactérienne est un phénomène qui ne dépend pas que de la concentration bactérienne retrouvée chez l'hôte, mais aussi de la nature de la bactérie et éventuellement de la facilité à « transloquer ». Par ailleurs, cette étude décrit que la translocation bactérienne ne concerne que les MLN et que l'on ne détecte pas de présence bactérienne systémique à partir du 7^{ème} jour de vie en conditions physiologiques. Cependant, dans la même année, Wenzl et al. ont décrit une translocation bactérienne vers le foie qui commence dès la naissance et augmente significativement durant la deuxième semaine, pour diminuer après le sevrage (Wenzl *et al.*, 2001). Or, l'étude réalisée par Yajima

et al. montre que le rat nouveau-né ayant reçu une canulation intra-gastrique présentent une translocation bactérienne vers le foie, alors cet organe est stérile chez les animaux n'ayant pas reçu cette canulation (Yajima *et al.*, 2001). La canulation est donc un facteur de stress qui va favoriser la translocation bactérienne systémique. Le stress de manipulation des animaux représente donc un biais méthodologique dans ce type de recherche chez le nouveau-né, qui probablement a pu avoir une influence sur les résultats obtenus dans l'étude de Wenzl et al. (Wenzl *et al.*, 2001).

La translocation bactérienne en conditions basales vers les MLN peut s'expliquer par l'immaturation de la barrière épithéliale et du système immunitaire associé à la muqueuse. Pour autant, ce passage bactérien est important dans le développement et l'activation du système immunitaire, où la perméabilité intestinale élevée apparaît « permissive » pour l'activation des fonctions immunitaires. Chez l'homme, certains composants de l'immunité tels que les plaques de Peyer et les lymphocytes intra-épithéliaux et de la *lamina propria* sont mis en place bien avant la naissance. La formation des villosités et la morphogénèse sont effectives au stade embryonnaire, événements qui se mettent en place plus tardivement chez le modèle murin, notamment en fin de gestation et durant la période de lactation (*Figure 24*). Chez l'homme et dans le modèle murin, la maturité des fonctions immunitaires n'est obtenue que lors de la colonisation bactérienne, comme le suggère des études réalisées chez la souris axénique (Germ Free). Chez ces animaux exempts de flore intestinale, il est décrit une altération de la morphologie de l'intestin et des fonctions immunitaires d'autant plus visibles au niveau du côlon où la charge bactérienne est la plus importante (Kamada *et al.*, 2013). Par ailleurs, la primo-colonisation bactérienne joue un rôle important dans la structuration de l'épithélium colique notamment dans les processus de prolifération précoce (Tomas *et al.*, 2013). La souris axénique présente également des altérations au niveau de l'intestin grêle. Il est rapporté que les lymphocytes de la lamina propria sont plus faibles en nombre et les structures telles que les plaques de peyer et les nœuds mésentériques sont de taille réduite, ce qui a pour conséquence un défaut de prolifération lymphocytaire se traduisant par une altération de la réponse immunitaire innée (McCracken et Lorenz, 2001). D'un point de vue fonctionnel, les cellules de Paneth présentent un retard d'expression du lysozyme et une augmentation de la rétention des granules sécrétés (Falk *et al.*, 1998).

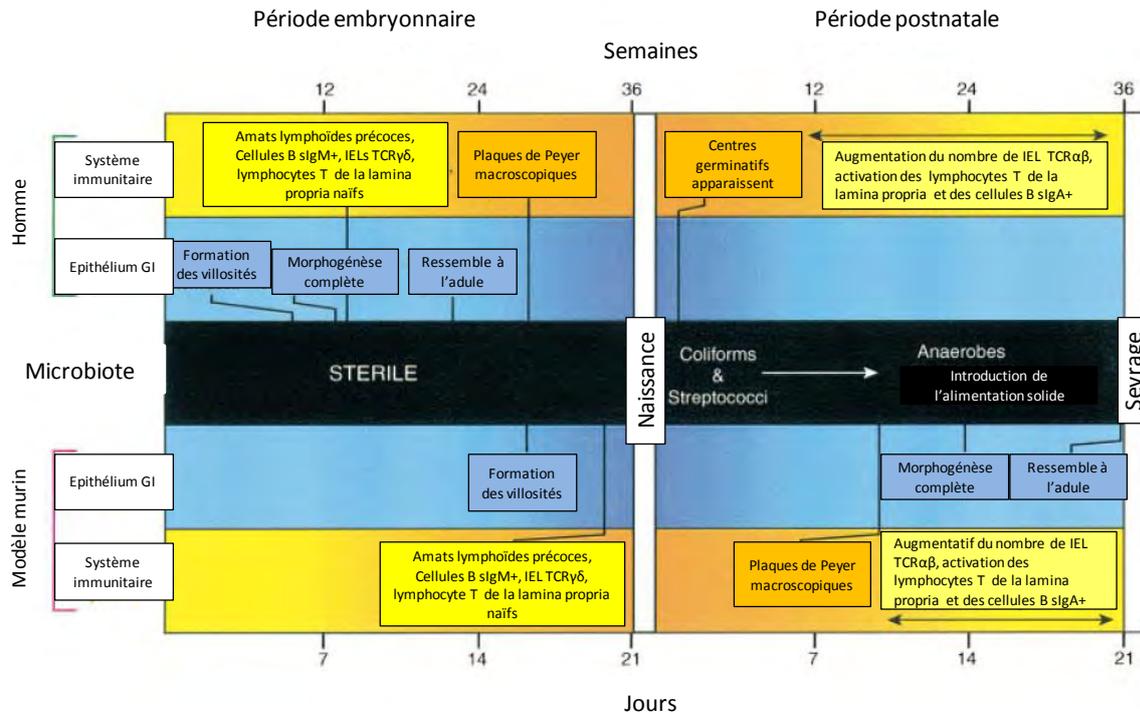


Figure 24 Développement du tractus gastro-intestinal et de son écosystème chez l'homme en comparaison de la souris. Epithélium GI : épithélium gastro-intestinal ; sIgM : immunoglobuline M de surface ; sIgA : immunoglobuline A de surface ; TCR : récepteur aux cellules T ; IEL : lymphocytes intra-épithéliaux (Adapté de McCracken et Lorenz, 2001).

La translocation bactérienne est donc un élément clé durant la période postnatale qui va participer à la mise en place de la tolérance immunitaire (Corthesy *et al.*, 2007). En effet le système immunitaire va développer ses capacités à distinguer les antigènes du soi, les antigènes alimentaires et les bactéries commensales des bactéries pathogènes. Chez l'homme, les bactéries présentes dans le lait maternel vont contribuer à façonner la réponse immunitaire du nouveau-né (Perez *et al.*, 2007). Le lait maternel va fournir une immunité dite « passive » au nourrisson en transmettant des immunoglobulines A sécrétoires qui représentent 90 % des immunoglobulines du lait (IgA, IgG, IgM) et qui sont nécessaires pour prévenir l'infection et l'invasion de pathogènes pouvant pénétrer le tractus intestinal. L'ensemble des composés du lait vont ainsi jouer un rôle de défense et d'immunomodulateur favorisant une réponse immunitaire optimale de la muqueuse intestinale (Tackoen *et al.*, 2012).

La colonisation bactérienne va également jouer un rôle important dans le développement de la réponse immunitaire chez le rat. En effet, il a été montré que les bifidobactéries pouvaient promouvoir la maturation des cellules dendritiques et l'expression de l'Il-12, influencer le développement des lymphocytes T en faveur d'une réponse de type Th1 en augmentant l'expression de l'interféron γ , tout en assurant une réponse de type Treg accompagnée de l'expression de l'Il-10 chez le rat (Dong *et al.*, 2010). D'autre part, il a été

décrit qu'un traitement antibiotique (Clamoxyl) altérait la colonisation bactérienne dès les premières semaines de vie chez le rat et interférait avec 10 à 30 % des gènes impliqués dans la maturation de la barrière intestinale. En effet, l'antibiothérapie s'accompagne d'une sous-expression de gènes liés à la réponse immunitaire innée et à la présentation d'antigènes, en plus d'une surexpression de gènes impliqués dans l'activité des mastocytes (Schumann *et al.*, 2005). Ces résultats montrent qu'une administration précoce d'antibiotiques dans les services de pédiatrie pourrait interférer avec de nombreux paramètres clés impliqués dans le développement de la barrière intestinale (Schumann *et al.*, 2005).

1.1.4 Evolution de la perméabilité intestinale chez l'enfant né à terme ou prématuré

Le lait maternel contribue à diminuer la perméabilité intestinale élevée à la naissance (Catassi *et al.*, 1995 ; Weaver *et al.*, 1987, Taylor *et al.*, 2009), favorisant ainsi la fonction de barrière de la muqueuse intestinale du nouveau-né. En effet, des études utilisant le test d'absorption des sucres au lactulose et mannitol ont décrit un niveau élevé de perméabilité intestinale chez l'enfant né à terme (Weaver *et al.*, 1984, Bezerra *et al.*, 1990) qui diminue progressivement au cours des premiers mois de vie, un processus similaire au «gut closure» observé chez d'autres mammifères (Urao *et al.*, 1997 ; Patel *et al.*, 2012). Comme vu précédemment, un haut niveau de perméabilité intestinale est bénéfique durant cette période, en favorisant l'absorption de grosses molécules impliquées dans la nutrition tout en contribuant au développement de la tolérance immunitaire. Mais une perméabilité trop élevée prédispose également à l'absorption d'agents potentiellement pathogènes, pouvant générer chez le nouveau-né une réponse inflammatoire exacerbée en raison des fonctions immunitaires encore immatures (Insoft *et al.*, 1996). Les facteurs tels que l'âge de l'enfant et le mode de nutrition influencent la maturation de l'épithélium intestinal et donc sa perméabilité aux agresseurs. L'étude de Van Elburg en 2003 montre que les enfants prématurés nés avant la 37^{ième} semaine de gestation présentent un niveau élevé de perméabilité quelques jours après la naissance en comparaison des enfants nés à terme, pour ensuite être rétablie dès le 4^{ième} jour témoignant d'une adaptation rapide (Van Elburg *et al.*, 2003). De plus, l'auteur met également en évidence qu'il n'y a pas d'influence de l'âge gestationnel sur le niveau de perméabilité intestinale, notamment entre la 26^{ième} et la 36^{ième} semaine, observation confirmée dans d'autres études (Shulman *et al.*, 1998 ; Rouwet *et al.*, 2002). Ces données suggèrent que le niveau de perméabilité est déjà acquis à la 26^{ième} semaine. Cependant, Beach et collaborateurs (Beach *et al.*, 1982) avaient décrit une différence

de profil d'absorption des sucres selon si l'enfant prématuré était né entre les semaines 26-29 et 31-36 de gestation, avec un profil témoignant d'une maturité plus avancée chez les enfants nés dans cette dernière période. Cependant, l'âge des enfants lors de la réalisation de la mesure était différent selon les études, pouvant expliquer les divergences entre auteurs.

La nutrition est un autre facteur important qui influence directement le niveau de perméabilité intestinale, comme en témoignent les données de Rowet et al. en 2002 montrant que le ratio Lactulose/Rhamnose diminue lors du changement du mode de nutrition. En effet, dans cette étude, les enfants prématurés ayant été nourris dès la première semaine suivant la naissance par voie parentérale présentaient une diminution de perméabilité intestinale dès le passage à la nutrition entérale. Cela suggère que la perméabilité intestinale élevée chez le nouveau-né durant la première semaine de vie peut être en partie liée à l'absence de nutriments dans la lumière intestinale (Rouwet *et al.*, 2002). Cette hyperperméabilité à la naissance est influencée par la nature du lait apporté, le lait maternel favorisant la diminution de perméabilité en comparaison du lait artificiel (Taylor *et al.*, 2009). Enfin, l'influence d'un traitement médical chez les sujets étudiés est un facteur rarement abordé dans de nombreuses études. De façon intéressante, il a été montré que les enfants prématurés ayant reçu un traitement anténatal aux GC présentaient un niveau de perméabilité intestinale diminué par rapport aux témoins (Shulman *et al.*, 1998).

1.1.5 Risques pathologiques chez le nouveau-né prématuré : NEC et infections systémiques

La colonisation bactérienne, l'allaitement artificiel, le traitement médical et le stress périnatal dont nous développerons les aspects plus tard, ont été identifiés comme facteurs de risque dans le développement de pathologies sévères telles que les entérocolites nécrosantes (NEC) touchant les enfants prématurés (Neu, 2007). Dans ces conditions, l'immaturation de la barrière épithéliale et celle du système immunitaire associé à la muqueuse (Maheshwari *et al.*, 2006) pourraient prédisposer l'enfant prématuré de faible poids de naissance à contracter une infection, puis une inflammation.

Le NEC est l'une des pathologies les plus graves rencontrée dans les services de néonatalogie et associée à une forte mortalité. L'étiologie n'a pas été complètement élucidée et sa prévention est en discussion (Lin *et al.*, 2013). Cette pathologie est caractérisée par une destruction massive de l'épithélium intestinal, témoignant d'une altération marquée de la fonction de barrière (Petrosyan *et al.*, 2009). En effet, l'enfant prématuré présente un ensemble de fonctions immatures comme par exemple un défaut d'acidité gastrique, de

péristaltisme et une couche de mucus qui ne permettent pas de prévenir l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales. De plus, la perméabilité intestinale élevée favorise le passage bactérien, allant stimuler le système immunitaire immature lequel répond par la sécrétion de cytokines proinflammatoires, de chimiokines, de prostanoïdes et de monoxyde d'azote augmentant de surcroît la translocation bactérienne (Petrosyan *et al.*, 2009). L'isolation de la même souche bactérienne dans le sang, le pharynx et le rectum des nouveau-nés atteints de septicémie ont permis de vérifier l'origine endogène des bactéries (Poilane *et al.*, 1993 ; Lambert *et al.*, 1992).

Des études cliniques ont également porté sur les effets de la thérapie anténatale aux GC chez les enfants prématurés souffrants du syndrome de détresse respiratoire. Ce traitement, d'abord utilisé pour favoriser la maturation pulmonaire, a été montré également protecteur au niveau de l'intestin en diminuant significativement l'incidence de NEC (Bauer *et al.*, 1984, Crowley *et al.*, 1990). L'exposition aux GC diminue l'incidence de NEC lorsqu'elle est réalisée en période prénatale ou postnatale, mais c'est durant la première période que le traitement s'est avéré le plus efficace (Halac *et al.*, 1990). Ces données confirment l'existence chez l'homme d'une période de sensibilité aux GC pendant la période de gestation. Ce traitement pourrait donc être bénéfique pour la maturation de la barrière intestinale du prématuré, mais le peu de données concernant les éventuels impacts sur le développement neuronal du nouveau-né ne permet pas d'envisager le traitement aux GC comme une alternative immédiate dans la prévention du NEC, mais reste une piste qui nécessite d'être étudiée et approfondie (Carlo *et al.*, 2011).

1.1.6 Espèces modèles pour l'étude de l'impact de facteurs exogènes sur le développement de la barrière épithéliale chez le nouveau-né et le risque de pathologies précoces

A l'heure actuelle, les données chez l'homme ne suffisent pas à comprendre les mécanismes impliqués dans les pathologies intestinales en période néonatale et les études sur animaux restent nécessaires. Les modèles utilisés incluent le lapin, le porc, et les rongeurs tels que la souris et le rat.

Le lapin à été utilisé comme modèle de sepsis en période néonatale, ayant permis de montrer que les infections néonatales étaient attribuées à l'immaturité de la barrière intestinale favorisant la translocation bactérienne (Go *et al.*, 1994, Urao *et al.*, 1995, Ford *et al.*, 1996). Le passage bactérien, initialement décrit comme spontané durant la première semaine de vie et décroissant progressivement dans le temps, a rapidement suggéré que des facteurs liés à

l'âge des animaux pouvaient être responsable de cette diminution (Van Camp *et al.*, 1995, Urao *et al.*, 1995).

Le modèle porc est un modèle d'intérêt à l'étude du développement néonatal de l'intestin par son analogie en termes de physiologie intestinale, de flore bactérienne et du système immunitaire associé à la muqueuse avec celui du nouveau-né humain (Puiman and Stoll, 2008). La morphogénèse et le développement du porcelet sont aussi décrits comme étant les plus proches de l'homme (Buddington et Sangild 2011, Buddington *et al.*, 2012). C'est un modèle qui a permis d'étudier l'impact de la nutrition sur le développement intestinal des enfants prématurés (Buddington *et al.*, 2012), notamment l'impact du mode de nutrition parentérale par rapport à la nutrition entérale en période néonatale, la première voie s'accompagnant d'une altération de la barrière intestinale avec notamment une augmentation de perméabilité épithéliale (Kansagra *et al.*, 2003). Le porc a également été utilisé dans un modèle d'oxygénation extracorporelle par oxygénateur à membrane utilisé en cas d'insuffisance respiratoire sévère chez le nouveau-né, ceci afin d'apprécier les causes de la perte d'intégrité de la barrière intestinale souvent occasionnée par cette intervention (Kurundkar *et al.*, 2010).

En comparaison de l'homme dont la maturation intestinale est lente et débute très tôt, le porc et également les rongeurs vont présenter une durée plus courte et retardée dans le temps, des différences beaucoup plus prononcées chez le rat (*Figure 25*). Compte tenu d'une courte période de gestation, il est décrit que les structures intestinales des rongeurs sont immatures à la naissance (Hirano *et al.*, 1986). La barrière intestinale chez le rat se développe progressivement après la naissance jusqu'au sevrage, soit au 21^{ème} jour de naissance. Une rapide maturation de l'épithélium intestinal et de ses fonctions immunitaires va s'effectuer durant la transition du lait maternel à l'apport d'aliments solides.

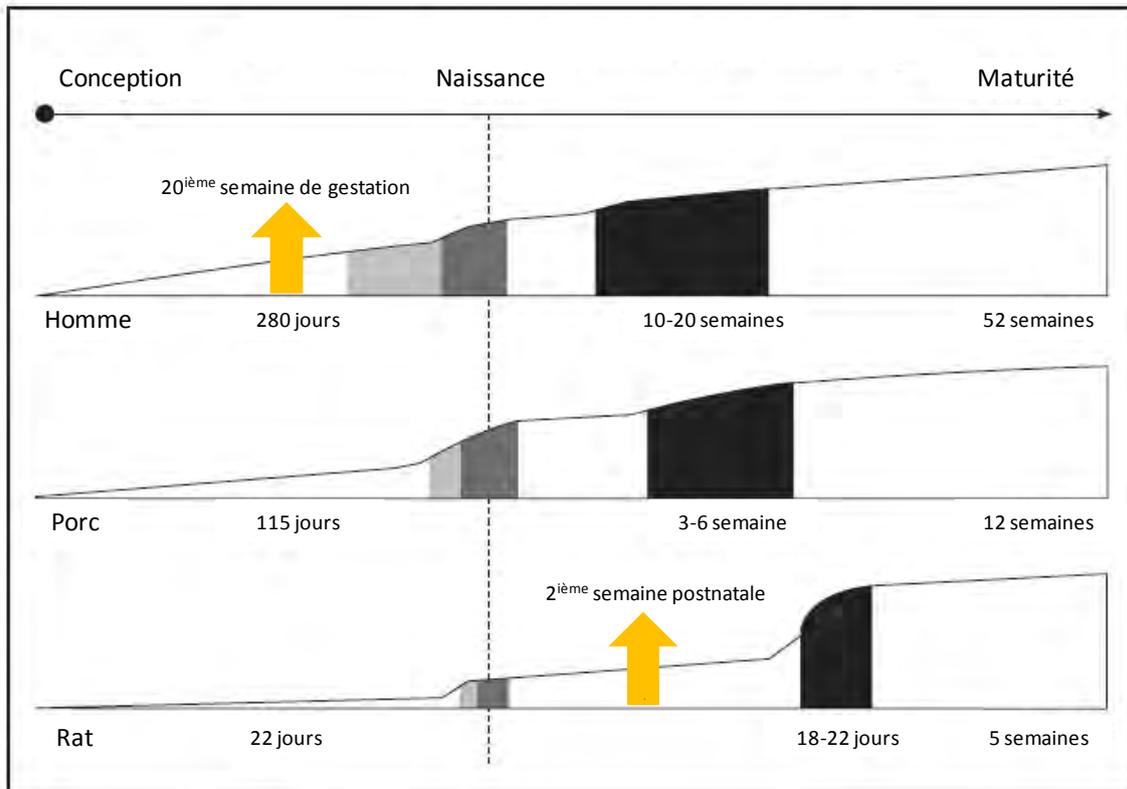


Figure 25 Représentation chronologique de la maturation de l'intestin chez l'homme et chez les modèles animaux du porc et du rat et périodes de sensibilité aux glucocorticoïdes.

La période en gris clair correspond à la naissance prématurée ; en gris foncé à la naissance et en noire à la période de sevrage (adapté de Puiman et Stoll, 2008). Les flèches oranges indiquent les périodes auxquelles l'intestin est décrit comme hautement sensible aux glucocorticoïdes. (Henning *et al.*, 1975 ; Nanthakumar *et al.*, 2005).

L'ontogénèse du système immunitaire du rat (Perez-Cano *et al.*, 2012) est comparable à celle observée chez la souris (Renz *et al.*, 2012) et présente un retard de développement par rapport à l'homme.

Comme constaté précédemment, la colonisation bactérienne du rat nouveau-né montre une proportion des phylas préservée entre le rat et l'homme (Birchenough *et al.*, 2013), même si des différences plus fines dans la taxonomie sont observées à cet âge (Tomas *et al.*, 2012). A la naissance, l'intestin du rat est morphologiquement immature et peut être comparé à celui observé chez un enfant prématuré et ce n'est qu'à la troisième semaine de vie que le rat va présenter une barrière intestinale fonctionnelle comme celle observée chez l'enfant né à terme (McCracken and Lorenz, 2001). C'est durant la période de lactation et particulièrement durant la 2^{ème} semaine de vie que l'intestin du rat va présenter une sensibilité accrue aux GC favorisant de profonds changements structuraux et fonctionnels, dont le développement des cryptes et des villosités (Pacha *et al.* 2003). Une semaine après, l'intestin du rat présente une morphologie comparable à celle d'un adulte. Les différentes lignées cellulaires de l'épithélium intestinal vont également apparaître tardivement chez le rat comme en témoigne

le nombre de cellules à mucus qui augmente dès le sevrage (Birchenough *et al.*, 2013). L'acquisition des activités enzymatiques de la bordure en brosse est également décalée dans le temps et sous l'influence des GC (Henning *et al.*, 1975). Le rat nouveau-né présente un intestin exprimant peu d'enzymes et ce jusqu'au sevrage, alors que chez l'homme l'activité de la sucrase isomaltase par exemple apparaît plus tôt dès le stade fœtal (Drozdowski *et al.*, 2010). De la même manière, l'activité de la lactase-phlorizine hydrolase, permettant la conversion du lactose en glucose et galactose ne se met en place qu'à la fin de la gestation chez le rat, alors que chez l'homme elle est détectable chez le fœtus à 9 semaines (Drozdowski *et al.*, 2010). Chez l'homme la période de sensibilité aux GC apparaît plus tôt que chez le rat, dès la période fœtale (Nanthakumar *et al.*, 2005).

D'autre part, le rat nouveau-né est un modèle apprécié dans l'étude de la translocation bactérienne en conditions basales et provoquées (Yajima *et al.*, 2001, Birchenough *et al.*, 2013), de par l'immaturation de la barrière intestinale proche d'un enfant prématuré et respectueuse des événements de développement observés chez l'homme (Drozdowski *et al.*, 2010). Par sa taille, le rat permet une manipulation facilitée en comparaison de la souris. Tous ces éléments font de ce modèle animal un outil permettant d'accéder à une période de développement de l'axe intestin-foie qui se déroulent durant la période gestationnelle chez l'homme, pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les pathologies associées à l'immaturation de l'intestin et le facteur de risque associé à la privation maternelle selon l'âge à la naissance.

2 Principales données sur les fonctions hépatiques du nouveau-né

Au cours de cette thèse, nous avons émis l'hypothèse que le développement du foie et de ses fonctions étaient étroitement corrélées à la maturation de la barrière épithéliale dans l'intestin et donc de la quantité et de la qualité des informations apportées par le sang porte au cours de la colonisation bactérienne. En effet, l'intestin est la source de nutriments métabolisés par le foie et d'antigènes permettant éventuellement d'initier une réponse inflammatoire hépatique. Le foie est quant à lui le principal organe de détoxification qui permet l'élimination des déchets et des xénobiotiques par ses fonctions de métabolisation. Il synthétise également la bile nécessaire à la digestion des graisses, à l'excrétion de déchets issus du métabolisme et à l'élimination du cholestérol. Bien que le dialogue entre ces deux tissus soit bien décrit dans la littérature, peu d'éléments sont disponibles sur la maturation post-natale des fonctions hépatiques.

2.1 Fonctions métaboliques

Les besoins énergétiques des tissus fœtaux notamment le glucose et les acides gras vont être couverts par la circulation ombilicale en provenance de la circulation maternelle. Le lactate va être fourni par le placenta. A la naissance, après la section du cordon ombilical, il se passe une période relativement courte allant de 1 à 6 heures où le nouveau-né est entièrement dépendant de la mobilisation de ses réserves énergétiques. Cette période représente un événement de stress pour le nouveau-né. En effet, le niveau de cortisol augmente à la naissance pour se rétablir dès 24 heures (Girard *et al.*, 1992). Egalement, les niveaux plasmatiques de glucagon vont augmenter et celui de l'insuline va diminuer via l'activation du système nerveux sympathique (Girard *et al.*, 1992). L'utilisation du modèle souris a permis d'étudier les effets de mutations de différents gènes sur le développement postnatal. Cela a permis de montrer l'implication de l'autophagie, qui est une voie majeure du catabolisme des lysosomes, dans l'apport d'énergie nécessaire à la survie du nouveau-né durant la période transitoire d'hypoglycémie qui se déroule juste après la naissance (Turgeon et Meloche 2009). En effet, l'étude des souris KO pour les gènes *Atg5* et *Atg7* qui sont impliqués dans la voie de l'autophagie vont présenter une mortalité néonatale (Turgeon et Meloche 2009).

Les ressources en glycogène hépatique vont être utilisées durant les premières heures qui suivent la naissance (Dawkins, 1963). Le nouveau-né va par la suite présenter une importante activité de néoglucogenèse réalisée à partir du pyruvate, de lactate et d'acides aminés qui constitue 30 % de ses apports en glucose (Kalhan *et al.*, 2001). Chez la souris, la voie de signalisation Wnt impliquée dans le développement embryonnaire, va participer à la régulation du métabolisme énergétique immédiatement après la naissance. Cette voie va activer un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme hépatique, notamment la voie de la néoglucogenèse permettant de maintenir les niveaux de glucose nécessaires à la survie du nouveau-né (Boj *et al.*, 2012). Ensuite la nutrition entérale du lait maternel, riche en lipides et relativement pauvre en glucides va être la source énergétique du nouveau-né (Girard *et al.*, 1992). Le foie du nouveau-né va présenter une augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) qui va permettre l'hydrolyse des triglycérides en acides gras (Herrera, 2000). Comme au cours d'un jeûne chez l'adulte, le foie va convertir des acides gras en corps cétoniques qui seront utilisés comme substrat énergétique par plusieurs tissus durant cette période (Kimura, 1983).

Chez la souris axénique à l'âge adulte, de nombreux travaux ont conclu au rôle important du microbiote intestinal dans la régulation du métabolisme des glucides et des lipides, même si la relation de cause à effet n'a pas encore été bien définie (Gérard, 2012). Très peu d'études se sont depuis penchées sur le rôle joué par le microbiote intestinal sur le métabolisme hépatique du nouveau-né. Une étude montre cependant que l'administration du probiotique *Lactobacillus* à des souris *Germ free* colonisées par une flore bactérienne de nouveau-né de 20 jours induit une modification de la flore intestinale, accompagnée d'une altération du métabolisme lipidique (Martin *et al.*, 2008). Ce dialogue dans l'axe intestin-foie se traduit par une diminution du niveau de lipoprotéines plasmatiques, accompagnée d'une augmentation de la glycolyse et de la protéolyse.

2.2 Fonction de détoxification

A la naissance les veines ductales et ombilicales vont disparaître et le débit sanguin de la veine porte va considérablement augmenter, ce qui pourrait affecter la métabolisation des médicaments par le foie (Gow *et al.*, 2001). La maturation du profil d'expression de la majeure partie des cytochromes P450 débute chez l'homme dans les jours suivant la naissance, pour atteindre, de façon globale, une activité d'environ 30% de l'activité adulte à l'âge d'un mois et de 50% à l'âge d'un an (Alcorn *et al.*, 2002 ; Hines *et al.*, 2002, Johnson, 2003). Un nombre important d'enzymes de phase II est exprimé de façon précoce dans le développement telle que la glutathion S-transférase A1/A2 et la N-acétyltransférases 1 (McCarver *et al.*, 2002). La prise en compte de ces modifications en clinique est importante pour éviter les risques d'un traitement inefficace ou au contraire toxique, et ce surtout lors de co-administration de plusieurs médicaments. Par ailleurs, le cas de l'apparition de l'ictère du nouveau-né témoigne de l'immaturation transitoire du système de détoxification du foie à la naissance. Son incidence est estimée en France à 60% chez les nouveau-nés à terme et 90% chez les prématurés (Labrune *et al.*, 2010 ; Bourillon *et al.*, 2003). L'ictère correspond à l'accumulation plasmatique d'un pigment, la bilirubine, issues du catabolisme de l'hème. Lorsque les fonctions hépatiques immatures ne permettent pas de métaboliser et d'éliminer efficacement la bilirubine via la bile, celle-ci s'accumule dans le sang, provoquant l'ictère. Cette hyperbilirubinémie est considérée comme physiologique et se rétablit généralement au cours des deux premières semaines de vie (Beath SV, 2003). Un traitement par photothérapie est parfois nécessaire. Il transforme la bilirubine en un isomère structural appelé lumirubine qui sera excrétée dans la bile et les urines. Par contre dans le cas des prématurés, l'ictère peut

évoluer vers une forme plus grave, l'ictère nucléaire induisant des lésions cérébrales irréversibles.

2.3 Fonction immunitaire

Peu de temps après la naissance, le foie du nouveau-né doit faire face à l'arrivée de microorganismes d'origine intestinale (Beath SV, 2003). Pour cela, le foie va devoir mettre en place comme première ligne de défense une réponse immunitaire innée se traduisant par la libération de médiateurs tels que des protéines de phases aiguë, des cytokines et des chimiokines (Kmieć *et al.*, 2001). Une étude chez le rat montre que cette défense se met en place progressivement après la naissance ; le rat de 1 jour présente un retard considérable dans la cinétique d'induction de ces molécules après exposition au motif LPS (lipopolysaccharide) en comparaison du rat de 21 jours. De plus l'expression de molécules du complément et la réponse via le TLR 4 est retardée chez le rat de 1 jour suggérant une possible protection de l'hôte vis-à-vis d'une inflammation mais également une susceptibilité plus importante à développer une infection hépatique et systémique à ce stade de développement (Le Rouzic. *et al.*, 2011). Durant la période postnatale, la colonisation bactérienne joue un rôle important dans la mise en place de la barrière intestinale (Hooper, 2004) et pourrait également affecter la fonction hépatique. En effet, une étude a montré qu'une altération de la colonisation bactérienne chez le rat de 14 jours par l'administration d'antibiotique ou d'E.coli à la mère favorise une inflammation hépatique (Fäk *et al.*, 2008). La modification du microbiote du nouveau-né résultait d'une concentration d'entérobactéries excessive qui induisait une augmentation de la sécrétion d'haptoglobine au niveau du foie. La masse du foie était elle aussi augmentée probablement due à une accumulation de lipides induite par l'abondance des entérobactéries. A l'âge adulte, une autre étude avait montré que l'administration de LPS chez le rat pouvait induire une accumulation excessive de lipide au niveau du foie (Dickerson *et al.*, 2002).

CHAPITRE 3 : STRESS, BARRIÈRE INTESTINALE ET FONCTIONS HEPATIQUES : DU NOUVEAU-NE A L'ADULTE

1 Organisation fonctionnelle de l'axe HPA et relation avec la sphère digestive

1.1 Les différents acteurs de l'axe HPA

L'axe HPA est constitué de l'hypothalamus, de l'hypophyse (ou glande pituitaire) et des glandes surrénales et joue un rôle essentiel dans l'adaptation aux changements environnementaux auxquels l'individu est exposé. Les neurones à CRH (*corticotropin releasing hormone*) localisés dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus stimulent la sécrétion d'ACTH (*adrenocorticotropin hormone*) par l'hypophyse, dont les effets peuvent être potentialisés par l'arginine vasopressine (AVP). L'ACTH libéré dans la circulation sanguine stimule à son tour la synthèse et la libération de GC par les glandes surrénales. Une élévation de corticostéroïdes plasmatiques induira un rétrocontrôle négatif sur leur propre synthèse en agissant à la fois sur l'hippocampe, l'hypothalamus et l'hypophyse (*Figure 26*). Les corticostéroïdes correspondent au cortisol chez l'homme et à la corticostérone chez les rongeurs. Les neurones à CRH sont régulés par les afférences sensorielles relayées par le système nerveux autonome (Herman *et al.*, 2003). A l'âge adulte, les taux circulants de GC vont varier au cours de la journée. Chez l'homme, le niveau de cortisol augmente le matin pour diminuer progressivement jusqu'à la fin de la journée. La même cinétique est constatée chez le rat, mais avec un décalage dû au fait que le rat est nocturne et l'homme diurne. Une telle variabilité de production circadienne souligne la nécessité de réaliser les dosages dans la même période de la journée afin d'éviter tout biais dans leur interprétation.

Chez le nouveau-né, la régulation de l'axe HPA apparaît différente de celle à l'âge adulte. En effet, une étude chez le rat montre que la sécrétion de CRH est plus faible en période postnatale que l'AVP durant cette période et suggère un rôle plus important joué par ce dernier dans la stimulation de l'axe HPA lors d'une hypoglycémie chez le nouveau-né (Muret *et al.*, 1992). Chez le rat déficient pour l'AVP, on constate une disparition de la production d'ACTH révélant l'importance de l'AVP dans le contrôle de la sécrétion plasmatique de l'ACTH (Zelena *et al.*, 2008). Cependant, ces mêmes auteurs rapportent aussi

que la corticostéronémie chez ces animaux est normale, suggérant d'autres mécanismes compensatoires.

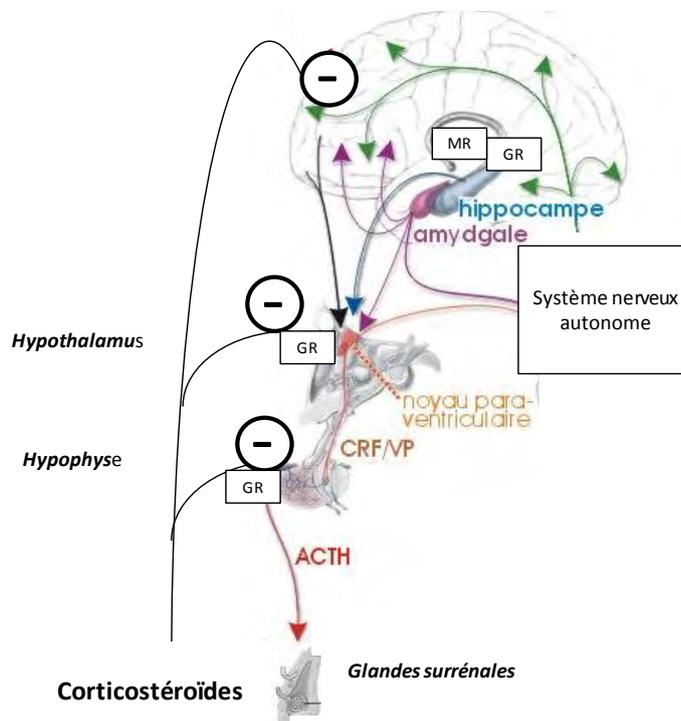


Figure 26 Représentation schématique de l'axe HPA.

CRH : corticotropin releasing hormone, VP : vasopressine, ACTH : adrenocorticotropin hormone, MR : Récepteur aux minéralocorticoïdes, GR : Récepteur aux glucocorticoïdes.

Quel que soit l'âge, les GC exercent leur influence sur de nombreux organes et fonctions associées (Sapolsky *et al.*, 2000). Au niveau hépatique, les GC vont favoriser la mobilisation d'énergie sous l'action combinée des catécholamines et du glucagon, en activant le catabolisme et plus particulièrement la glycolyse (Sapolsky *et al.*, 2000). Les GC potentialisent la lipolyse et la protéolyse. Ils peuvent également inhiber les réponses de l'immunité innée, inhiber la croissance osseuse et musculaire, influencer sur la sexualité et sur le comportement (Sapolsky *et al.*, 2000).

1.2 Développement de l'axe HPA et sécrétion du cortisol chez l'homme

Afin de mesurer l'activité de l'axe HPA du nouveau-né chez l'homme, les tests font appel à la mesure de cortisol salivaire. Cependant, le faible nombre d'études qui rapporte les

niveaux de cortisol chez le nouveau-né reflète les difficultés rencontrées dans l'obtention d'échantillons en nombre et en quantité suffisant pour réaliser ce dosage très tôt dans la vie. De plus, comme dit plus haut, le rythme circadien est un élément important à prendre en considération. Il est décrit que les fluctuations de sécrétion de cortisol liées au rythme circadien sont visibles dès les 6 premiers mois de vie (Tegethoff *et al.*, 2013). Chez l'homme, malgré un profond remodelage du cortex surrénalien qui se produit immédiatement après la naissance, l'axe HPA chez l'enfant né à terme présente déjà une réactivité face au stress (Ng, 2000). Les régions telles que l'hippocampe et l'amygdale sont identifiables dès la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine de gestation. La sécrétion de cortisol suite à une stimulation de l'axe HPA est effective durant les derniers stades de gestation et les GR sont identifiables au niveau de l'hippocampe dès la 24^{ème} semaine de gestation. Une étude a montré que le nouveau-né prématuré présentait un niveau de cortisol plus élevé par rapport à l'enfant né à terme (Wittekind *et al.*, 1993). De plus, il a été décrit que le niveau de cortisol était inversement corrélé avec l'âge de gestation, un enfant né entre les semaines 24-27 de gestation présentant un niveau de cortisol beaucoup plus élevé que celui né entre les semaines 32-36 de gestation (Scott *et al.*, 1993). D'après les auteurs, cette différence pourrait être liée à l'immaturité de l'axe HPA et notamment à un rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol éventuellement réduit. D'autres études ont mis en évidence chez les enfants de faibles poids de naissance, ou nés d'une courte période gestationnelle, une augmentation de l'activité de l'axe corticotrope durant la période postnatale précoce, l'enfance et à l'âge adulte (Phillips *et al.*, 2000, Reynolds *et al.*, 2001, Wust *et al.*, 2005, Osterholm *et al.*, 2012). Les études sur des modèles animaux et certaines observations cliniques suggèrent que l'administration anténatale de corticoïdes pourrait perturber l'équilibre de l'axe HPA chez le fœtus et le nouveau-né (Waffarn *et al.*, 2012).

1.3 Sécrétion de la corticostérone et réactivité de l'axe HPA chez le rat en cours de développement

Chez le rat, les travaux de Henning *et al.* (1978) ont mesuré les taux de corticostérone plasmatique en période postnatale. Il est extrêmement bas au jour 6 après la naissance, puis atteint un pic d'augmentation au jour 14 pour continuer à augmenter au jour 24 postnatal. Cette cinétique s'accorde bien avec celle décrite par Vasquez *et al.* en 1998, qui observent une diminution des taux plasmatique de corticostérone dans les trois jours qui suivent la naissance, avant une augmentation à partir du jour 14 (Vasquez *et al.*, 1998).

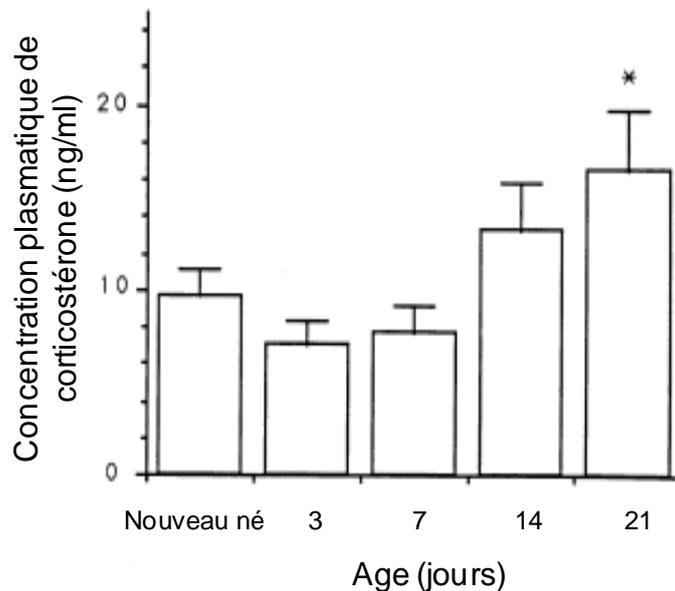


Figure 27 Concentration plasmatique de corticostérone chez le rat de la naissance au sevrage.
(Adapté de Vasquez *et al.*, 1998).

Des études réalisées chez le rat durant la période postnatale montrent une capacité limitée de l'axe HPA à augmenter les niveaux de GC circulants suite à une stimulation de stress (Vázquez *et al.*, 1998). Cette inactivité relative de l'axe corticotrope peut être considérée comme une adaptation permettant de limiter les processus cataboliques initiés par les GC tout en favorisant les événements anabolisants. Les deux premières semaines de vie correspondent à une période qualifiée de «*stress hyporesponsive period*» (SHRP) durant laquelle l'animal en développement est très peu réceptif au stress. Cette période d'hyposensibilité (Rosenfeld *et al.*, 1992) se situe entre le 4^{ème} et le 14^{ème} jour de naissance chez le rat et témoigne de l'importance du maintien constant de niveaux faibles de GC nécessaires à la croissance et au développement du système nerveux central. Durant cette période, le rat réagit très faiblement à de nombreux stimuli tels que l'exposition à l'éther ou encore à un acte chirurgical, même limité, contrairement au rat adulte qui présente une élévation considérable du niveau de GC dans ces mêmes conditions. En période postnatale, l'amplitude des réponses à l'ACTH et aux GC est limitée et spécifique de l'âge de l'animal et du type de stimuli. Cette période d'hyposensibilité peut être comparée à celle observée chez l'homme au cours de la première année de vie (Gunnar and Donzella 2002), quand le nouveau-né présente une réponse limitée face à un stress psychologique, l'axe HPA générant une quantité de cortisol modérée. Cependant, outre le rythme circadien, de nombreux facteurs peuvent directement influencer la mesure de cortisol chez l'homme, rendant difficile son interprétation. En effet, la mesure de la réactivité de l'axe HPA nécessite d'exposer le nouveau-né (ou plus tard l'enfant) à un stress

mais les études réalisées s'appuient sur des facteurs de stress de nature différente. De plus, la prise en compte de l'âge des enfants et les conditions sociales et environnementales dans lesquelles ils se développent sont des paramètres qui ne sont pas systématiquement pris en compte, malgré leur influence avérée (Gunnar *et al.*, 1996, 2009). De plus, ces études n'ont pu être réalisées que durant la période postnatale alors qu'il est reconnu que c'est durant le stade fœtal que s'opèrent d'importants changements liés à la maturation de l'axe HPA (Waffarn *et al.*, 2012). Toutes ces observations pointent du doigt les difficultés à évaluer le développement de la réactivité de l'axe HPA chez l'homme et la nécessité de poursuivre les études sur les modèles expérimentaux.

1.4 Distribution des récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'intestin et le foie

Les GC se lient aux récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) intracellulaires dans de nombreux tissus et agissent via des mécanismes génomiques en modifiant l'expression des gènes cibles. Les GR sont des récepteurs nucléaires, localisés en l'absence de GC au niveau du cytoplasme de la cellule. Lorsque le ligand se lie au récepteur, ce dernier est transporté au niveau du noyau pour permettre la régulation de la transcription de gènes cibles. D'autre part, il est émise l'hypothèse que les GC peuvent stimuler des voies de signalisation cellulaire, donc non génomiques et responsables d'effets rapides (Orchinik *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1999). De par leur similarité de structure, les GC présentent des activités croisées avec les minéralocorticoïdes. La fixation des GC à son récepteur est conditionnée par l'activité de la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase 2 (11 β -HSD2) responsable de la conversion des GC actifs (cortisol et corticostérone) en métabolites inactifs (cortisone et 11-déshydrocorticostérone respectivement), empêchant de fait la fixation des GC aux récepteurs aux minéralocorticoïdes. Dans le plasma, les GC circulent en majorité sous forme liée à deux protéines de transport, l'albumine et la corticostéroïde-binding globulin (CBP), modulant l'accès des hormones aux GR.

Chez le rat en période de lactation, les GR sont présents au niveau du foie et de l'intestin (Henning *et al.*, 1975). La concentration cytoplasmique des GR dans le foie est élevée dès la fin de la gestation et jusqu'au sevrage (Henning *et al.*, 1975). L'activité de ces récepteurs est décrite comme constante durant les deux premières semaines de vie. Au niveau intestinal, les GR sont situés au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse et sont actifs dès le stade

foetal. Leur activité va augmenter après la naissance, pour être maximale durant les deux premières semaines de vie (Henning *et al.*, 1975, *Figure 28*).

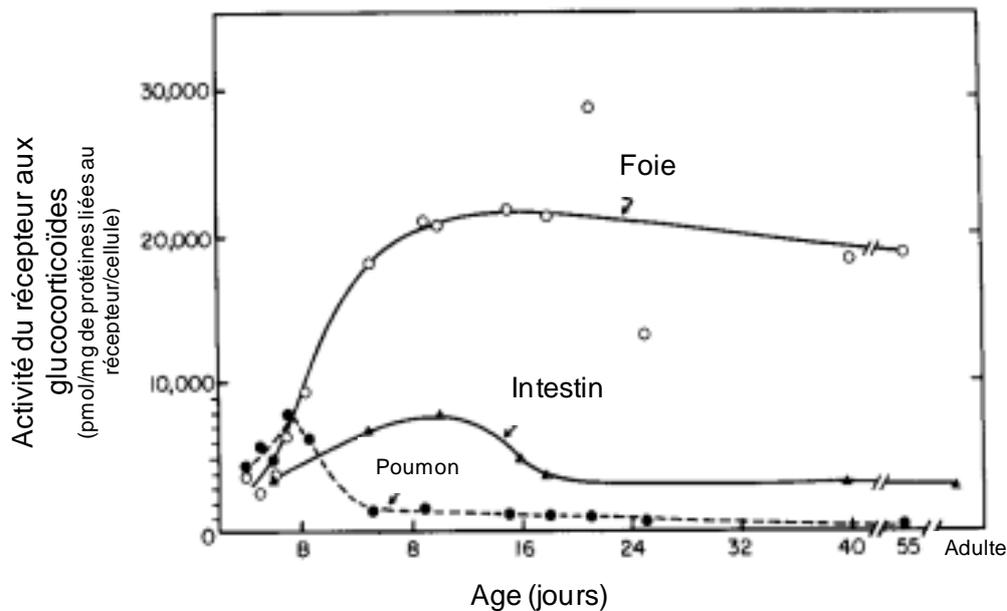


Figure 28 Activité du récepteur aux glucocorticoïdes au niveau du foie, de l'intestin et du poumon au cours du développement chez le rat. L'activité du récepteur a été déterminée par l'étude de liaison à la Dexaméthasone marquée au tritium (Henning *et al.*, 1975).

2 Physiopathologie du stress

2.1 Effets de la séparation maternelle sur l'axe HPA

Chez le rat, l'interaction maternelle influence grandement le développement et la fonction ultérieure de l'axe HPA (Levine *et al.*, 2001). Les signaux maternels tels que le léchage durant la toilette et l'apport du lait maternel participe au maintien de la période d'hyposensibilité. Une séparation maternelle (SM) prolongée est suffisante pour augmenter les niveaux d'ACTH et de corticostérone, tout particulièrement lorsque le rat étudié est âgé de 7 jours (Levine *et al.*, 1991 ; Suchecki *et al.*, 1993). L'activité de l'axe HPA est proportionnelle à la durée de SM et chaque composant de l'axe corticotrope répond à la SM. La principale activation de l'axe HPA a lieu entre 4 et 8h d'absence maternelle (*Figure 29*). En revanche, au delà de 12h de séparation, le rétrocontrôle négatif limite l'augmentation de production d'ACTH et de GC (Schmidt *et al.*, 2004).

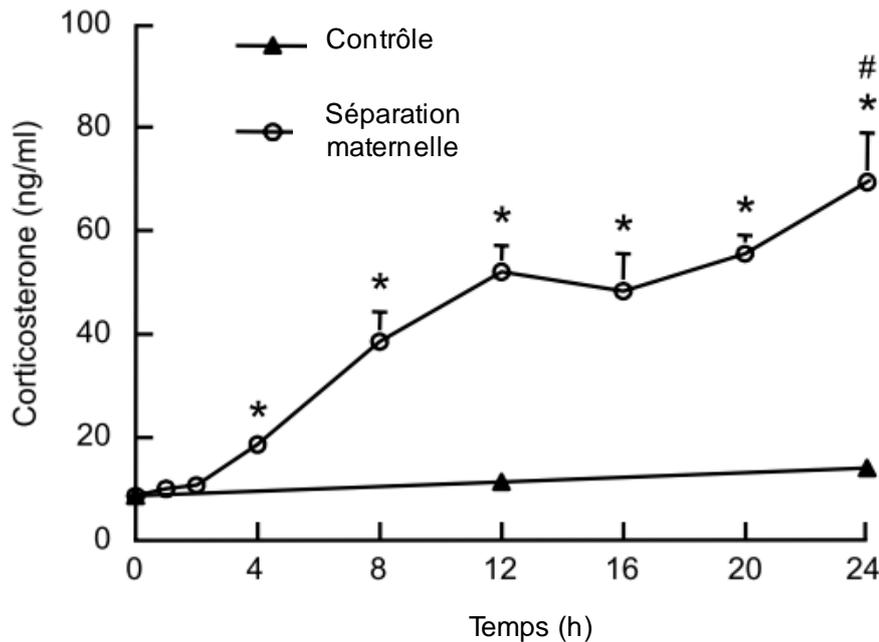


Figure 29 Sécrétion de corticostérone au cours de la séparation maternelle chez la souris de 9 jours.

Les données représentent la moyenne \pm écart type. * significatif en comparaison du contrôle, # significatif en comparaison de $t=12$ heures (Schmidt. *et al.*, 2004).

Cependant, lorsque la SM est réalisée de manière répétée, elle peut réduire le rétrocontrôle exercé par les GC (Sapolsky *et al.*, 1990 ; Biagini *et al.*, 1998). La SM chronique favorise l'augmentation du niveau d'ACTH en réponse à un stress (Daniels *et al.*, 2004), peut modifier la liaison du CRF au niveau cérébral (Vazquez *et al.*, 2006) et peut affecter l'expression centrale des GR et des récepteurs aux minéralocorticoïdes (Ladd *et al.*, 2004 ; Rivarola and Suarez, 2009 ; Wilber *et al.*, 2009). La SM est décrite comme ayant des effets différés sur l'axe HPA capables de modifier la réponse au stress à l'âge adulte. Ainsi, les effets de la SM répétée se traduisent à l'âge adulte par une exacerbation de la réponse au stress, pouvant altérer au niveau périphérique les fonctions intestinales dont nous développerons les aspects par la suite.

2 2 L'axe intestin-cerveau

Les troubles fonctionnels digestifs, dont le syndrome de l'intestin irritable (SII), sont définis comme un ensemble de manifestations cliniques liées à des troubles digestifs en l'absence de pathologie organique (Mertz, 2003). Le SII est caractérisé par une alternance de diarrhées et de constipation, de ballonnements et de douleurs abdominales. Par ailleurs, il est décrit que les personnes atteintes de ce syndrome présentent une augmentation de la perméabilité intestinale (Spiller *et al.*, 2000 ; Marshall *et al.*, 2004), quelque soit le sous-type de SII (Piche *et al.*, 2009). Chez les patients atteints de SII, la relation entre l'état de stress et

la sévérité des symptômes a été établie, mettant en évidence une réponse anormale au stress du système nerveux autonome, de l'axe HPA et une exacerbation de la perception de la douleur viscérale (Mayer *et al.*, 2000).

2.1.1 Effet du stress sur la douleur viscérale

Les principaux neuromédiateurs du stress sont localisés au niveau du système nerveux central mais également au niveau de l'intestin (Taché et Bonaz, 2007). Chez l'animal, il a été montré qu'un stress de contrainte mimant une situation de stress aigu induisait une hypersensibilité viscérale (Gue *et al.*, 1997). Les mécanismes impliqués dans ces altérations sont à la fois périphériques (Larauche *et al.*, 2009) et centraux. Ils font intervenir le CRF au niveau central responsable des troubles moteurs (Taché et Perdue 2004) et de la sensibilité viscérale, puisque la sensibilité colique est atténuée après l'administration d'un antagoniste des récepteurs au CRF. L'augmentation de la sensibilité viscérale fait également intervenir les mastocytes au niveau colique où leur nombre ou encore le degré de granulation est corrélé avec l'intensité des symptômes. Les mastocytes se localisent à proximité des fibres nerveuses et il a été montré que la substance P, via l'activation des récepteurs NK1, induisait la dégranulation mastocytaire et la libération d'histamine, de cytokines ou de NGF pouvant agir sur les terminaisons des neurones afférents (Bradesi *et al.*, 2002). L'administration de doxantrazole, un stabilisateur des mastocytes, bloque l'effet délétère du CRF sur la sensibilité viscérale (Barreau *et al.*, 2007a).

2.1.2 Effets du stress sur la perméabilité intestinale

Chez l'animal, de nombreuses études ont établi une relation causale entre l'exposition au stress et l'augmentation de la perméabilité intestinale. Les modèles d'études s'appuient essentiellement sur le rongeur et le stress étudié peut être de nature ou de durée différente, gardant en commun de mimer un événement de vie stressant, tel qu'il pourrait se produire chez l'homme.

Le stress aigu, dit de contrainte, appliqué chez le rat s'accompagne d'une augmentation du passage au travers de l'épithélium intestinal de mannitol et de Chrome-EDTA (Saunders *et al.*, 1994), un passage pouvant s'étendre à des macromolécules de plus haut poids moléculaire telles que la HRP (44 KDa) (Kiliaan *et al.*, 1994) et entraînant une altération des échanges ioniques entérocytaires associés à la translocation bactérienne (Santos *et al.*, 1999).

Le stress chronique d'évitement de l'eau ou WAS (*water avoidance stress*), s'accompagnant d'un état d'anxiété prolongé chez l'animal, est un modèle de stress psychologique chronique ayant permis d'affirmer les effets délétères sur la perméabilité intestinale (Santos *et al.*, 1999). Le passage exacerbé de HRP a suggéré que le stress chronique pouvait faciliter le passage de bactéries, confirmé par Velin *et al.* en 2004 montrant une translocation bactérienne au niveau des plaques de Peyer (Velin *et al.*, 2004). L'exposition à une session de stress acoustique et de contrainte de façon répétée a montré chez la souris, une augmentation de la perméabilité intestinale et une translocation bactérienne systémique qui s'étendait jusqu'au foie (Ferrier *et al.*, 2003). De façon intéressante, il a été décrit que le stress chronique pouvait stimuler l'adhésion des bactéries au niveau des cellules épithéliales par un mécanisme dépendant des mastocytes (Soderholm *et al.*, 2002a).

Ces modèles de stress aigu ou chronique ont tous contribué à l'identification des médiateurs impliqués dans les effets du stress sur la perméabilité intestinale, impliquant le CRF (Taché *et al.*, 2009), les GC et les médiateurs des mastocytes. Le CRF et les GC sont impliqués dans le développement des altérations digestives (Santos *et al.*, 1999 ; Saunders *et al.*, 2002). En effet, l'administration de CRF mime l'augmentation de perméabilité intestinale liée au stress en activant les mastocytes (Santos *et al.*, 1999, Wallon et Soderholm, 2009). D'autre part, Meddings *et al.* ont montré qu'une adrénalectomie ou un blocage pharmacologique des GR par le Ru486 bloquait les altérations de perméabilité dues au stress (Meddings et Swain, 2000). Très récemment, Zheng *et al.* ont montré que l'administration de corticostérone mimait l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par un stress chronique et que ces effets étaient essentiellement médiés par les GR exprimés dans l'épithélium du côlon (Zheng *et al.*, 2013). Ces observations sont à relier aux travaux d'Ait-Belgnaoui *et al.* en 2005 rapportant que l'augmentation de perméabilité paracellulaire colique induite par un stress aigu était responsable d'une hypersensibilité viscérale (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005). Au niveau cellulaire, l'utilisation du ML7, un inhibiteur spécifique de la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) a permis de mettre en évidence le rôle joué par cette enzyme dans l'augmentation de la perméabilité intestinale. L'augmentation du passage paracellulaire résulte donc de la contraction du cytosquelette des cellules, via l'activation de la MLCK, provoquant l'ouverture de jonctions serrées. Cet effet en cascade favoriserait le passage d'agents luminaux au travers de la barrière épithéliale, susceptibles d'activer le système immunitaire de la muqueuse jusqu'à sensibiliser les terminaisons nerveuses sensibles (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005) (*Figure 30*).

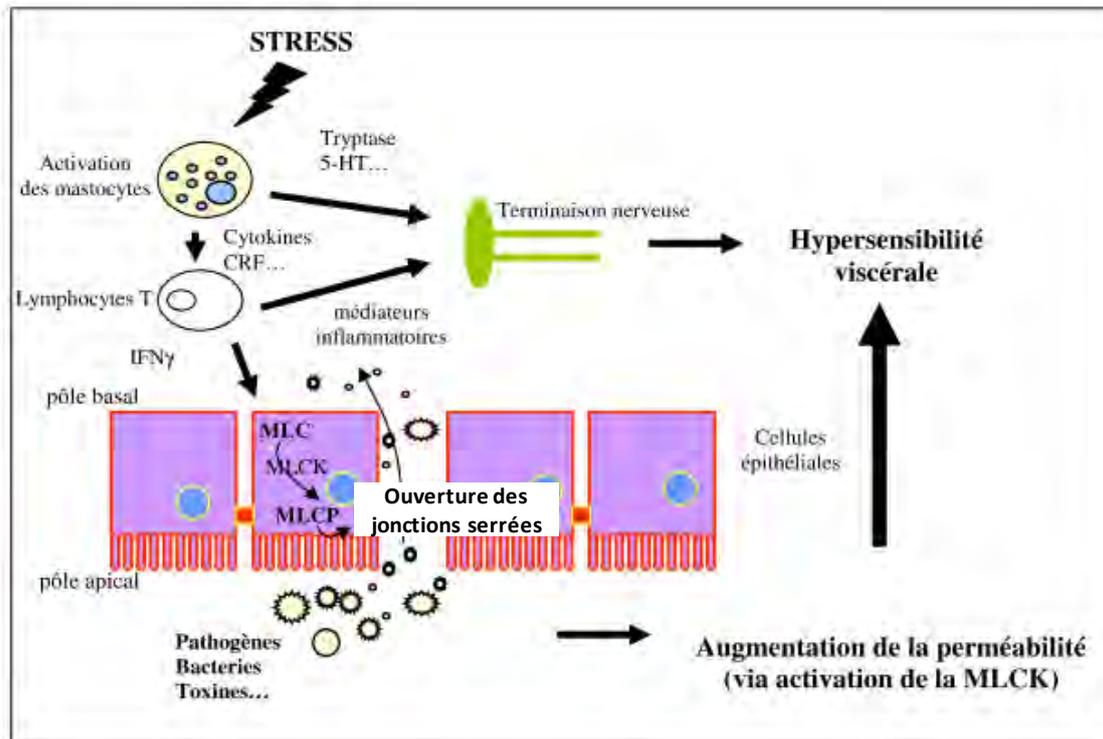


Figure 30 Mécanismes impliqués dans l'hyperalgésie viscérale induite par un stress de contrainte.
(D'après Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005).

3 Séparation maternelle et conséquences sur la santé de l'adulte

3.1 Le modèle de séparation maternelle

Le modèle de SM chronique chez l'animal est basé sur l'hypothèse que des événements indésirables apparaissant en début de vie pouvaient contribuer au développement de pathologies à l'âge adulte. Il a été montré chez le rat qu'une SM chronique en période néonatale s'accompagnait chez l'adulte d'une hypersensibilité viscérale en réponse à une distension colrectale, utilisé comme stimulus périphérique douloureux (Barreau *et al.*, 2004a ; Coutinho *et al.*, 2000 ; Rosztoczy *et al.*, 2003), soit des symptômes similaires à ceux décrits chez le patient SII. Différents protocoles de SM ont été utilisés pour tenter de comprendre les mécanismes précoces d'altération de la barrière intestinale et leurs empreintes susceptibles de prédisposer au SII : ces différences vont de la durée de séparation mère-enfant, allant de 15 minutes à 24h (le plus souvent 3h), et/ou une différence dans la période d'exposition allant du 2^{ème} au 14^{ème} jour ou du 4^{ème} au 21^{ème} jour après la naissance. De plus, selon les protocoles, l'animal était séparé individuellement ou restait groupé avec les autres rats de la portée.

3.2 Conséquences de la séparation maternelle sur la fonction de barrière intestinale chez l'adulte

Le stress de SM induit à l'âge adulte des dysfonctionnements de la barrière intestinale colique se traduisant par des dommages macroscopiques, une infiltration de neutrophiles, une augmentation de la densité des mastocytes et une augmentation de l'expression de cytokines (Barreau *et al.*, 2004b). Cela résultait d'une augmentation de la perméabilité intestinale colique associée à une translocation bactérienne vers les nœuds mésentériques, le foie et la rate (Barreau *et al.*, 2004b). L'augmentation de perméabilité induite par le stress (Oines *et al.*, 2011) peut favoriser l'internalisation de bactéries au travers de l'épithélium et provoquer une infiltration des cellules immunitaires au niveau de la *lamina propria* (Yang *et al.*, 2006). Chez le rat néostressé, l'exposition à la SM chronique se traduit à l'âge adulte par une exacerbation de la réponse inflammatoire suite à une colite expérimentale induite par l'administration de TNBS (2, 4,6-TriNitroBenzene Sulfonic acid) (Barreau *et al.*, 2004b). D'un point de vue mécanistique, l'utilisation d'un antagoniste du CRF a confirmé l'implication de ce facteur dans les conséquences à long-terme de la SM sur la muqueuse intestinale de l'adulte (Barreau *et al.*, 2007a, Gareau *et al.*, 2007b, Soderholm *al.*, 2002b, Chaloner *et al.*, 2007), résultat d'une libération de CRF au niveau périphérique et /ou médiée par le récepteur au CRF de type 1 localisé au niveau colique. L'augmentation de perméabilité résultante impliquerait la libération de NGF par les mastocytes coliques (Barreau *et al.*, 2004a).

4 Séparation maternelle et nouveau-né chez l'homme

4.1 La séparation maternelle post-partum

Si l'ensemble des données précédentes a permis d'explorer, expérimentalement chez l'animal, les conséquences possibles à long terme de la SM chronique pour l'adulte, très peu d'études se sont par contre focalisées sur l'effet immédiat d'une SM de courte durée sur la barrière intestinale du nouveau-né. Dans les pays occidentaux, la SM à la naissance est une pratique réalisée très fréquemment. Elle peut être ponctuelle chez l'enfant né à terme lorsqu'il s'agit d'une surveillance médicale après un accouchement difficile (e.g. antibiothérapie du nouveau-né) ou après une césarienne. Dans ce cas, le contact « peau-à-peau » (SSC ou *Skin-to-Skin Contact*) dès la naissance est rompu et le nouveau-né ne retrouve sa mère que quelques heures plus tard. Cette séparation peut être fortement prolongée lorsque l'enfant a besoin d'être pris en charge par le service de néonatalogie, quasi systématique lorsqu'il s'agit

d'un prématuré, et d'autant plus si ce dernier est un grand prématuré à faible poids de naissance. L'incidence des séparations maternelles en France n'est décrite qu'indirectement par le taux de césariennes réalisées et estimé en 2003 à 20% (Blondel *et al.*, 2005). Concernant le transfert de l'enfant dans l'unité de néonatalogie, il a été estimé à un peu plus de 10% (Blondel *et al.*, 2005). Cependant la SM n'est pas systématique et elle relève de l'organisation locale des soins périnataux (Sizun *et al.*, 2010). En effet, certaines maternités en France ont mis en place pour les prématurés les programmes nord-américains de « soins de développement » et le concept de NIDCAP (*neonatal individualized developmental care and assessment program*). Les « soins de développement » visent à favoriser le développement harmonieux de l'enfant, à l'aide de pratiques telles que la mise au sein précoce, le contact peau à peau et l'intégration des parents dans les services de néonatalogie. Le NIDCAP est une technique de prise en charge destinée à centrer les soins sur un enfant accompagné par sa famille et d'évaluer le comportement de l'enfant avant et après les soins dans le but de préserver le développement neurologique du nouveau-né prématuré (Haumont *et al.*, 2013).

4.2 La notion du contact « peau-à-peau » à la naissance

La naissance représente une période sensible où se noue un lien particulier entre la mère et le nouveau-né qui est l'attachement et se construit par les premiers contacts de peau-à-peau (Dageville *et al.* 2011). A la naissance, la sensorialité mais également la programmation comportementale et l'implication de substances neuroendocriniennes vont représenter des éléments importants dans le fondement du lien unissant la mère à son enfant. Le contact peau-à-peau va permettre d'atténuer la brutalité que peut représenter le passage du milieu intra- au milieu extra-utérin. Le contact direct avec la mère réalisé au cours des premières heures après la naissance va favoriser la sensibilité de la mère mais également l'autorégulation de l'enfant. La relation mère-enfant est décrite comme plus sereine et épanouie durant la première année de vie lorsque l'enfant est resté au contact de la mère à la naissance (Bystrova *et al.* 2009). Cette amélioration apportée par le contact peu-à-peau immédiatement après la naissance a aussi été constatée dès le 4^{ième} jour de naissance du nouveau-né (Widstrom *et al.* 2011), se traduisant durant les trois premiers mois par une affection de la mère à son enfant plus développée et par une diminution des pleurs du nouveau-né qui témoignait d'un comportement plus serein (De Chateau *et al.* 1977 ; Hales *et al.* 1977 ; Lozoff *et al.* 1977). A un an, l'enfant présentait un comportement moins anxieux et plus sociable en comparaison à celui qui avait été séparé de la mère (Bystrova *et al.* 2009). Les effets négatifs d'une SM qui

suit la naissance n'étaient par contre pas compensés par la pratique de la cohabitation de l'enfant avec sa mère. Ce constat a suggéré que la naissance était une période critique de sensibilité où la pratique du contact peau-à-peau apparaissait essentielle (Bystrova *et al.* 2009).

4.3 La séparation maternelle : un facteur de stress pour le nouveau-né

Des études ont montré que la SM post partum était un élément stressant pour l'enfant, notamment par la mesure des niveaux de cortisol chez le nouveau-né et ce jusqu'à l'enfance. Comme le souligne la revue de Gunnar en 2009, l'évaluation de l'impact de la SM chez l'homme est cependant rendue difficile par les conditions de mesure qui ne permettent pas en pratique d'estimer le temps de séparation (Gunnar *et al.*, 2009). Malgré cela, il est décrit que la SM est de manière générale un événement de durée relativement courte, induisant une augmentation significative du niveau de cortisol au cours de la première année de vie.

Chez les enfants nés à terme et séparés de leur mère, une étude a constaté qu'ils présentaient des perturbations du sommeil en comparaison de ceux restés au contact peau-à-peau avec leur mère (Morgan *et al.*, 2011). En plus de ce constat, le SSC apparaissait comme une intervention bénéfique pour l'enfant né à terme et que cette intervention réalisée précocement permettait d'augmenter la stabilité cardiovasculaire, thermique et glycémique chez les enfants prématurés (Moore *et al.* 2012). Une revue prenant en compte 16 essais cliniques chez des enfants de faible poids de naissance montre que lorsque les SSC sont poursuivis selon la méthode « *kangaroo mother care* » (KMC) par les parents, le risque de développer chez l'enfant des infections nosocomiales ou des sepsis était réduit (Conde-Agudelo *et al.* 2011).

Dans les services de néonatalogie, la proximité physique des parents à l'enfant est un élément important pour le nouveau-né (Flacking *et al.* 2012) et la SM est associée à des effets délétères sur sa santé. En effet, la proximité physique et émotionnelle des parents peut permettre l'amélioration du sommeil des enfants notamment par le biais du SSC. Il peut favoriser l'atténuation de la douleur chez l'enfant prématuré permettant de modérer l'utilisation de médicaments contre la douleur (Pillai *et al.* 2011). Egalement, le massage de l'enfant peut permettre d'augmenter les concentrations hormonales impliquées dans la croissance cérébrale, d'IGF-1 (Field *et al.* 2010) et d'ocytocine pouvant avoir des effets bénéfiques sur le développement et le fonctionnement cérébral. Le contact physique est associé à l'amélioration de l'organisation neurologique et psychomotrice du prématuré.

Il existe à l'heure actuelle de plus en plus de preuves sur les apports bénéfiques du contact maternel juste après la naissance sur la santé du nouveau-né (Moore *et al.* 2012), soulignant et la nécessité de poursuivre ce type d'explorations. Toutefois, ce constat reste discuté comme en témoigne la méta analyse d'Ohlsson en 2013 qui ne permet pas de faire le lien entre la pratique du NIDCAP et l'amélioration du développement neurologique à long terme (Ohlsson *et al.*, 2009). L'application de ce concept permettant notamment de favoriser les échanges de la mère à son enfant nécessite plus de preuves et fait donc actuellement débat. Certains pays scandinaves ont déjà adopté ces techniques, mais en France et dans d'autre pays cette pratique n'est pas générale et dépend des organisations locales des maternités.

OBJECTIFS DE LA THESE

En période postnatale précoce, la barrière intestinale et le foie sont en pleine maturation chez les rongeurs. Dans notre modèle animal, le rat naît avec un retard de maturité par rapport à l'homme et peut donc être considéré, dans une certaine mesure, comme un modèle de prématuré. En effet, la période postnatale chez le rat offre l'opportunité d'accéder à une période très précoce du développement de l'intestin prenant place *in utero* chez l'homme, donc très proches des caractéristiques de développement du tube digestif telles qu'elles se présenteraient chez le nouveau-né prématuré. L'intérêt de travailler sur l'intestin du rat nouveau-né est ainsi d'avoir accès à une fenêtre critique du développement des fonctions de « barrière intestinale » et hépatiques, permettant non seulement de mieux caractériser les événements de maturation de l'axe intestin-foie, mais aussi d'apprécier l'influence de divers stimuli, incluant des facteurs environnementaux comme les conséquences d'un stress de séparation mère-enfant à la naissance.

La SM à la naissance est une pratique utilisée en routine chez l'homme, alors même que la littérature la décrit comme étant un événement stressant pour le nouveau-né. Si le contact avec la mère contribue au maintien de la stabilité de plusieurs paramètres physiologiques chez le nouveau-né, le choix de séparer la mère de son enfant est guidé par la prise en charge des soins et aboutit à une séparation plus ou moins longue, susceptible de s'accompagner d'une réponse inadaptée de l'axe HPA, notamment la surproduction de glucocorticoïdes plasmatiques. Les études chez l'animal témoignent en effet d'une libération importante de GC en réponse à la SM, malgré un axe corticotrope relativement quiescent en cette période de vie, alors qu'en conditions basales ces mêmes hormones participent à la maturation morphologique et fonctionnelle de l'intestin, et probablement aussi du foie où les GR sont également exprimés. Or les conséquences immédiates d'une SM unique de quelques heures, en particulier sur l'intégrité de la barrière épithéliale très perméable, n'ont jamais été étudiées. Pour l'homme dans les services de néonatalogie, même si certaines structures sont optimisées et prennent en compte la présence maternelle auprès de l'enfant, cette condition n'est pas un constat général. En mimant la situation de SM de routine en postpartum, le rat nouveau-né apparaît donc un excellent modèle à la description et à la compréhension des effets physiologiques d'une séparation de durée limitée sur les fonctions intestinales et hépatiques en développement.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons fait le choix d'exposer des rats au 10^{ième} et au 20^{ième} jour de naissance à un seul épisode de SM et d'une durée de 4 heures. Ce choix a été motivé d'une part par les données de la littérature qui rapportent une séquence

temporelle de sensibilité aux GC endogènes de la naissance au 20^{ième} jour postnatal, propre à mimer le différentiel de réponse aux corticoïdes entre l'enfant prématuré et celui né à terme de grossesse. Enfin le rat à 10 jours post-partum présente une immaturité de l'épithélium intestinal et du système immunitaire comparable à celle d'un enfant prématuré, alors que celui âgé de 20 jours est à un stade de développement de la barrière intestinale très proche de celui d'un enfant né à terme.

L'objectif de ce travail a ainsi été d'évaluer chez le rat nouveau-né à différents âges les conséquences immédiates d'un épisode de SM de courte durée sur l'intégrité de la barrière épithéliale et d'apprécier les risques associés en relation avec la sensibilité variable de l'intestin aux GC endogènes. Dans une seconde partie, nous avons évalué les impacts de la SM dans le foie en utilisant une approche globale basée sur l'analyse du transcriptome hépatique par microarray.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Changes in intestinal glucocorticoid sensitivity in early life shape the risk of epithelial barrier defect in maternal-deprived rats

Introduction et buts de l'étude : chez l'homme, les glucocorticoïdes contribuent à l'ontogénèse de l'intestin fœtal et accélère le développement de la barrière intestinale en préparation à la naissance. En comparaison, l'intestin du rat nouveau-né est très immature et présente une hypersensibilité aux glucocorticoïdes au cours des deux premières semaines de vie, comparable à celle décrite chez l'enfant prématuré. Ces caractéristiques font du rat nouveau-né en période de lactation un modèle adapté à l'étude des effets de la séparation maternelle (SM) et de la libération associée de glucocorticoïdes sur l'intestin immature de l'enfant né avant terme. Notre objectif a été de déterminer les effets immédiats d'un épisode unique de SM sur l'intégrité de la barrière épithéliale et si la sensibilité intestinale aux glucocorticoïdes, variable selon l'âge, peut façonner l'impact sur l'intestin du stress de privation maternelle.

Matériels et méthodes : des rats âgés de 10 et 20 jours ont été séparés de leur mère pendant 4 heures, ou seulement manipulés et laissés à la mère (groupe sham). Les concentrations plasmatiques de corticostérone (CORT) ont été mesurées par dosage ELISA. La perméabilité intestinale totale a été évaluée *in vivo* en utilisant le marqueur Dextran-FITC 4 kDa (FD4) *per os* et le dosage plasmatique de FITC effectué 4h après administration orale. La mesure de perméabilité au FD4 a été réalisée dans un premier groupe de nouveau-nés préalablement traités ou non par le ML7, un inhibiteur de la MLCK contrôlant la contraction du cytosquelette des cellules épithéliales, et dans un second groupe d'animaux prétraités ou non au Ru486, un antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). La perméabilité régionale dans le côlon et l'iléon au FD4 et à la horseradish peroxidase 44kDa (HRP) a été déterminée en chambres de Ussing chez les rats de 10 et 20 jours, exposés ou non à la SM. La translocation bactérienne a été déterminée 24h après la SM en comparaison du groupe contrôle (sham). Des groupes supplémentaires de rats âgés de 10 et 20 jours ont été utilisés pour comparer l'expression basale des ARNm codant pour les GR dans le côlon et l'iléon, et pour l'étude dose-réponse de la sensibilité basale de l'intestin à la Dexaméthasone (Dex), un agoniste sélectif des GR.

Résultats : un seul épisode de SM de 4h a augmenté significativement le niveau plasmatique de CORT chez le raton mâle et femelle, quelque soit l'âge, attestant d'un stress en réponse à la SM. Seulement chez le nouveau-né de 10 jours, la perméabilité intestinale totale au FD4 a été augmentée immédiatement après la SM (2 fois, $p < 0.01$), accompagnée d'une translocation bactérienne dans le foie et la rate en comparaison du groupe contrôle. Chez le nouveau-né de 10 jours, les données en chambres de Ussing ont montré une augmentation de 2 fois de la perméabilité au FD4 dans le côlon des rats séparés de leurs mères ($p < 0.01$), mais pas dans l'iléon. La perméabilité colique n'était pas seulement affectée pour la perméabilité au FD4, mais aussi pour la HRP 44kDa, montrant un passage transépithélial exacerbé aux molécules de haut poids moléculaire en réponse à la SM. *In vivo*, un traitement Ru486 ou au ML7 a prévenu l'augmentation de perméabilité intestinale totale au FD4 en réponse à la SM. Le prétraitement ML7 a également bloqué l'effet de la SM sur la translocation bactérienne. L'administration de Dex a mimé l'augmentation de la perméabilité intestinale totale au FD4 induite par la SM selon un effet dose, avec un ED50 de 0.1mg/kg et un effet maximal (Emax) dès 0.05mg/kg. En revanche, aucun effet de la SM n'a été observé sur la perméabilité intestinale chez le rat âgé de 20 jours, ni sur la translocation bactérienne systémique. Ce modèle animal mimant les conditions de naissance à terme est caractérisé par l'absence de réponse à la Dex sur la perméabilité *in vivo* au FD4 avant 1mg/kg, à corrélérer à une diminution marquée de l'expression basale des ARNm GR en comparaison des rats de 10 jours, uniquement observée au niveau du côlon.

Conclusion : cette étude montre qu'une SM unique et de courte durée chez le rat allaité âgé de 10 jours, un modèle expérimental proche de l'enfant prématuré, a exacerbé la perméabilité épithéliale aux macromolécules dans l'intestin immature, via un mécanisme MLCK-dépendant et la contraction du cytosquelette, accompagné d'une translocation bactérienne vers le foie et la rate. Les données pharmacologiques ont conclu que la sensibilité intestinale élevée vis-à-vis de la corticostéronémie induite par la SM a conduit à une altération immédiate de la barrière épithéliale, essentiellement dans le côlon, augmentant le passage de bactéries viables vers les organes systémiques. Ces résultats montrent que la réactivité intestinale élevée aux corticoïdes dans un intestin immature définit une fenêtre critique face à une privation maternelle post-partum de courte durée, perturbant l'intégrité de la barrière épithéliale au niveau du côlon et augmentant le risque de bactériémie chez le nouveau-né prématuré.

Changes in Intestinal Glucocorticoid Sensitivity in Early Life Shape the Risk of Epithelial Barrier Defect in Maternal-Deprived Rats

Nabila Moussaoui^{1,3}, Viorica Braniste¹, Afifa Ait-Belgnaoui², Mélissa Gabanou¹, Soraya Sekkal², Maiwenn Olier², Vassilia Théodorou², Pascal G. P. Martin^{3,4}, Eric Houdeau^{1*†}

1 Intestinal Development, Xenobiotics & Immunotoxicology, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Research Centre in Food Toxicology (Toxalim), Toulouse, France, **2** Neurogastroenterology & Nutrition, INRA, Toxalim, Toulouse, France, **3** Integrative Toxicology & Metabolism, INRA, Toxalim, Toulouse, France, **4** GeT-TRiX facility, INRA, Toxalim, Toulouse, France

Abstract

Glucocorticoids (GC) contribute to human intestine ontogeny and accelerate gut barrier development in preparation to birth. Rat gut is immature at birth, and high intestinal GC sensitivity during the first two weeks of life resembles that of premature infants. This makes suckling rats a model to investigate postpartum impact of maternal separation (MS)-associated GC release in preterm babies, and whether GC sensitivity may shape MS effects in immature gut. A 4 hours-MS applied once at postnatal day (PND)10 enhanced plasma corticosterone in male and female pups, increased by two times the total *in vivo* intestinal permeability (IP) to oral FITC-Dextran 4 kDa (FD4) immediately after the end of MS, and induced bacterial translocation (BT) to liver and spleen. Ussing chamber experiments demonstrated a 2-fold increase of permeability to FD4 in the colon immediately after the end of MS, but not in the ileum. Colonic permeability was not only increased for FD4 but also to intact horseradish peroxidase 44 kDa in MS pups. *In vivo*, the glucocorticoid receptor (GR) antagonist RU486 or ML7 blockade of myosin light chain kinase controlling epithelial cytoskeleton contraction prevented MS-induced IP increase to oral FD4 and BT. In addition, the GR agonist dexamethasone dose-dependently mimicked MS-increase of IP to oral FD4. In contrast, MS effects on IP to oral FD4 and BT were absent at PND20, a model for full-term infant, characterized by a marked drop of IP to FD4 in response to dexamethasone, and decreased GR expression in the colon only compared to PND10 pups. These results show that high intestinal GC responsiveness in a rat model of prematurity defines a vulnerable window for a post-delivery MS, evoking immediate disruption of epithelial integrity in the large intestine, and increasing susceptibility to macromolecule passage and bacteremia.

Citation: Moussaoui N, Braniste V, Ait-Belgnaoui A, Gabanou M, Sekkal S, et al. (2014) Changes in Intestinal Glucocorticoid Sensitivity in Early Life Shape the Risk of Epithelial Barrier Defect in Maternal-Deprived Rats. PLoS ONE 9(2): e88382. doi:10.1371/journal.pone.0088382

Editor: Benoit Foligne, Institut Pasteur de Lille, France

Received: October 11, 2013; **Accepted:** January 6, 2014; **Published:** February 20, 2014

Copyright: © 2014 Moussaoui et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Grant from the Région Midi-Pyrénées. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: eric.houdeau@toulouse.inra.fr

† Current address: Institut National de la Recherche Agronomique, Toxalim UMR1331, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France

Introduction

The intestinal epithelium and associated immune system have important barrier functions through life, with immunological signaling pathways acting both as a defense against luminal pathogens, or favoring tolerance to food antigens and commensal microorganisms [1]. At birth, the human gut is more permeable than in adult, and immunoincompetent [2,3]. Bacterial colonization together with endocrine and nutritional factors drive mucosal immune system development, and stimulate growth and renewal of gut epithelium [3–5]. Among these factors, glucocorticoids (GC) play important roles for the maturation of digestive and absorptive functions, and stimulate morphogenesis in the small intestine and the colon in human [6–8] as well as in rodents [9–11]. In rodents, these beneficial activities occur during the first two weeks of life, a period characterized by high responsiveness to GC in various organs including the gut, with low levels of circulating corticosterone (CORT) [12,13]. In comparison, because the human gut is

fully developed at term compared to rodents, a period of GC sensitivity appeared earlier during prenatal development, between the second and third trimester of gestation [7,8], and postnatal GC administration has trophic effects on the immature gut in preterm infants [6]. From animal studies, a close contact between dams and the litter appears essential for the development of an effective gut barrier for life [14]. Indeed, maternal separation (MS) repeated daily before weaning increased total gut and colonic intestinal epithelial permeability in adulthood, enhancing the risk of intestinal diseases [14–17]. In a recent study, CORT injections in adult rats mimic increased gut permeability evoked by chronic MS [18], but whether GC increased gut permeability in neonates, including preterm babies, has not been explored yet. In humans, a mother-infant separation is recognized as a stress factor for the newborn [19,20]. Nevertheless, a transient MS shortly after birth is of common practice in delivery room for premature babies, after caesarean, as well as in postpartum routines when medical care is required for infant or the mother [19,21]. Yet, there is no study

with stress-based animal models aimed at investigating the consequences of a single MS on the developing gut taking into account the period of postnatal development and endogenous GC sensitivity.

Neonatal rodent models have great potential for mechanistic research on the direct influence of transient MS and associated CORT release on an immature gut barrier, because the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis in early postnatal life is found less responsive to environmental factors compared to the adult, except for maternal separation [22,23]. Epithelial permeability in the rodent intestine is high at birth as observed in human [24–27]. Spontaneous and facilitated bacterial translocation (BT) to mesenteric lymph nodes (MLN) occurs in early life, and peaked at postnatal day (PND) 7, while systemic organs remained sterile [28]. This supports the coordination between epithelial permeability and bacterial colonization for the development of mucosal immune tolerance and pathogen recognition [29–31]. One of the aims of the current work was to investigate the immediate impact of a single 4 hours-MS in neonate rats on the epithelial barrier integrity, and whether intestinal CORT responsiveness represents a risk for bacteremia. However, the rat gut at birth is morphologically immature, and resembles that of an early preterm human infant [32,33]. A rise in CORT plasma level after 14 days of life stimulates intestinal morphogenesis, then reach a functional barrier after three weeks [13,32]. In the current study, neonate rats at PND10 were used as a model for preterm human newborns, while rat pups at PND20 show comparable intestinal barrier maturity to that observed in full-term human babies during the first week of postnatal life [33]. Specifically, we compared the impact of a single 4 hours-MS session between PND10 and PND20 pups on gut epithelial permeability, and translocation of bacteria to systemic organs. Our study has been performed in relation to basal and MS-induced plasma CORT levels, gut sensitivity to the glucocorticoid receptor (GR) agonist dexamethasone (DEX) using dose-response, and GC receptors expression in the small intestine and the colon.

Materials and Methods

Ethic Statement

All experiment protocols were approved by the Local Animal Care and Use Committee of Institut National de la Recherche Agronomique (TOXCOM0035/EH), and conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE.

Animals

Primiparous pregnant female Wistar rats on gestational day 15 were obtained from Janvier (Le Genest St Isle, France). Rats were housed individually with their litters in polypropylene cages at $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ on a 12:12 hour light/dark cycle. Food (UAR Pellets; Epinay, France) and water were available *ad libitum*.

Single Maternal Separation Procedure

After delivery (PND1), litters were randomly assigned to maternal deprived or sham groups. A single 4 h MS was performed once from 8:00 to 12:00 h at PND10 or PND20, during which pups were removed from their dams, and individually housed at $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (single MS group). Sham pups were handled identically, but were maintained with their dams during the 4 h period.

Experimental Design and Drug Treatment

In a first series of experiments, total intestinal permeability (IP) to fluoro isothiocyanate (FITC)-Dextran 4 kDa (FD4) was

measured *in vivo* every 10 days from PND10 to PND50 (5 groups of 7–28 pups at each time point) in male and female offsprings in normal breeding conditions (i.e. left undisturbed); two additional groups of PND10 and PND20 pups were used for qPCR analysis of GR expression in the colon and the ileum (2 groups of 6–8 pups). In a second series of experiments, groups of pups at PND10 or PND20 were assessed for total IP to FD4 at 4, 8, 12 and 24 h after the beginning of MS or sham procedure ($n = 4\text{--}10$ per time point and sex). Two others groups ($n = 6\text{--}10$ per sex) were sacrificed immediately after MS or sham procedure for *ex vivo* determination of colonic and ileal permeability by Ussing chambers. Additional groups were used for determination of plasma CORT concentrations at 1, 2, 4, 8 and 12 h following MS or sham procedure ($n = 3\text{--}10$ per time point). In a third series, *in vivo* IP to FD4 was determined in male and female PND10 pups with or without MS: 4 groups of 7–17 rats per sex were pretreated with ML7 (1 mg/kg body weight (BW) i.p. in 10 μl ; Sigma), an inhibitor of myosin light chain kinase (MLCK), or the vehicle (NaCl 0.9%) at 24, 12 and 1 h before *in vivo* permeability measurement; 4 additional groups of 3–7 rats per sex were treated with the GR antagonist RU486 (2 mg/kg BW s.c. in 0.1 ml; Sigma) or vehicle (olive oil) at 12 and 1 h before assessing *in vivo* IP to FD4. In a fourth series of experiments, BT was assessed 24 h after MS or sham procedure in PND10 and PND20 pups ($n = 8\text{--}14$ per group) pretreated with ML7 or its vehicle (0.9% NaCl) the day of MS session. In a fifth series of experiments, a dose-response study to a single injection of dexamethasone (DEX, 0.01 to 2.5 mg/kg BW s.c. in 0.1 ml olive oil; Sigma) was performed in PND10 and PND20 male and female pups ($n = 3\text{--}10$ pups per dose) for IP to oral FD4 12 h later.

In vivo Intestinal Permeability

Total IP was measured *in vivo* in rat pups orally given with FITC-Dextran 4 kDa (FD4; 750 mg/kg BW; Sigma) [27]. Four hours later, a sufficient transit time for FD4 recovering in the colon lumen, blood samples (200 μl) were collected from the facial vein using heparin-coated capillaries (SARSTEDT, Marnay, France). Mucosal-to-blood passage of FD4 was determined by measuring plasmatic FD4 concentration using an automatic Infinite M200 microplate reader (Tecan, Austria) (Ex 485 nm; Em 525 nm).

Ussing Chamber Experiments

Colon (distal region) and ileum (2 cm above caecum) segments of 1 cm length were mounted in Ussing chambers (Easymount, Physiologic Instruments, Hamden, USA) as previously described [34]. Epithelial permeability to small and large molecules was measured through the mucosal-to-serosal passage of FD4 and intact Horseradish peroxidase (HRP) 44 kDa (Sigma), respectively, added simultaneously in the mucosal compartment. After 20 min of equilibration, 600 μl of buffer solution on the mucosal side was replaced by 300 μl of FD4 (2.2 mg/ml) and 300 μl of HRP (0.4 mg/ml). Electrical parameters, including potential difference, short-circuit current (Isc) and total electrical resistance (R), were recorded at regular intervals during the 2-hour period of experimentation. Epithelial permeability to FD4 was determined by measuring the fluorescence intensity at 485 nm/525 nm using an automatic Infinite M200 microplate reader (Tecan). Epithelial permeability to intact HRP was determined by an enzymatic assay [35] for specific HRP activity found in the serosal and mucosal compartment with microplate reader (Tecan). Permeability was calculated as the ratio of flux/concentration, as previously described [36], and expressed as cm/second.

Blood Sampling and Plasma Corticosterone

Blood samples (200 μ l) were collected from the facial vein as described above. Plasma was isolated by centrifugation (10 min, 2500 \times g), and corticosterone (CORT) concentrations were determined by enzyme immunoassay (Immunodiagnostic System, Paris, France) according to the manufacturer's instructions.

Bacterial Translocation

Immediately after sacrifice, the liver, spleen and MLN were harvested, weighed and homogenized (Fastprep, Ozyme, France) under sterile conditions. Dilutions were plated onto standard tryptic soy agar and Schaedler agar with 5% sheep blood (Biomérieux, France) for aerobic and anaerobic conditions, respectively, and incubated at 37°C for 48 h. The number of colony forming unit (CFU) was counted, and BT expressed as log CFU per gram of tissue (\pm SD). The detection limit was 1.63 CFU/g of liver, 1.36 CFU/g of spleen and 2 CFU/g of MLN.

Real-time qPCR

Total RNA was prepared from ileum (2 cm above the caecum) and distal colon with RNeasy mini kit (Quiagen, Courtaboeuf France). Total RNA was reverse-transcribed using the High Script reverse transcription Supermix (Biorad, Marnes-la-coquette, France). Primer set for GR was: forward 5'TCTGGACTC-CATGCATGAGG3', reverse 5'TCCAAAAATGCTCTGGAAG-CAGT3' (annealing temperature 60°C). The qPCR assays were performed with IQ Syber Green Supermix (Biorad) on the CFX96 (Biorad). qPCR data were normalized by TATA-box binding protein (Tbp) expression levels and analyzed using $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Statistics

All analyses were done using GraphPad Prism 4 software (GraphPad; San Diego, USA). Intestinal permeability and plasma CORT in response to MS were expressed as the mean \pm SEM, and data analyzed by ANOVA and Tukey tests for *post hoc* comparisons. BT was expressed as the mean \pm SD and examined for significance using the chi square test and Fisher exact test. qPCR data were analyzed by Student t-tests. A *P* value <0.05 was considered significant.

Results

In vivo Intestinal Permeability during Development

In basal conditions (without MS), a similar age-related decrease of total IP to oral FD4 was observed in male and female rats from mid-lactation (PND10) to adulthood (PND50) (Figure 1). In PND10 pups, basal IP for FD4 was of 10.4 \pm 0.6 and 11.5 \pm 0.7 μ g/ml in males and females, respectively. From PND10 to PND30, permeability to FD4 progressively decreased (-39% and -52% in male and female, respectively; *p*<0.001), to display similar levels in both gender at PND40 (5.2 \pm 0.3 *vs.* 5.4 \pm 0.2 μ g/ml in males and females, respectively). From PND40 to PND50, a sharp decrease of IP to FD4 occurred in both sexes, with plasma FD4 concentration at PND50 of 1.3 \pm 0.3 μ g/ml in females (-76% *vs.* PND40; *p*<0.001) and 0.7 \pm 0.2 μ g/ml in males (-87% *vs.* PND40; *p*<0.0001), thus approximately 10% of PND10 levels.

Effect of a Single MS on *in vivo* IP and Plasma CORT Levels in PND10 and PND20 Rats

In PND10 pups, a single MS significantly increased IP to FD4 in male and female rats (+82 and +125%, respectively; *p*<0.001 *vs.*

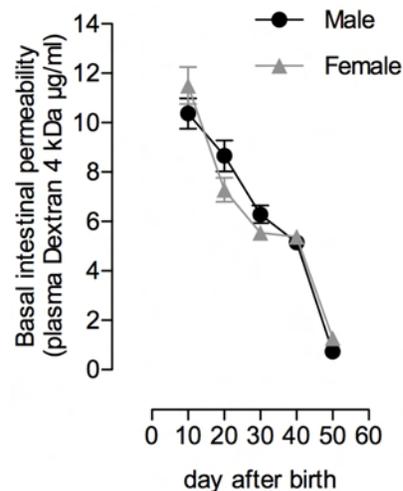


Figure 1. *In vivo* intestinal permeability to oral FD4 during development. Data show the progressive decrease of IP to FITC-Dextran 4 kDa (FD4) every 10 days from the mid-lactation period (postnatal day (PND) 10) to adulthood (PND50). Data are expressed as the mean of plasma FITC-Dextran concentration (μ g/ml) \pm SEM. Numbers of animals per group and sex: PND10 (n=22–26), PND20 (27–28), PND30 (n=12–16), PND40 (n=10–12) and PND50 (n=7–12). doi:10.1371/journal.pone.0088382.g001

corresponding controls) immediately after the end of MS procedure (i.e. T4 h) (Figure 2A). This effect persisted 4 h later at T8 h (+71 and +60% in males and females *vs.* controls; *p*<0.01), and returned to basal values after 12 h. At PND20, a single MS did not change IP to FD4 in both sexes (Figure 2A).

At PND10 under basal conditions (i.e. before MS), male and female pups showed comparable plasma CORT concentrations (13 \pm 0.9 *vs.* 12.8 \pm 1.1 ng/ml, respectively) (Figure 2B). A single MS progressively increased plasma CORT levels in both sexes, with maximal levels (i.e. 2–3 fold increase compared to sham pups) at the end of MS procedure (Figure 2B). At PND20, higher basal CORT levels were observed in males and females (24.3 \pm 6.8 and 26 \pm 3.4 ng/ml, respectively) compared to PND10 rats (*p*<0.01) (Figure 2B), and a 2 fold increase in plasma CORT concentrations was reported 4 h after the beginning of MS compared to PND20 sham pups, then returned to basal values within 4 h after the end of MS procedure (Figure 2B).

Effect of MS on Colonic and Ileal Permeability in PND10 Rats

Because the colon is a reservoir of complex microbial composition, and an abundant source of potentially detrimental ligands and antigens for the organism [1,37], we assessed the effect of MS on specific epithelial permeability to small and large molecules in the colon and the ileum by Ussing chambers (Figure 3). Because no difference between male and female were observed, whatever the intestinal segment, the figure 3 shows data pooled from the two sexes. A single MS induced a 2-fold increase of permeability to colonic Dextran 4 kDa (0.64 \pm 0.07 *vs.* 0.32 \pm 0.04 cm/s \times 10⁻⁶ compared to sham pups; *p*<0.001), and to intact HRP 44 kDa (0.013 \pm 0.002 *vs.* 0.006 \pm 0.001 cm/s \times 10⁻⁷, respectively; *p*<0.01) in PND10 pups (Figure 3A). In contrast, no significant change in epithelial permeability to Dextran 4 kDa or HPR 44 kDa was observed in the ileum of MS pups (Figure 3B).

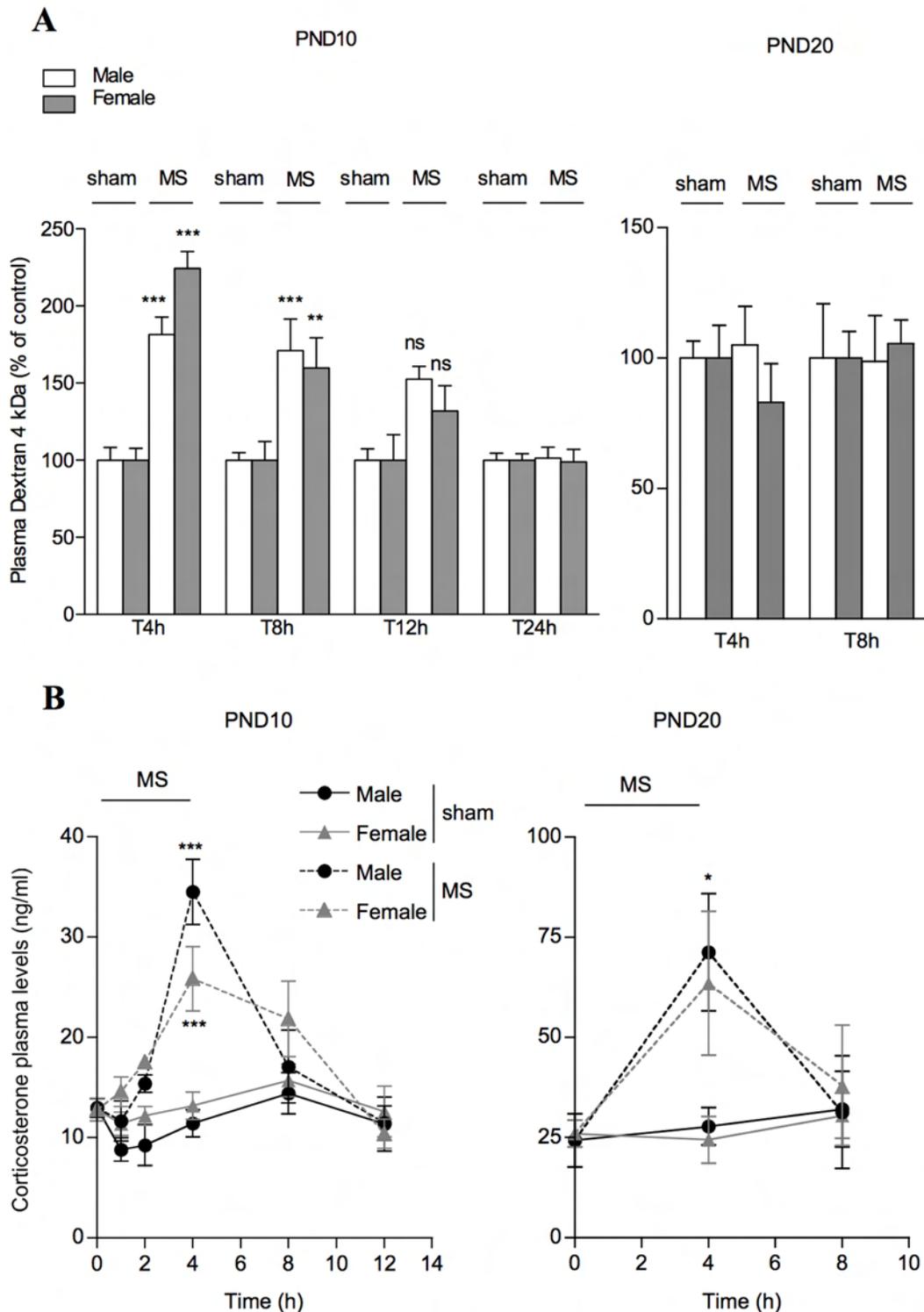


Figure 2. Effect of a single MS for 4 h on IP and plasma CORT in PND10 and PND20 rats. (A) Data show *in vivo* IP to FD4 immediately after MS (T4 h), and after the pups were returned to their dams (T8 h, T12 h and T24 h). Note that only PND10 rats displayed increased IP in response to MS procedure. Data are mean \pm SEM (7–10 animals per group). ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ compared to corresponding sham controls. (B) Blood samples from MS and sham pups were obtained in rats throughout the MS procedure lasting for 4 h, then every 4 h for 8 to 12 h after the pups were returned to their dams. Note that basal plasma CORT levels in male and female PND10 were lower than in their PND20 counterparts. In both PND10 and PND20 rats, circulating CORT increased in MS rats soon after they were removed from their mother, and peaked at 4 h. Data are expressed as the mean \pm SEM in 3–10 pups per time-point. ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ compared to basal. doi:10.1371/journal.pone.0088382.g002

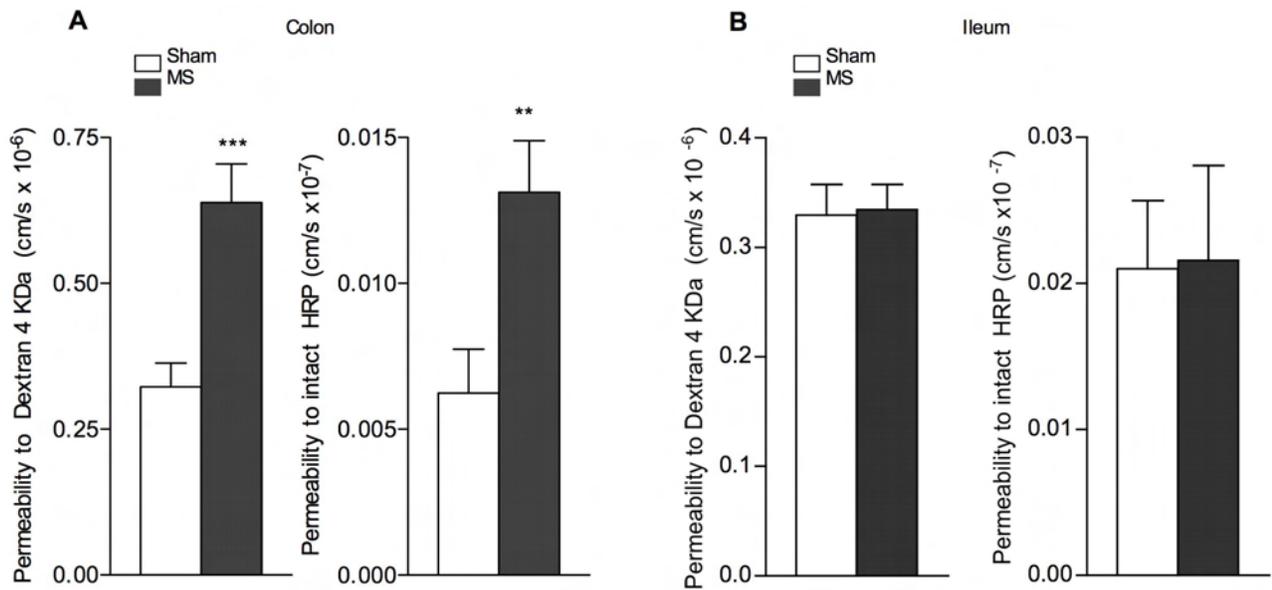


Figure 3. Effect of a single MS on colonic and ileal permeability to FD4 and intact HRP in PND10 rats. Using chambers measurements of mucosal-to-serosal permeability to Dextran 4 kDa and HRP 44 kDa in (A) colonic and (B) ileal segments of PND10 pups immediately after MS (T4 h). Note that MS increased FD4 and intact HRP permeability in the colon, but not in the ileum. Pooled data of both genders are shown and are expressed as the mean of permeability to FD4 ($\text{cm/s} \times 10^{-6}$) \pm SEM in 9–16 animals per group, and HRP ($\text{cm/s} \times 10^{-7}$) \pm SEM in 6–17 animals per group. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ compared to corresponding sham controls. doi:10.1371/journal.pone.0088382.g003

Effect of ML7 and RU486 on *in vivo* IP Induced by MS in PND10 Rats

Previous studies emphasized a pivotal role of MLCK in stress-induced increase of gut permeability in adult rat [38]. In the current study, MS-induced increase of IP to FD4 in PND10 pups was prevented by prior administration of ML7, a specific inhibitor of MLCK (Figure 4A), while the vehicle only (0.9% NaCl) had no effect (not shown). Similarly, RU486 treatment to block GR prior to MS procedure totally prevented the increase of IP to FD4 in response to MS (Figure 4B). The vehicle of RU486 (olive oil) had no effect on MS-induced increase of IP, and neither RU486 nor ML7 treatments altered basal epithelial permeability in PND10 pups in the absence of MS procedure (not shown).

Intestinal GR Expression and Dose-response Study of DEX on *in vivo* IP in PND10 and PND20 Rats

A recent study in adult rats reported a region-specific distribution for CORT effects along the GI tract, mainly targeting the colonic epithelium permeability in stress conditions [18]. Compared to PND10 pups, no significant difference in basal expression of GR mRNA was observed in the ileum of PND20 neonates. In contrast, a 70% drop in mRNA levels occurred in the colon from PND10 to PND20 of age (Figure 5A). Changes in IP to FD4 in response to GR stimulation between PND10 and PND20 rats were then studied dose-dependently with the GR agonist DEX. At PND10, DEX significantly increased total IP to FD4 (Figure 5B). Analysis of the sigmoid dose-response curves revealed a median-effective dose (ED₅₀) of 0.1 mg/kg BW in both sexes, and maximal stimulation at 0.5 mg/kg BW. At PND20, we did not observe any increase of IP to FD4 in response to DEX before 1 mg/kg BW (Figure 5B), showing lower efficacy of GR than reported in PND10 pups.

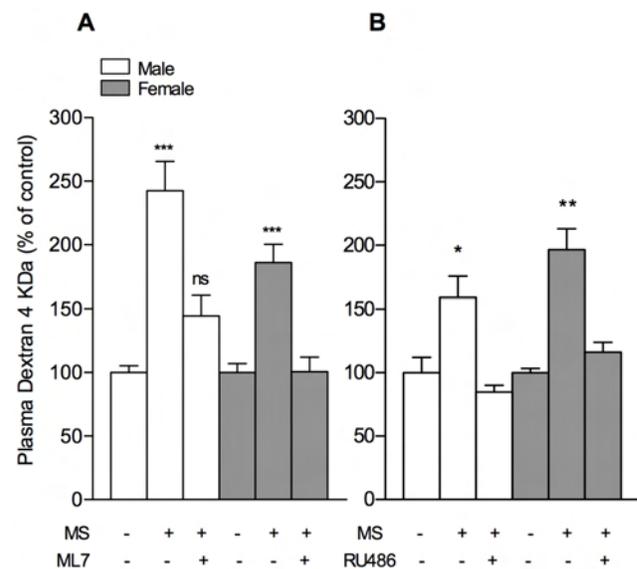


Figure 4. Effects of RU486 and ML7 on MS-induced increase of IP to FD4 in PND10 rats. Treatment with (A) ML7 (1 mg/kg/d in 0.9% NaCl i.p. at 24, 12 and 1 h before IP measurement), and (B) the GR antagonist RU486 (2 mg/kg/d in olive oil s.c. at 12 and 1 h before IP measurement) prior to MS prevented the IP increase in response to MS. Values are mean \pm SEM ($n = 7-17$ and $n = 3-7$ pups per group for experiment A and B respectively), and * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to their respective controls. doi:10.1371/journal.pone.0088382.g004

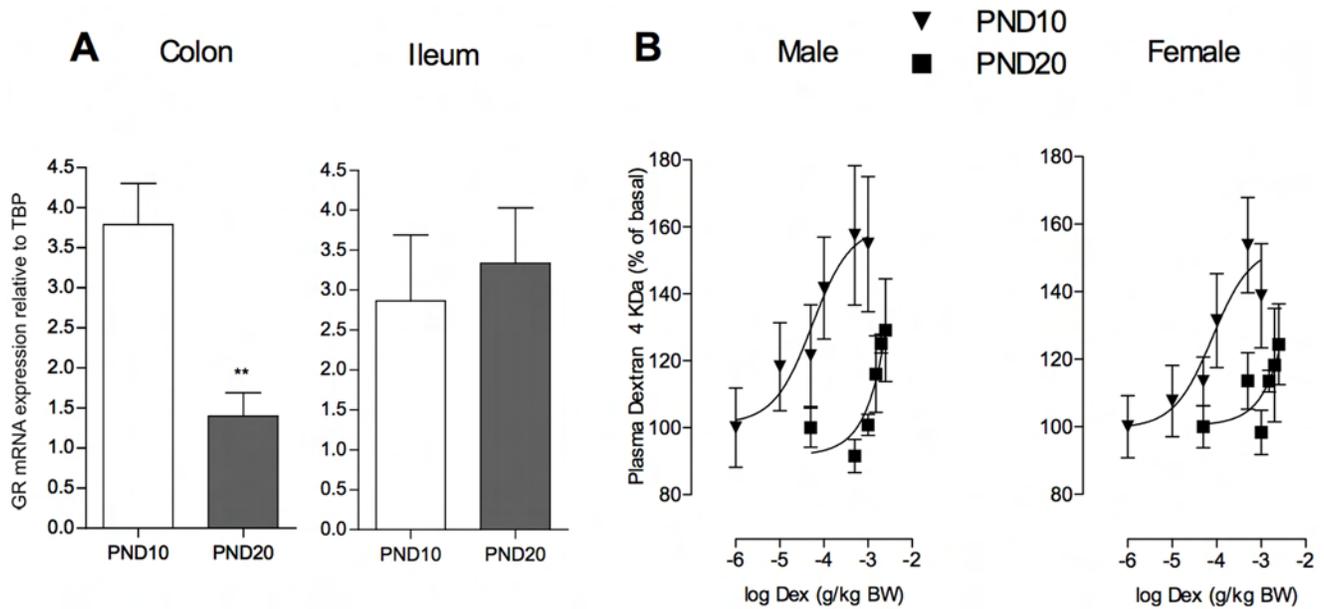


Figure 5. Dose-response study of DEX on IP to FD4 and GR expression in the small intestine and the colon. (A) qPCR results for GR mRNA using total RNA from colon and ileum lysates of PND10 and PND20 female rat pups. (B) Total *in vivo* IP to Dextran 4 kDa (FD4) was measured following subcutaneous injections of Dex (0.01 mg to 2.5 mg (kg BW)⁻¹ for 1 day) at PND10 or PND20. In both sexes, note the decreased sensitivity to GC receptor stimulation evoking IP increase to FD4 at PND20 compared to PND10. Data are expressed as the mean±SEM (n=3–10 pups per group).

doi:10.1371/journal.pone.0088382.g005

Effect of MS and ML7 on Bacterial Translocation in PND10 and PND20 Rats

At PND10, a spontaneous BT to MLN occurred in sham pups, with a basal incidence of 25 to 53%, while both liver and spleen were sterile, whatever the gender (Table 1). Twenty-four hours after MS, a significant BT of aerobic and anaerobic bacteria to the liver and spleen occurred (p<0.05), and ML7 pretreatment prevented this effect (Table 1). At PND20, spontaneous BT to MLN significantly decreased or was absent (basal incidence 0 to 13%), and all animal tested were found negative for BT into systemic organs 24 h after MS (Table 1).

Discussion

Our study shows a vulnerable window in rats during early postnatal life (i.e. 10-days-old) through which a single episode of mother-infant separation evoked an immediate increase of gut permeability to macromolecules in the large intestine, enhancing the passage of viable bacteria to systemic organs. These MS-effects occurred through a MLCK-dependent pathway controlling cytoskeleton contraction in epithelial cells, and were linked to increased CORT plasma levels during the MS period, and downstream activation of GC receptors (GR) found highly expressed in the colon at PND10 compared to later age at PND20. At PND20, neither intestinal permeability nor bacterial

Table 1. Comparative effects of single MS on bacterial translocation into the MLN, liver and spleen at PND10 and PND20.

		MLN			Liver			Spleen		
		Sham	MS+NaCl	MS+ML7	Sham	MS+NaCl	MS+ML7	Sham	MS+NaCl	MS+ML7
Aerobic bacteria										
PND10	male	3/12(2.5)	8/12 ^{ns} (2.3)	2/8(1.1)	0/12	7/12 ^a (2.2)	0/8	0/12	7/12 ^a (1.9)	0/8
	female	7/13(2.1)	10/14 ^{ns} (3.2)	1/10(3.7)	0/13	9/14 ^a (2.0)	1/10(2.1)	0/13	7/14 ^a (2.3)	1/10(2.3)
PND20	male	1/8(2)	1/8(2.8)		0/8	0/8		0/8	0/8	
	female	1/8(4.5)	0/8		0/8	0/8		1/8(3.5)	0/8	
Anaerobic bacteria										
PND10	male	4/12(1.9)	9/12 ^{ns} (2.5)	3/8(1.3)	0/12	8/12 ^a (2)	0/8	0/12	8/12 ^a (1.7)	0/8
	female	7/13(1.8)	12/14 ^{ns} (3)	2/10(2.7)	0/13	9/14 ^a (1.9)	2/10(1)	0/13	8/14 ^a (1.6)	1/10(1.4)
PND20	male	0/8	0/8		0/8	0/8		0/8	0/8	
	female	1/8(5)	0/8		0/8	0/8		1/8(3.4)	0/8	

Expressed as the number of positive organs. Mean number of bacterial colonies indicated between parentheses (logCFU/g of tissue). Values are mean±SD. MLN: mesenteric lymph nodes; PND: postnatal day; ^asignificantly different (p<0.05), and ns: not significant from sham controls.

doi:10.1371/journal.pone.0088382.t001

translocation was affected after the same MS procedure. A dose-response study to DEX on epithelial permeability assessed *in vivo* showed a shift in intestinal GC sensitivity from PND10 to PND20 that protect the PND20 pups from deleterious MS-induced stress impacts on the gut barrier.

It is well established that neonatal stress evoked by a daily separation from the dam for two weeks (2–6 h per day from PND2 to 14 or 4 to 21) impairs intestinal barrier integrity at the end of the chronic stress procedure, with long-lasting effects through life [14–16,39]. These stress-based animal models have been developed in understanding how repeated traumatic experiences in early life for human may predispose to intestinal diseases in adulthood [14,15]. However, authors did not investigate the immediate impact on the gut barrier of pups, i.e. at the end of a MS session applied only once as a model for a transient mother-infant separation in early postnatal days. Indeed in many industrialized countries, the medical decision to separate a newborn baby from the mother around the birth is frequent, motivated by the desire to strengthen supervision after a difficult delivery or a caesarean [19,21,40]. In most cases, the newborn return to his/her mother after a few hours while maternal deprivation is extended for premature babies in neonatal care units. Because mother-infant closeness and separation are under discussion for infant health [19,41], the effects on the immature gut barrier in early life have to be documented. This is of importance for example when intestinal barrier disruption in premature babies is considered as contributing to the pathogenesis of necrotizing enterocolitis (NEC), and perinatal stress has been implicated as a risk factor [42,43], as well as for full-term neonates who develop NEC [44]. Of interest, although the rat gut at birth is morphologically immature compare to full-term human babies [3,33], it displays during the first two weeks of life a GC sensitivity that resembles that observed in human preterm babies [6,8,12,45]. This makes the 10-days-old rat pups a good model to investigate whether GC sensitivity in an immature gut may shape barrier disturbances for the newborn. At PND20, the intestinal barrier in rodents has developed a fully activated and functional mucosal immunity faced with intestinal microbiota, and looks like that of a healthy full term baby during the first week of life [33].

Because the primary function of gut epithelium is to provide a protective barrier for the organism against adverse luminal factors for life [1,3], intestinal permeability is commonly used as a marker of epithelial integrity in human newborns [25,46,47]. Intestinal permeability is high at birth in rodents as in humans [24–27] while the neonatal gut undergoes rapid growth with immunologic changes for complete functional maturity [3], concomitantly to a decrease in intestinal permeability for closure of the epithelial barrier to the external environment [46–48]. To illustrate this developmental gut closure, we first used a single oral load of Dextran 4 kDa (herein FD4) in the rat, and measured plasma FD4 concentrations after 4 h to assess *in vivo* IP along the gastrointestinal tract from PND10 to adulthood. We report an age-dependent decrease of IP to FD4 across this period, without difference between male and female rats. This sequence of epithelial barrier maturation appeared similar to that described in mice using similar oral dosage of FD4 [27], although the murine epithelial barrier showed a four-fold abrupt decrease of IP between the second and third week of life, while epithelial barrier in rats continues to mature until PND40 as described herein. The present data have validated the use of *in vivo* IP measurements to FD4 for investigating the impact of a short-time MS on epithelial barrier integrity at different postnatal ages. Hence, rat neonates at PND10, but not at PND20, showed disruption of the epithelial barrier in response to a 4 h-MS and applied once compared to

non-deprived pups, with increased IP to FD4 that continued 8 hours after the MS pups returned to their dams, i.e. 12 hours after the beginning of the MS procedure, and returned to basal values by 24 hours. We then investigated whether epithelial permeability was affected in all intestinal segments after MS procedure in PND10 pups. Compared to the ileum, we reported that permeability to FD4 was significantly increased after a single MS in the colon only. In addition, we showed that epithelial passage for macromolecules of higher molecular weight (herein assessed with HRP 44 kDa) was also enhanced in the colon of PND10 MS pups, while ileal segments displayed no change in permeability to intact HRP in response to MS. Interestingly, a colon-specific alteration of epithelial permeability has been recently reported in the gut of adult rats under chronic stress conditions [18]. In their permeability data, these authors demonstrated that increased colonic permeability in stressed rats was limited to small molecules of 400 Da, while the current study in MS pups at PND10 demonstrated enhanced permeability to macromolecular markers up to 44 kDa. This observation is of particular importance for the newborn health in early life, since the colon provides an abundant source of luminal antigens within the range of molecular weights herein assessed, some of them (e.g. food antigens, bacterial toxins, ...) may trigger mucosal injury, and a reservoir for systemic infections [1,2]. Furthermore, it is also important to note that MS effect on intestinal macromolecular permeability was limited to PND10 pups, since increased gut permeability to FD4 (and consequently to upper molecular weight molecules) was not reported later at PND20. This age-dependent relationship probably reflects a rapid maturation process of the rat intestine between 10 and 20 days of life that strengthens the barrier to macromolecules. Because premature infants displayed underdeveloped barrier function in the gut as in the PND10 rats [32,33], it is suggested that this makes preterm babies in maternal-deprived conditions more susceptible to macromolecules uptake from the gut lumen.

In adult rats under acute stress, it has been reported that altered gut permeability was dependent upon epithelial cytoskeleton contraction through MLCK activation, a mechanism enhancing the passage of macromolecules in the colon [38]. In PND10 rats, we report the same pathway for MS-induced increase of *in vivo* IP to FD4 since ML7, a specific MLCK inhibitor, completely prevented this effect. In MS pups, the immediate consequence of epithelial barrier disruption was an abnormal translocation of viable bacteria to spleen and liver, while these extraintestinal sites remained sterile in control groups, a normal feature in normal breast-fed PND10 rats as demonstrated by Yajima *et al.* [28]. In accordance with these authors, we report spontaneous BT into MLN during the suckling period in non-deprived PND10 rats, a physiological feature that was not affected by MS procedure in our study. Spontaneous BT into MLN in early neonatal life occurs concomitantly to bacterial colonization of the gut, hence participating to the development of immune tolerance to microbiota [49], and it is well accepted that neonatal stress, even acute stressors such as hypoxia, do not change frequency of basal BT into MLN of pups [28,50]. However, Yajima *et al.* [28] also showed in PND10 rats that a minimal stress factor related to a cannulation gesture to mimic artificial feeding induced significant BT to the liver (>60% of incidence) [28]. At the same age, we show that a non-aggressive stress induced by a single episode of MS for 4 h was sufficient to evoke BT to extraintestinal sites, including spleen, thus demonstrating systemic passage of viable bacteria. In addition, we report that ML7 pretreatment to block MLCK activity in epithelial cells banned bacterial passage to liver and spleen in MS pups, thus establishing a link between MS-

induced gut permeability increase, cytoskeleton contraction, and the transepithelial passage of viable bacteria to systemic organs.

It has been shown that chronic neonatal stress interfered with various modulatory systems involved in the gut maturation, through an array of alterations in the brain-gut axis that are influenced by timing of stress procedure [14,23,51]. Previous studies emphasized an important role of peripheral GC in the regulation of intestinal growth [10,11] while the HPA axis in rodents until two weeks of life is characterized by an hyporesponsive period to various stress factors compared to later ages [22], except for maternal deprivation [23]. Consistent with these findings, PND10 pups in our study showed low levels of circulating basal concentrations of CORT in comparison to PND20 rats. A single MS procedure at PND10 significantly enhanced CORT plasma levels 4 hours after the beginning of the MS procedure, and we report that the GR blockade by RU486 completely prevented the MS-induced increase of gut permeability. This first demonstrated that a single 4 h-MS in 10-day-old pups was a sufficient stress event to increase plasma corticosteroids during gut development despite low HPA axis activity, and that the rise in CORT release is responsible for enhanced epithelial permeability across this period. In contrast at PND20, although MS procedure also increased circulating CORT levels, such release was not accompanied by any epithelial permeability changes in the gut. These findings allowed us to investigate whether this lack of MS response on gut permeability at PND20 may be related to difference in intestinal sensitivity to GR stimulation compared to earlier postnatal ages. A dose-related response of *in vivo* FD4 permeability to DEX administration clearly showed the better efficacy of GR stimulation to increase epithelial permeability in PND10 than in PND20 pups. Indeed, DEX treatment at PND20 was only effective in increasing FD4 passage in rats dosed from 1 mg/kg BW while permeability changes at PND10 occurred from 50 µg/kg of DEX with a median-effective dose of 0.1 mg/kg, and maximal stimulation at 0.5 mg/kg, whatever the gender. This difference in GC sensitivity with age is in line with Chen *et al* [11] who observed that 8 and 10-day-old rats were highly sensitive to corticoid-induced morphological changes in the colon, an effect that disappeared after two weeks of life, a time-point corresponding to PND20 pups in our study. Earlier works on ontogeny of intestinal GC responsiveness in rats also reported a decrease in binding activity to GR from the second to third postnatal weeks of life, to reach stable levels until adulthood [12,13]. These authors

also indicated that the small intestine at PND10 displayed high level of GR during the first two weeks of life, despite no response to MS stress in our study in contrast to the colon at the same age. This is in support of a segment-dependent activity of GR along the gastrointestinal tract during gut development, mainly dedicated to enzyme changes in the small intestine for maturation of digestive functions [12], while GR in the colon appeared more participative to epithelial barrier development (our study and [11]). Furthermore, our results provide evidence for a downregulation of mRNA encoding GR in the colon of rat pups between PND10 and PND20, a developmental change not observed in the ileum. This is consistent with recent observations in adult rats indicating a region-specific role for CORT as a mediator for stress-induced permeability changes in the colon, an effect absent in upper intestinal region where GR protein level is 10-fold less expressed compared with colonic tissue [18]. During postnatal life, we propose a similar gradient for GC effect in the immature gut at PND10, and that a decrease in colonic GR expression in PND20 rat pups likely contributes for silencing MS effects on epithelial permeability, and the lower capability of DEX stimulation to affect IP *in vivo*.

In conclusion, this study demonstrated a critical period for mother-infant separation in early neonatal life on intestinal barrier integrity in rats, resulting from exacerbated sensitivity of the immature gut to stress-induced corticosteroid release. These findings highlight that a mother-infant closeness in early life may positively influence the maturational sequence of the intestinal barrier, and that episodes of mother-infant separation in postpartum care, particularly for premature babies, could transiently compromise epithelial integrity, increasing the infant susceptibility to inflammation or sepsis.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr S Ménard for helpful comments, and wish to thank V Eyjafjöll for assistance in animal studies and data collection. The assistance of P Roubly for animal care is acknowledged.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NM VB PM EH. Performed the experiments: NM VB AA MG SS MO. Analyzed the data: NM VB AA MO VT PM EH. Wrote the paper: NM PM EH.

References

- Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 799–809.
- Neu J (2007) Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *Am J Clin Nutr* 85: 629S–634S.
- Wagner CL, Taylor SN, Johnson D (2008) Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. *Clin Rev Allergy Immunol* 34: 191–204.
- Maheshwari A, Zemlin M (2006) Ontogeny of the intestinal immune system. *Haematol Report* 2: 18–26.
- Zeuthen LH, Fink LN, Metzendorf SB, Kristensen MB, Licht TR, et al. (2010) *Lactobacillus acidophilus* induces a slow but more sustained chemokine and cytokine response in naive foetal enterocytes compared to commensal *Escherichia coli*. *BMC Immunol* 11: 2.
- Costalos C, Gounaris A, Sevastiadou S, Hatzistamatiou Z, Theodoraki M, et al. (2003) The effect of antenatal corticosteroids on gut peptides of preterm infants—a matched group comparison: corticosteroids and gut development. *Early Hum Dev* 74: 83–88.
- Nanthakumar NN, Kloplic CE, Fernandez I, Walker WA (2003) Normal and glucocorticoid-induced development of the human small intestinal xenograft. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R162–170.
- Nanthakumar NN, Young C, Ko JS, Meng D, Chen J, et al. (2005) Glucocorticoid responsiveness in developing human intestine: possible role in prevention of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G85–92.
- Quaroni A, Tian JQ, Goke M, Podolsky DK (1999) Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. *Am J Physiol* 277: G1027–1040.
- Pacha J, Vagnerova R, Bryndova J (2003) Carbenoxolone accelerates maturation of rat intestine. *Pediatr Res* 53: 808–813.
- Chen M, Sun P, Liu XY, Dong D, Du J, et al. (2011) alpha-fetoprotein involvement during glucocorticoid-induced precocious maturation in rat colon. *World J Gastroenterol* 17: 2933–2940.
- Henning SJ, Ballard PL, Kretchmer N (1975) A study of the cytoplasmic receptors for glucocorticoids in intestine of pre- and postweanling rats. *J Biol Chem* 250: 2073–2079.
- Henning SJ (1978) Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol* 235: E451–456.
- Barreau F, Salvador-Cartier C, Houdeau E, Bueno L, Fioramonti J (2008) Long-term alterations of colonic nerve-mast cell interactions induced by neonatal maternal deprivation in rats. *Gut* 57: 582–590.
- Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L (2007) New insights in the etiology and pathophysiology of irritable bowel syndrome: contribution of neonatal stress models. *Pediatr Res* 62: 240–245.
- Gareau MG, Silva MA, Perdue MH (2008) Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr Mol Med* 8: 274–281.
- Oines E, Murison R, Mrdalj J, Gronli J, Milde AM (2011) Neonatal maternal separation in male rats increases intestinal permeability and affects behavior after chronic social stress. *Physiol Behav* 105: 1058–1066.

18. Zheng G, Wu SP, Hu Y, Smith DE, Wiley JW, et al. (2013) Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner. *Neurogastroenterol Motil* 25: e127–139.
19. Bystrova K, Ivanova V, Edhborg M, Matthiesen AS, Ransjo-Arvidson AB, et al. (2009) Early contact versus separation: effects on mother-infant interaction one year later. *Birth* 36: 97–109.
20. Morgan BE, Horn AR, Bergman NJ (2011) Should neonates sleep alone? *Biol Psychiatry* 70(9): 817–25.
21. Moore ER, Anderson GC, Bergman NJ (2012) Early skin-to-skin contact for mothers and their healthy newborn infants. *Cochrane Database Syst Rev* 5:CD003519.
22. Vazquez DM (1998) Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 23: 663–700.
23. Schmidt M, Enthoven L, van Woezik JH, Levine S, de Kloet ER, et al. (2004) The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J Neuroendocrinol* 16: 52–57.
24. Udall JN, Pang K, Fritze L, Kleinman R, Walker WA (1981) Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr Res* 15: 241–244.
25. Weaver LT, Laker MF, Nelson R (1984) Intestinal permeability in the newborn. *Arch Dis Child* 59: 236–241.
26. Catassi C, Bonucci A, Coppa GV, Carlucci A, Giorgi PL (1995) Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21: 383–386.
27. Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, Maheshwari A, Nusrat A, et al. (2012) Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am J Pathol* 180: 626–635.
28. Yajima M, Nakayama M, Hatano S, Yamazaki K, Aoyama Y, et al. (2001) Bacterial translocation in neonatal rats: the relation between intestinal flora, translocated bacteria, and influence of milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33: 592–601.
29. Corthesy B, Gaskins HR, Mercenier A (2007) Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr* 137: 781S–790S.
30. Perez PF, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, et al. (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119: e724–732.
31. Dong P, Yang Y, Wang WP (2010) The role of intestinal bifidobacteria on immune system development in young rats. *Early Hum Dev* 86: 51–58.
32. Puiman P, Stoll B (2008) Animal models to study neonatal nutrition in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11: 601–606.
33. McCracken VJ, Lorenz RG (2001) The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol* 3: 1–11.
34. Braniste V, Leveque M, Buisson-Brenac C, Bueno L, Fioramonti J, et al. (2009) Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *J Physiol* 587: 3317–3328.
35. Machly AC, Chance B (1954) The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal* 1: 357–424.
36. Artursson P, Magnusson C (1990) Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 79: 595–600.
37. Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Barreau F, Theodorou V, et al. (2007) Mucosal mast cell proteases are involved in colonic permeability alterations and subsequent bacterial translocation in endotoxemic rats. *Shock* 28: 118–124.
38. Ait-Belgnaoui A, Bradesi S, Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L (2005) Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* 113: 141–147.
39. Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L (2004) Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 53: 501–506.
40. Dageville C, Casagrande F, De Smet S & Boutté P (2011) The mother-infant encounter at birth must be protected. *Arch Pediatr* 18(9): 994–1000.
41. Flacking R, Lehtonen L, Thomson G, Axelin A, Ahlqvist S, et al. (2012) Closeness and separation in neonatal intensive care. *Acta Paediatr* 101: 1032–1037.
42. Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, Hackam DJ (2007) The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Shock* 27: 124–133.
43. Petrosyan M, Guner YS, Williams M, Grishin A, Ford HR (2009) Current concepts regarding the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int* 25: 309–318.
44. Maayan-Metzger A, Itzhak A, Mazkereth R, Kuint J (2004) Necrotizing enterocolitis in full-term infants: case-control study and review of the literature. *J Perinatol* 24: 494–499.
45. Gordon PV, Young ML, Marshall DD (2001) Focal small bowel perforation: an adverse effect of early postnatal dexamethasone therapy in extremely low birth weight infants. *J Perinatol* 21: 156–160.
46. Van Elburg RM, Uil JJ, de Monchy JG, Heymans HS (1992) Intestinal permeability in pediatric gastroenterology. *Scand J Gastroenterol Suppl* 194: 19–24.
47. Colome G, Sierra C, Blasco J, Garcia MV, Valverde E, et al. (2007) Intestinal permeability in different feedings in infancy. *Acta Paediatr* 96: 69–72.
48. Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, Anderson JM (2006) Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns* 6: 581–588.
49. Perez-Cano FJ, Franch A, Castellote C, Castell M (2012) The suckling rat as a model for immunonutrition studies in early life. *Clin Dev Immunol* 2012: 537310.
50. Urao M, Teitelbaum DH, Drongowski RA, Coran AG (1996) The association of gut-associated lymphoid tissue and bacterial translocation in the newborn rabbit. *J Pediatr Surg* 31: 1482–1487.
51. O'Mahony SM, Hyland NP, Dinan TG, Cryan JF (2011) Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 214: 71–88.

DISCUSSION

I Stress de séparation maternelle et intégrité de la fonction de barrière intestinale chez le nouveau-né

Comme constaté lors de cette première étude, la séparation maternelle affecte l'intégrité de la barrière intestinale du nouveau-né, en augmentant le niveau de perméabilité intestinale, essentiellement chez le rat de 10 jours et s'accompagnant à cet âge d'une translocation de bactéries viables vers le reste de l'organisme. Nous aborderons dans une première partie de discussion dans quelle mesure les marqueurs de perméabilité utilisés dans cette étude permettent de discriminer un effet sur les voies paracellulaire et transcellulaire dans l'épithélium, compatibles avec le passage de bactéries. Par ailleurs, les observations utilisant les outils de la pharmacologie témoignent d'un effet sur l'état de contraction du cytosquelette, via l'enzyme MLCK. Nous avons poursuivi les travaux par l'étude de l'impact du stress de SM sur les complexes des jonctions serrées, acteurs clés dans la régulation du passage paracellulaire. Nous évoquerons ensuite la régionalisation dans les effets de la SM unique entre l'iléon et le côlon, en lien manifeste avec la sensibilité différente de ces régions aux glucocorticoïdes et variable selon l'âge. Enfin nous aborderons la notion du risque inflammatoire et infectieux en relation avec la privation maternelle chez le nouveau-né et/ou l'utilisation de la Dexaméthasone selon l'âge de naissance.

1.1 Séparation maternelle et perméabilité épithéliale : choix des marqueurs et évaluation des voies de passage affectées chez le nouveau-né

Plusieurs études ont fait le choix d'utiliser le test d'excrétion urinaire au $^{51}\text{Cr-EDTA}$ pour étudier les effets du stress (aigu ou chronique) (Saunders *et al.*, 1994, Ferrier *et al.*, 2003) sur la perméabilité paracellulaire. Les études relatives au stress de SM ont également fait appel à cette technique (Barreau *et al.*, 2004a, b ; Oines *et al.*, 2011). L'avantage de ce test est qu'il présente une bonne corrélation avec le test au lactulose utilisé chez l'homme pour mesurer la perméabilité paracellulaire. De plus, la technique de dosage du $^{51}\text{Cr-EDTA}$ est simple et nécessite seulement un délai de 24 heures pour la collecte des urines. L'utilisation des marqueurs pour mesurer la perméabilité n'est pas standardisée, elle dépend surtout du modèle utilisé. Jusqu'à présent les effets de la SM n'ont été rapportés

que chez le rat adulte ce qui permettait d'utiliser sans inconvénients le test au $^{51}\text{Cr-EDTA}$. Or, chez le rat nouveau-né, le dosage urinaire du $^{51}\text{Cr-EDTA}$ n'est pas réalisable compte tenu du faible volume d'urine qui peut être récolté et du stress engendré, tant par la manipulation de l'animal que son isolement en cage de métabolisme nécessaire à la collecte des urines. En effet, la collecte d'urine nécessite d'isoler le rat pendant 12 ou 24 heures, une contrainte non envisageable pour le nouveau-né (stress, déshydratation...). Nous avons donc utilisé un autre marqueur, le FITC-Dextran 4KDa (FD4) qui, lorsqu'il est administré par voie orale, autorise de mesurer *in vivo* en 4 heures la perméabilité intestinale totale, sans contrainte de séparation de la mère et en dosant sa concentration dans le plasma à partir d'un prélèvement de sang réalisé rapidement à la veine faciale. Cette technique a présenté l'avantage de minimiser la manipulation du rat nouveau-né et donc de diminuer le risque qu'il soit stressé. Pour autant, la taille de cette macromolécule est sujette à discussion lorsqu'il s'agit de discriminer les voies para- et transcellulaire au travers de l'épithélium.

Selon les études, le FD4 a été considéré comme un marqueur soit de la voie paracellulaire régulée par les jonctions serrées, soit de la voie transcellulaire. Pour certains auteurs, le FD4 présente un poids moléculaire trop élevé en comparaison du $^{51}\text{Cr-EDTA}$ pour justifier d'une voie de passage intercellulaire, car dépasse les 600 Da considérés comme le seuil supérieur de passage autorisé par les complexes de jonctions serrées (Ménard *et al.*, 2004). D'autres auteurs au contraire utilisent *in vivo* le FD4 comme essentiellement un marqueur de la voie paracellulaire et ce, dès les conditions basales (Patel *et al.*, 2012). En support de ces derniers, une étude en siRNA a montré que lorsque la traduction de la protéine JAM1 était inhibée au sein d'une lignée humaine de cellules épithéliales coliques, la perméabilité au FD4 était augmentée et la résistance transépithéliale diminuée (Mandell *et al.*, 2005), en faveur d'un passage paracellulaire du marqueur. Dans notre étude, nous avons constaté que la perméabilité intestinale chez le rat nouveau-né était 10 fois plus élevée en comparaison de l'adulte, et des données préliminaires du laboratoire avaient conclu à une faible expression des ARNm de JAM A et Occludine à cet âge au niveau du côlon (Braniste *et al.* mémoire de thèse, 2012). Cependant, si ces dernières données peuvent justifier d'un passage facilité de FD4 par les espaces intercellulaires chez le nouveau-né, des observations plus récentes au cours de la thèse ont depuis montré en chambres de Ussing que la perméabilité au FD4 n'était pas corrélée à la conductance (r^2 : 0,08 et p value : 0,3) (Figure 31).

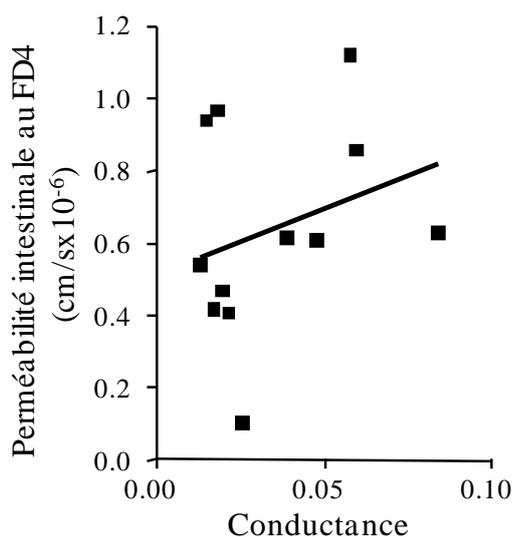


Figure 31 Relation non linéaire entre la perméabilité au FD4 et la conductance.

Les données obtenues chez les mâles et les femelles ont été *poolées* (n= : 12).

Ainsi dans l'intestin à 10 jours de vie, la perméabilité intestinale à cette macromolécule n'apparaît pas en lien direct avec le passage d'ions. Pour autant, ces observations n'éliminent pas définitivement le passage via les jonctions serrées, mais suggèrent plutôt que le FD4 est susceptible de passer l'épithélium par plusieurs voies, tant para- que transcellulaire (*Figure 32*).

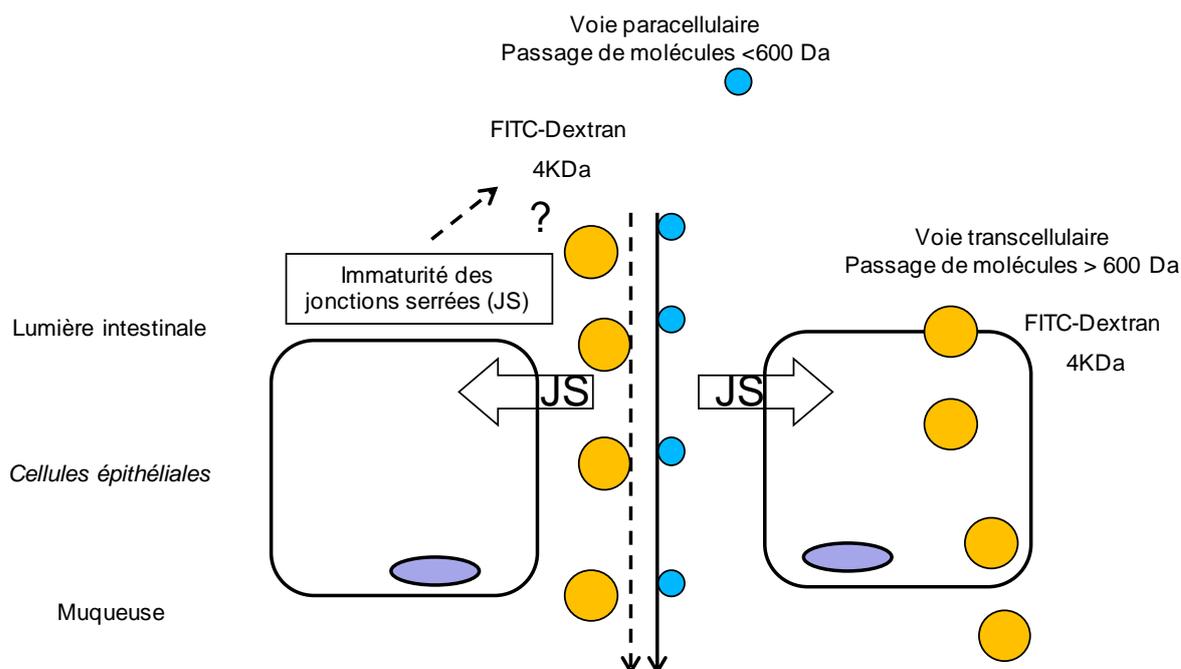


Figure 32 Voies de passage du FITC Dextran 4 kDa (FD4) au travers de l'épithélium intestinal.

Le poids moléculaire élevé du FD4 privilégie une voie de passage transcellulaire, mais la faible expression des protéines transmembranaires de jonctions serrées chez le nouveau-né âgé de 10 jours et la perméabilité basale élevée à cet âge en comparaison de l'adulte pourrait également permettre au FD4 d'utiliser la voie paracellulaire. JS : Jonctions Serrées.

Les analyses en chambres de Ussing sur différentes régions de l'intestin ont également montré que le stress de SM s'accompagnait, essentiellement au niveau du côlon, d'une augmentation de la perméabilité vis-à-vis de la HRP (44 kDa), parallèlement à celle de FD4. La HRP est une macromolécule dont le poids moléculaire excède les 600 Da, donc considérée unanimement comme un marqueur de la voie transcellulaire. L'étude de Gareau et collaborateurs en 2006 avait également montré que la SM chronique induisait au niveau du côlon une élévation du passage de HRP, cette fois chez le rat de 20 jours (Gareau *et al.*, 2006), montrant que la répétition des épisodes de SM peut avoir un impact à ce stade de développement, au contraire à la SM unique dans notre étude qui n'induit pas à cet âge d'altération de la perméabilité épithéliale, dès un marqueur de 4 kDa.

Chez le rat de 10 jours, si la perméabilité colique au FD4 ainsi qu'à la HRP était affectée par le stress de SM, en revanche, aucune modification de perméabilité épithéliale vis-à-vis de ces deux marqueurs n'a été observée au niveau de l'iléon. Cependant, nous ne disposons d'aucune donnée complémentaire concernant la perméabilité aux molécules de plus faible poids moléculaire, à l'exemple du PEG-400, un marqueur aussi bien utilisé dans les études cliniques chez les patients atteints de SII (Park *et al.*, 2009) que dans les études expérimentales chez le rat adulte soumis à un stress (Zheng *et al.*, 2013). Par ailleurs, les

résultats obtenus par Zheng et al. montrent que le stress augmente la perméabilité à des molécules allant jusqu'à 400 Da chez le rat adulte, alors que dans notre étude le rat de 10 jours présente une perméabilité beaucoup plus marquée par le stress laissant passer des macromolécules de poids moléculaire allant jusqu'à 44 KDa. Nous pourrions émettre l'hypothèse que cette plus forte réponse chez le rat nouveau-né serait liée à sa perméabilité colique basale qui est elle-même élevée par rapport à l'adulte, tant pour le FD4 que pour la HRP (Braniste *et al.*, données du laboratoire non publiées).

Dans notre étude, nous avons montré que l'augmentation de la perméabilité intestinale *in vivo* au FD4 était prévenue par un prétraitement au ML7 et donc dépendante de l'activation de l'enzyme MLCK. Un tel mécanisme, traduisant une contraction du cytosquelette des cellules épithéliales sous l'influence du stress, avait déjà été décrit chez le rat adulte exposé à un stress aigu ou chronique (Ait-Belgnaoui *et al.* 2005, Ferrier *et al.*, 2003). Dans ces études, l'activation de la MLCK au niveau du côlon se traduit par une augmentation de la forme phosphorylée de la protéine MLC. La MLC phosphorylée induit la contraction du cytosquelette, exerçant ainsi une tension sur les protéines de jonctions serrées et provoquant leur ouverture (Turner *et al.*, 2000b). Des études sont en cours sur notre modèle expérimental pour déterminer par Western blotting l'état de phosphorylation de cette protéine dans le côlon chez les rats nouveau-nés de 10 jours et en comparaison de l'iléon. Si des différences existent, elles pourraient justifier de l'absence de modification de perméabilité dans l'iléon chez les animaux stressés de 10 jours, appuyant l'idée d'une régionalisation le long de l'intestin du nouveau-né dans la sensibilité de l'épithélium aux conséquences du stress.

L'augmentation de la perméabilité chez le rat adulte est associée à une modification du niveau d'expression protéique des jonctions serrées dans le cas de la SM chronique (Soderholm *et al.*, 2002b). Pour le nouveau-né, nous nous sommes demandé si le stress de SM de courte durée pouvait également avoir un impact sur les complexes de jonctions serrées. Pour répondre à cette question, une étude de l'expression des ARNm de l'occludine et de JAMA, ainsi que de ZO-1 a été réalisée par RT-qPCR immédiatement après la procédure de SM, en présence et en l'absence de ML7. Les protéines transmembranaires (occludine et JAM) garantissent l'intégrité de la barrière épithéliale, et un défaut dans leur expression a été associé, comme chez les souris KO pour JAM-A, à une augmentation de la perméabilité intestinale au FD4 (Laukoetter *et al.*, 2007). Nous avons réalisé l'analyse au niveau du côlon et de l'iléon essentiellement chez la femelle,

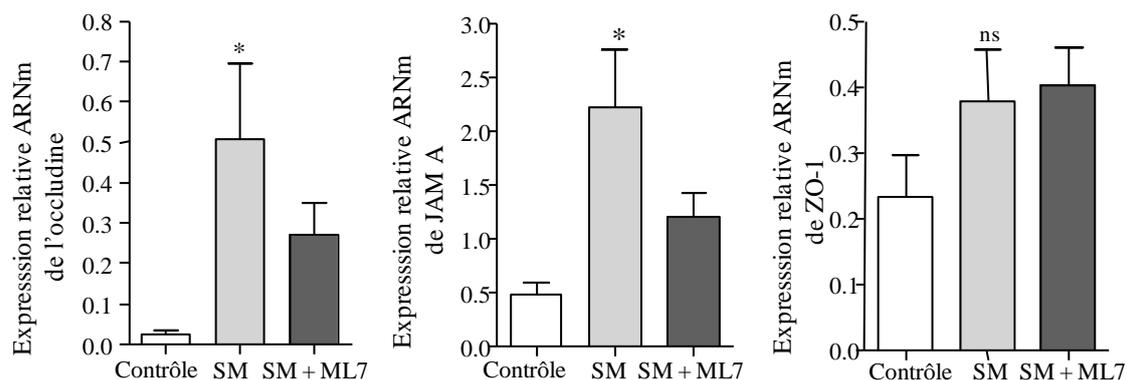
compte tenu de l'absence de dimorphisme sexuel sur l'ensemble des paramètres jusqu'alors étudiés (*Figure 33*). Que ce soit au niveau iléal ou colique, le stress de SM ne modifie pas l'expression du gène codant pour la protéine cytoplasmique ZO-1. En revanche, les messagers des protéines transmembranaires occludine et JAM-A sont apparus surexprimés dans l'iléon sous l'effet du stress. Dès ce résultat, il est intéressant de noter qu'un tel effet apparaisse dans la région iléale sans que nous ayons constaté de différence de perméabilité épithéliale au FD4 en chambres de Ussing. Dans le côlon, si une modification significative pour l'occludine a également été observée, seule une tendance à l'augmentation d'ARNm est apparue pour JAM-A, restée non significative en l'absence d'un nombre suffisant d'échantillons qu'il conviendra de compléter (*Figure 33*). Dans la littérature, il est bien décrit chez le rat adulte qu'un stress aigu de contrainte, ou encore un stress chronique d'évitement de l'eau (WAS), induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire associée à une diminution de l'expression de la protéine occludine (Moussa *et al.*, 2013 ; Zheng *et al.*, 2013). Nos résultats de RT-qPCR restent à ce jour très préliminaires et nécessitent d'être approfondis par une cinétique de l'expression des protéines des jonctions serrées, afin de mieux caractériser les événements s'opérant en réponse à la SM unique. Dans ce sens, il serait intéressant de déterminer si les niveaux d'expression des protéines occludine et JAM-A sont également diminués pendant et après l'épisode de SM, à l'exemple des données chez l'adulte (Moussa *et al.*, 2013 ; Zheng *et al.*, 2013). Dans cette hypothèse, une surexpression des ARNm codant pour ces protéines immédiatement après la privation maternelle pourrait résulter d'un mécanisme de compensation pour restaurer une perméabilité basale dans l'intestin, telle qu'elle est retrouvée dans notre étude dès 12 heures après le stress de séparation. Pour l'iléon où la perméabilité basale n'est pas affectée par la SM, il peut aussi être fait l'hypothèse que l'impact du stress de séparation sur l'expression d'occludine et de JAM-A apparaissent en écho des profondes altérations de la perméabilité colique, suggérant un mécanisme de protection pour l'ensemble de l'intestin dans le cas d'un effet s'installant sur le long terme.

Nous avons également montré que l'augmentation de la perméabilité au FD4 en réponse à la SM était prévenue par un prétraitement au ML7, bloquant la phosphorylation de la MLC. Nous avons poursuivi l'étude en évaluant l'expression des ARNm des protéines transmembranaires chez les animaux soumis à la SM, mais ayant reçu préalablement du ML7. Dans l'iléon, nous avons constaté que l'augmentation d'expression du gène de l'occludine et de la JAM-A après SM était prévenue par le prétraitement ML7, alors que ce

même agent était sans effet sur ces mêmes cibles dans le côlon (*Figure 33*). Pour la région iléale, ces observations suggèrent que les modifications d'expression des ARNm de l'occludine et de JAM-A sont sous l'influence de l'activité de la MLCK, donc de la contraction du cytosquelette des cellules épithéliales en réponse au stress de séparation. Ces données conforteraient l'hypothèse d'une réponse de protection dans l'intestin grêle au défaut marqué de perméabilité épithéliale dans le côlon. Dans le côlon des mêmes animaux, il est par contre important de noter que les effets transcriptionnels du stress de séparation ne sont pas bloqués par l'agent ML7. A ce stade de l'étude, seule l'hypothèse peut être avancée d'un effet différentiel du stress dans le côlon, s'exerçant d'une part, sur la contraction du cytosquelette cellulaire (i.e. MLCK-dépendant) et d'autre part, sur le niveau d'expression des protéines de jonctions serrées (i.e. MLCK-indépendant).

Par ailleurs, il a aussi été montré sur une lignée cellulaire de Caco 2 que la MLCK induisait des effets rapides et réversibles sur l'organisation de l'occludine, mais non sur sa synthèse ou sa dégradation (Shen *et al.*, 2006). Chez les nouveau-nés exposés à la SM, il serait intéressant d'analyser par immunohistochimie l'organisation des protéines transmembranaires des jonctions serrées dans l'iléon en comparaison du côlon, en présence et en l'absence de ML7, pour déterminer une éventuelle réorganisation de ces structures protéiques en réponse au stress.

A Iléon



B Côlon

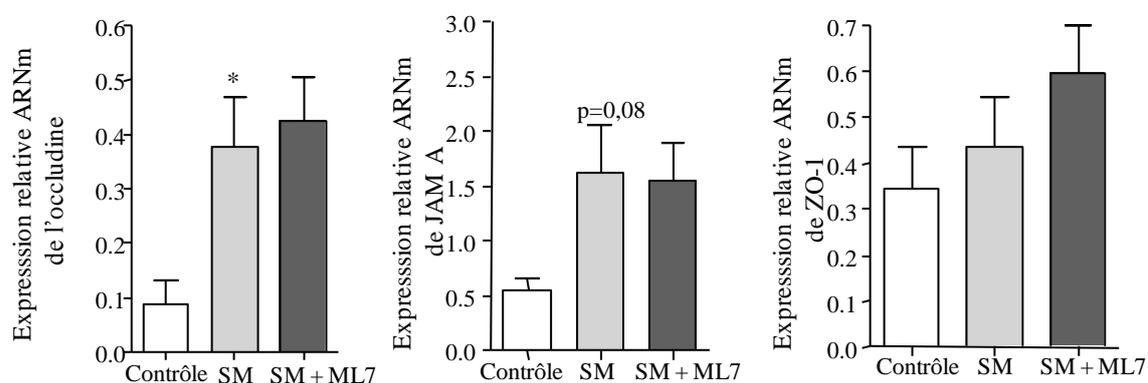


Figure 33 Effets de la séparation maternelle sur l'expression des ARNm des jonctions serrées dans l'iléon et le côlon.

Le niveau d'expression des ARN de protéines de jonctions serrées a été déterminé par RT-qPCR dans l'iléon et le côlon de rats femelles de 10 jours immédiatement après la séparation maternelle de 4 heures, en présence ou en l'absence (NaCl 0.9%) de ML7 (1mg/kg dans une solution de NaCl 0.9%). SM : séparation maternelle ; * $p < 0,05$ par rapport au contrôle, Test de Student (5-8 animaux par groupe).

1.2 Stress et corticostéronémie chez le nouveau-né : impacts sur l'intégrité épithéliale

Concernant les acteurs de la perte d'intégrité épithéliale chez le nouveau-né de 10 jours, nous avons mis en évidence que la libération de corticostérone en réponse au stress de SM était responsable de l'augmentation de la perméabilité totale au FD4. Une cinétique a permis d'établir que la corticostéronémie augmentait dès la fin de l'épisode de SM, pour revenir au niveau basal une fois le raton remis à la mère. Ces résultats confirment le rôle important joué par la présence maternelle dans la régulation des fonctions de l'axe HPA du nouveau-né (Levine *et al.*, 2001 ; O'Mahony *et al.*, 2011) et que le rétrocontrôle négatif

exercé par la corticostérone sur l'hippocampe est fonctionnel pour rétablir à la basale les niveaux de GC plasmatiques. Les perturbations de l'axe corticotrope ont été décrites comme un élément majeur dans les altérations de la barrière intestinale lorsque la SM est appliquée de manière chronique (Barreau *et al.*, 2007 b, Gareau *et al.*, 2008). De manière intéressante, il a été montré que selon la durée de privation maternelle, les effets sur l'axe HPA étaient différents. En effet, le rétrocontrôle exercé par la corticostérone sur l'hippocampe est augmenté chez les rats séparés durant 15 minutes alors qu'au contraire il est diminué lorsque la SM s'étend sur 3 heures et est répétée 14 jours. Les réponses accrues en ACTH et en corticostérone après un stress seraient liées à une diminution des GR dans l'hippocampe et à une augmentation de la quantité d'ARNm du CRF dans l'hypothalamus (Daugé *et al.*, 2003).

Chez le rat, les GC ont été identifiés comme médiateur du stress sur la perméabilité intestinale après exposition directe à l'âge adulte à un stress aigu, ou encore chronique (Meddings et Swain, 2000 ; Zheng *et al.*, 2013). Dans notre étude, la perméabilité intestinale élevée après un seul épisode de SM chez le rat de 10 jours est la conséquence de l'activation de la MLCK, car bloquée par l'agent ML7, mais aucune donnée dans la littérature n'a établi de relation causale avec les GC sécrétés dans la circulation sanguine. Il serait donc intéressant d'étudier l'activité de la MLCK et l'état de phosphorylation de la MLC au cours et après l'épisode de SM, en présence ou en l'absence de RU486, utilisé comme antagoniste des GR. Cette expérience permettrait de confirmer que la contraction des cellules épithéliales résulte bien de la liaison des GC à leurs récepteurs GR (*Figure 34*).

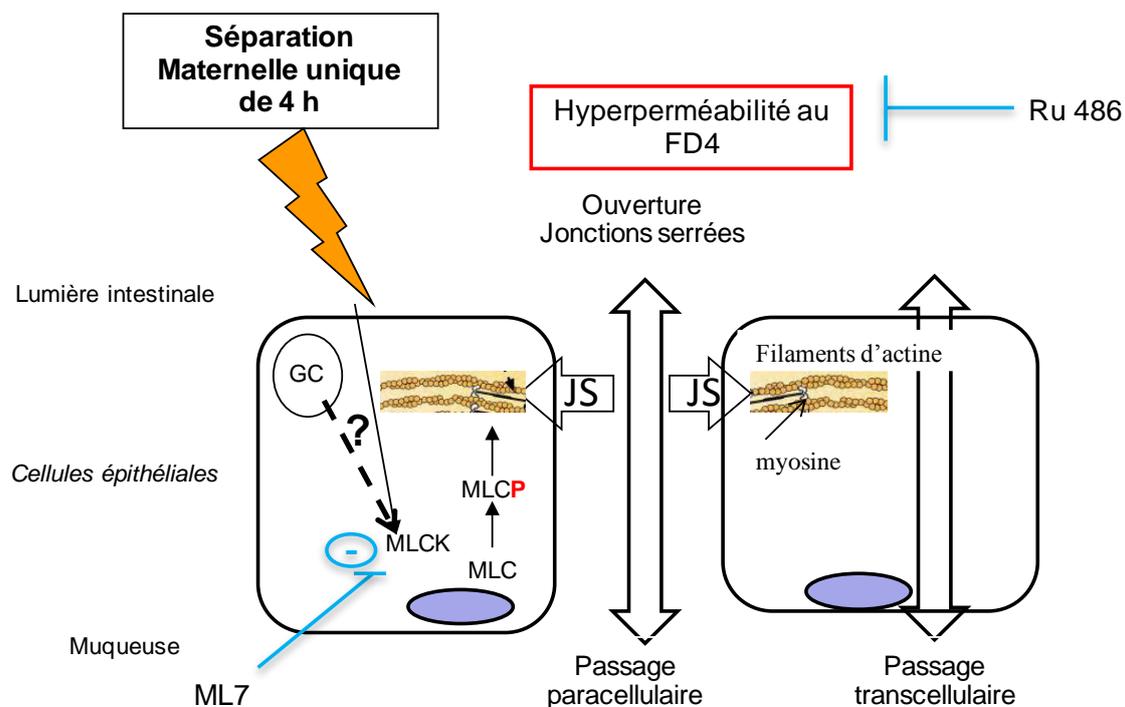


Figure 34 Mécanismes impliqués dans l'augmentation de la perméabilité intestinale au FD4 après un seul épisode de séparation maternelle de 4 heures.

Chez le nouveau-né de 10 jours, les glucocorticoïdes sont responsables de l'augmentation de la perméabilité intestinale au FD4 dans le côlon, traduit par une augmentation du passage de macromolécules via les voies transcellulaire et paracellulaire de l'épithélium. Ces effets sont sous le contrôle de l'enzyme MLCK, provoquant la contraction du cytosquelette d'actine et de myosine des cellules épithéliales. GC : Glucocorticoïdes ; JS : Jonctions serrées ; MLCK : kinase des chaînes légères de myosine MLC : chaîne légère de la myosine ; MLCP : Forme phosphorylée de la chaîne légère de la myosine.

Lorsque le stress est appliqué très tôt dans la vie et est répété pendant 14 jours (SM chronique), les niveaux de corticostérone restent augmentés jusqu'à l'âge adulte, mais l'administration à cet âge de RU486, ne rétablit pas une perméabilité intestinale normale (Barreau *et al.*, 2007a). Dans ces conditions, il est suggéré que la SM chronique s'accompagne d'une « empreinte » sur la barrière épithéliale, s'établissant très tôt dans la vie en période de stress, mais dont les conséquences à l'âge adulte ne sont plus le reflet de l'action des GC directement sur l'intestin, malgré la corticostéronémie maintenue plus élevée que chez les animaux contrôles. Les mécanismes impliqués dans les altérations de la perméabilité intestinale chez le rat adulte suite à une SM chronique restent inconnus. Seule une étude a montré que l'administration d'un antagoniste aux récepteurs au CRF chez le rat de 20 jours bloquait l'augmentation de la perméabilité aux macromolécules comme celle observée chez le rat au même âge et préalablement exposé à la SM chronique (Gareau *et al.*, 2006). D'après ces auteurs, le CRF serait un acteur clé dans le développement des altérations de la perméabilité observées à l'âge adulte chez le rat soumis à une SM chronique. De manière intéressante, notre étude a mis en évidence qu'un seul épisode de

SM de 4 heures chez le nouveau-né de 10 jours apparaît suffisante pour installer une altération de la perméabilité liée à l'action des GC et que cet effet disparaît 10 jours plus tard lorsque le même protocole est appliqué, juste avant le sevrage. Pour vérifier si les GC participent tout comme le CRF à l'altération prolongée de la perméabilité chez l'adulte néostressé, nous pourrions envisager un traitement au RU486 durant la première semaine de SM chronique et vérifier si le niveau de perméabilité intestinale reste affecté plus tard chez l'adulte.

Le stress de SM induit également une augmentation de la perméabilité transcellulaire colique chez le rat nouveau-né. Afin de déterminer si les GC sont également responsables de ce passage exacerbé, nous pourrions étudier en chambre de Ussing la perméabilité colique à la HRP chez des rats exposés à la SM de 4 heures et ayant reçu un prétraitement au RU486. Le peu de donnée dans la littérature sur la régulation de la voie transcellulaire ne concerne que le stade adulte. Cependant, les mécanismes expliquant la modulation de cette voie par le stress sont controversés et moins documentés que ceux concernant la voie paracellulaire. En effet, il semblerait qu'à l'âge adulte le récepteur au CRF de type 2 soit impliqué dans l'augmentation de la perméabilité à la macromolécule HRP évaluée *ex vivo* (Teitelbaum *et al.*, 2008), alors qu'une autre étude montre que c'est l'implication du récepteur au CRF de type 1 qui est responsable de l'augmentation de perméabilité transcellulaire au niveau du côlon (Larauche *et al.*, 2009).

1.3 Une régionalisation dans l'effet du stress de séparation maternelle : rôle des GR et de la sensibilité aux glucocorticoïdes

Nous avons montré dans notre étude que le côlon était affecté d'une augmentation significative de perméabilité aux macromolécules, jusqu'à 44KDa, contrairement à l'iléon qui ne présentait pas d'altération dès 4KDa. Comme souligné précédemment, l'augmentation de la perméabilité intestinale *in vivo* est liée à l'action des GC, suggérant que la différence d'effet entre les deux régions était liée soit à une meilleure bioaccessibilité des corticoïdes aux GR exprimés dans le côlon, soit à une différence d'expression de GR entre les deux régions de l'intestin.

Pour la première hypothèse, de précédents travaux ont montré que la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD), qui permet la conversion de la corticostérone de la forme active en forme inactive, présentait une activité différente selon l'âge et la région de l'intestin. Ainsi, durant les deux premières semaines de vie chez le rat, l'activité

de la 11 β -HSD est plus élevée dans le côlon par rapport à l'iléon. De plus dans l'iléon, l'activité de cette enzyme augmente considérablement au cours de la troisième semaine, pour atteindre un pic d'activité au bout d'un mois, puis diminue rapidement vers un niveau stable tel qu'observé chez l'adulte. En revanche, dans le côlon, l'activité de cette enzyme est très peu modifiée au cours du développement et reste élevée jusqu'à l'âge adulte (Pacha et Miksik, 1996). De prime abord, ces données ne s'accordent pas avec nos observations d'un effet marqué des corticoïdes sur la perméabilité épithéliale dans le côlon seul, quand la forte activité 11 β -HSD dans ce segment devrait au contraire bloquer les conséquences de la SM. Au cours de la lactation, les GC participent non seulement au développement structural de l'intestin (Chen *et al.*, 2011), mais aussi à la maturation des activités enzymatiques, en favorisant l'activité de la sucrase, de la maltase et de la peptidase (Henning *et al.*, 1975), ou encore de la phosphatase alcaline et de la Na⁺K⁺ATPase (Pacha *et al.*, 2003). Cependant, au cours de cette période de maturation fonctionnelle et morphologique, les relations entre l'action périphérique des GC et l'activité régionale de la 11 β -HSD restent peu documentées et contradictoires. Par exemple, si l'inhibition de la 11 β -HSD par le carbénoxolone (donné à 8 ou 14 jours de vie et pendant 10 jours) stimule la croissance de l'intestin grêle et du côlon, probablement en libérant l'action des corticoïdes circulants, ce même traitement ne modifie pas l'activité de la phosphatase alcaline ni de la sucrase, quelle que soit la région de l'intestin, alors qu'elles sont montrées sous contrôle des corticoïdes (Pacha *et al.*, 2003). Ces auteurs ont par ailleurs rapporté que si l'inhibition de la 11 β -HSD affectait l'activité de la Na⁺ K⁺ ATPase dans le côlon, aucun effet sur cette dernière n'était relevé dans le grêle. Dans un tel contexte, il est donc difficile de discuter l'influence de l'activité 11 β -HSD sur la perméabilité intestinale induite par les GC sans données précises sur l'expression de cette enzyme le long du tube digestif autour de 10 jours de vie. Une hypothèse serait que l'effet marqué des GC sur l'épithélium du côlon des nouveau-nés stressés dans cette période pourrait résulter d'une faible expression basale de l'enzyme 11 β -HSD dans le gros intestin, insuffisante (malgré une activité élevée) pour bloquer l'activité des corticoïdes sur leurs récepteurs épithéliaux en conditions de SM.

Concernant l'expression locale des GR chez le nouveau-né de 10 jours, nos données de qPCR ont conclu qu'il n'y avait pas de différence significative dans l'expression d'ARN pour ces récepteurs entre l'iléon et le côlon. Même si la mesure de l'expression protéique de GR reste nécessaire pour conclure sur ce point, on peut toutefois émettre l'hypothèse

(pour expliquer les différences régionales constatées en Ussing dans les effets du stress) qu'à expression égale des GR, les niveaux de transduction du signal dans les cellules épithéliales du côlon soient plus efficaces que dans l'iléon. Cette hypothèse s'accorderait bien avec l'effet dose-réponse marqué de la DEX sur la perméabilité totale au FD4 chez le raton de 10 jours et mimant l'effet de la privation maternelle. De façon intéressante, il a été montré que l'exposition à un stress psychologique chronique chez l'adulte était associée à une augmentation de perméabilité localisée de manière spécifique au niveau du côlon (Zheng *al.*, 2013). Ces données sont en faveur d'une régionalisation marquée de la sensibilité intestinale aux corticoïdes le long de l'intestin qui persiste au cours de la vie. En conclusion, si le côlon chez le rat de 10 jours apparaît très sensible (malgré une forte activité 11 β -HSD) tant aux modifications morphologiques induites par les GC (Chen *et al.*, 2011) qu'aux effets du stress sur sa perméabilité (notre étude), une forte expression de GR combinée à une signalisation intracellulaire plus efficace spécifiquement dans le côlon pourraient justifier d'une hypersensibilité âge- et région-dépendante aux corticoïdes. La différence avec l'iléon autorise l'idée que la sensibilité exacerbée du côlon aux GC serait responsable d'un développement structurel rapide pour acquérir une fonction de barrière efficace face aux bactéries accumulées dans cette région, alors que dans l'iléon les GC seraient plutôt impliqués la maturation des fonctions enzymatiques nécessaires aux fonctions digestives (Henning *et al.*, 1975).

La sensibilité aux GC selon l'âge de l'animal est donc une notion clé supportant la différence d'effet de la SM entre le rat de 10 jours et celui de 20 jours. Nous avons observé 4 heures après la SM une augmentation significative du niveau de GC plasmatique, quelle que soit la période étudiée, alors que la perméabilité intestinale au FD4 n'était modifiée que chez le rat de 10 jours. Comme souligné ci-dessus, ces données ont suggéré que l'absence d'effet de la SM sur la perméabilité intestinale à 20 jours de vie était liée à une différence de sensibilité des GR dans l'intestin en comparaison des animaux plus jeunes. Pour le confirmer, nous avons comparé aux deux âges l'effet dose-réponse pour l'agoniste DEX sur la perméabilité intestinale *in vivo* au FD4. Les résultats montrent une plus grande efficacité des GR à augmenter la perméabilité intestinale à 10 jours par rapport à 20 jours. En effet, l'augmentation de la perméabilité à 20 jours n'est observée qu'à partir de la dose de 1 mg/kg, alors que la perméabilité est augmentée à 10 jours dès 50 μ g/kg de Dex, avec un ED50 de 0,1 mg/kg et un effet maximal à 0,5 mg/kg. En conditions physiologiques, la sensibilité de l'intestin du rat nouveau-né aux GC est corrélée à l'état de maturité de

l'épithélium intestinal (Chen *et al.*, 2011). La comparaison de l'expression des ARNm codant pour les GR dans l'intestin entre le 10^{ième} et le 20^{ième} jour de vie a révélé une diminution significative de leur expression dans le côlon chez le rat le plus âgé. Cette forte sensibilité aux GC observée dans l'intestin à 10 jours de vie serait donc liée à une surexpression de GR dans le côlon en comparaison du 20^{ième} jour, en plus d'une efficacité plus importante de transduction du signal au sein de l'épithélium colique. Par ailleurs, lors du dosage de la corticostéronémie, nous avons constaté que la concentration basale chez le rat de 20 jours était 2 fois plus élevée par rapport à celui de 10 jours. Or il est décrit qu'une corticostéronémie élevée peut stimuler l'expression d'un facteur de répression qui régulerait à la baisse l'expression des GR (LeClerc *et al.*, 1991). Ainsi, il peut être envisagé que l'augmentation stress-dépendante des GC plasmatiques, déjà élevés en conditions basales chez le rat de 20 jours, favoriserait la sous-expression des GR dans le côlon, limitant ainsi les effets de la SM sur l'intégrité de la barrière épithéliale.

La période de sensibilité aux GC chez l'homme apparaît dès la 20^{ième} semaine de gestation (Nanthakumar *et al.*, 2003, 2005), une propriété vérifiée lorsqu'un traitement anténatal aux GC diminue la perméabilité de l'intestin (Shulman *et al.*, 1998). La thérapie anténatale aux GC est classiquement utilisée comme traitement chez le prématuré pour favoriser la maturation pulmonaire, avec aussi un gain manifeste sur le développement des fonctions intestinales très immatures lorsque l'âge gestationnel est inférieur à 32 semaines. Cependant, concernant ce dernier point, une méta-analyse a aussi montré que des doses élevées de DEX chez un prématuré de faible poids de naissance était associée à un risque de perforation de l'intestin (Gordon *et al.*, 1999). Depuis ce constat, d'autres travaux chez des nouveau-nés à faible poids de naissance ont évalué l'effet « dose » (0.15 à 0.02 mg/kg/jour) et « chronicité » d'administration de la DEX (e.g. dose forte 24 heures après la naissance puis doses faibles pendant 10 jours). Cependant, même à ces doses modérées, le pourcentage d'enfants atteints de perforation intestinale deux semaines après le traitement s'avérait toujours plus important que chez les enfants ayant reçu le placebo (Stark *et al.*, 2001). Chez le rat de 10 jours, il est intéressant de souligner qu'une dose de 0.1 mg/kg correspondait à la dose pour laquelle été observé 50% d'augmentation de la perméabilité intestinale (i.e. ED50). La sensibilité intestinale aux corticoïdes liée à l'âge de naissance apparaît ainsi comme facteur limitant chez le prématuré dans le résultat du traitement postnatal à la DEX, en conditionnant la balance « bénéfice-risque » sur la barrière intestinale en développement.

II Séparation maternelle et intestin immature : risque associé d'inflammation et/ou d'infection

Dans notre étude chez le rat, nous avons montré que l'évolution de la perméabilité totale au FD4 mesurée au cours du développement était comparable à celle observée chez d'autres mammifères, comme chez le lapin et la souris (Udall *et al.*, 1981 ; Patel *et al.*, 2012). Cependant chez la souris, la perméabilité est diminuée de 4 fois entre la deuxième et la troisième semaine, alors que chez le rat la barrière épithéliale continue sa maturation jusqu'au 40^{ème} jour, soit après la puberté (pour rappel, 28-33 jours chez le rongeur). Ainsi chez le rat, quelque soit le sexe, la perméabilité intestinale est élevée et sans différence significative entre le 10^{ème} et 20^{ème} jour de vie néonatale, et approximativement 10 fois plus importante en comparaison de l'adulte (i.e. à 50 jours).

Dans cette espèce, cette perméabilité « permissive » devient un bon modèle expérimental pour apprécier l'état de fragilité de la barrière épithéliale chez le nouveau-né et le risque associé d'infection, d'inflammation face à divers facteurs de stress environnementaux. Par exemple, dans un autre modèle expérimental utilisant le porc âgé de trois semaines, les auteurs ont analysé l'effet d'une oxygénation extracorporelle par oxygénateur à membrane, utilisé en cas d'insuffisance respiratoire sévère chez le nouveau-né (Kurundkar *et al.*, 2010). Cette étude a utilisé le FD4 comme marqueur de la voie paracellulaire et a décrit une augmentation rapide de la perméabilité à ce marqueur, associée à une activation de la MLCK et d'une translocation bactérienne (Kurundkar *et al.*, 2010). Cette étude reflète la vulnérabilité du nouveau-né à développer une infection systémique suite à une perte d'intégrité de barrière intestinale, mais face dans cette étude à un acte particulièrement invasif, telle que l'oxygénation extracorporelle. En comparaison dans notre modèle, un seul épisode de SM s'est avéré suffisant pour altérer profondément l'intégrité de l'épithélium intestinal chez le rat de 10 jours, une conséquence absente si l'épisode de SM est appliqué 10 jours plus tard, malgré une perméabilité basale toujours importante. Le fait que le nouveau-né de 10 jours apparaisse très sensible à une intervention non invasive s'accorde bien avec les observations de Yajima et al en 2001 chez la même espèce, montrant que le seul geste de cannulation intra-gastrique, mimant l'apport d'aliments artificiel chez le nouveau-né, était suffisant pour s'accompagner d'un passage exacerbé de bactéries vers le foie (Yajima *et al.*, 2001).

Cette observation est donc à relier à notre précédente démonstration d'une hypersensibilité aux GC durant cette période de vie, lorsque la corticostéronémie provoquée par la SM suffit à provoquer le passage de macromolécules de haut poids moléculaire. Pour rappel chez l'homme, dans un modèle de xéno greffe, la période de sensibilité critique aux GC dans l'intestin a été rapportée autour de 20 semaines de grossesse et s'amenuisant vers 30 semaines, correspondant à la période de développement structurel et fonctionnel de l'appareil digestif pour l'homme (Nanthakumar *et al.*, 2003, 2005). Dans le cas d'une naissance prématurée dans cette période, nous allons discuter l'idée qu'un stress de privation maternelle de relative courte durée puisse avoir des conséquences équivalentes sur la barrière épithéliale à celles décrites dans notre modèle animal (i.e. rat de 10 jours).

2.1 Risque inflammatoire de la muqueuse intestinale

Chez le grand prématuré (i.e. âge gestationnel compris entre 22 (très grande prématurité) et 32 semaines de grossesse), l'immaturation de l'intestin et du système immunitaire associé à la muqueuse sont reconnus comme facteurs de risques de développer une entérocolite nécrosante (NEC) entre autres risques. D'étiologie multifactorielle (hypoxie-ischémie, alimentation, agents infectieux), la NEC est associée à une translocation bactérienne et une réponse inflammatoire (Petrosyan *et al.*, 2009). En 2006, une méta-analyse incluant 21 études cliniques a mis en évidence une réduction de l'apparition de NEC lorsque l'enfant prématuré avait reçu un traitement anténatal aux GC (Roberts *et al.*, 2006). Cependant, comme nous avons pu l'observer dans la partie 1.3, le traitement au GC chez l'enfant prématuré est en discussion compte tenu des risques de perforation de l'intestin qu'il peut engendrer.

Chez le rat nouveau-né, nous avons exploré l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale dans les régions iléale et colique en réponse au stress de SM. Pour ce faire, la mesure de l'activité de l'enzyme myélopéroxydase (MPO), utilisée pour estimer le niveau d'infiltration neutrophilaire, a été combinée au dosage des cytokines proinflammatoires IL1 β et TNF α . Les résultats montrent qu'un épisode de SM unique à 10 jours ne s'accompagne pas d'une augmentation de l'activité de l'enzyme MPO (*Figure 35*), ni des deux cytokines pro-inflammatoires (*Figure 36*), suggérant l'absence d'inflammation de la muqueuse, au moins dans les conditions de 4 heures de privation maternelle.

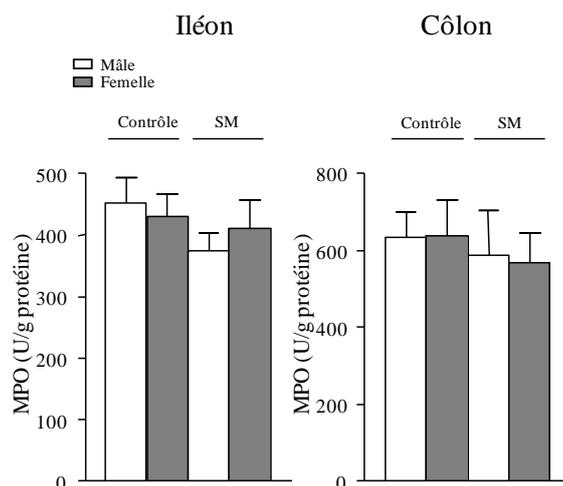
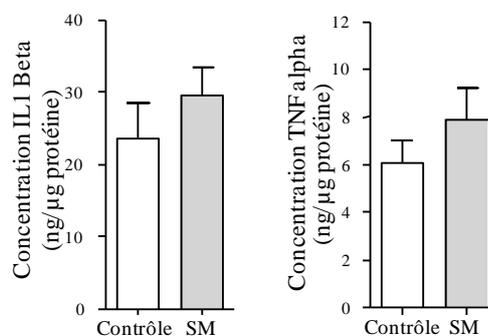


Figure 35 L'activité de la myéloperoxydase dans le côlon et l'iléon n'est pas modifiée par un épisode unique de séparation maternelle chez le rat de 10 jours.

Le dosage de la MPO a été réalisé dans l'iléon et le côlon prélevés immédiatement après la SM de 4h chez les rats mâles et femelles de 10 jours. Les données présentées sur les graphiques sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=8 par groupe).

A Iléon



B Côlon

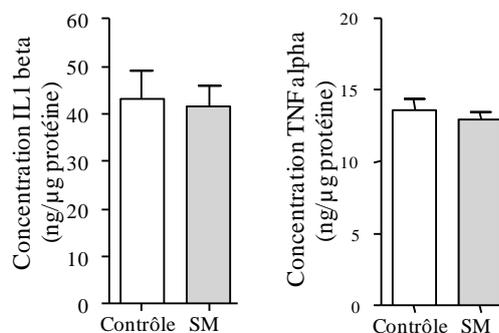


Figure 36 La séparation maternelle de 4 heures ne modifie pas la concentration des cytokines pro inflammatoires IL1 β et TNF α dans l'iléon et le côlon du rat femelle.

Le dosage des cytokines IL1Beta et TNFalpha a été réalisé dans l'iléon et le côlon prélevés immédiatement après la SM de 4h chez la rate de 10 jours. Les données présentées représentent la moyenne \pm SEM (n=6-9 par groupe).

Il est bien admis chez le rat nouveau-né comme chez la souris que les réponses immunitaires des lymphocytes T et B sont faibles à la naissance (Adkins *et al.*, 1999 ; Perez-Cano *et al.*, 2012), la fonctionnalité des réponses immunitaires n'étant pas encore totalement acquise en période de lactation (Perez-Cano *et al.*, 2012). De précédents travaux au laboratoire ont par ailleurs montré que des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α et IL1 β étaient mesurables à l'état basal dans le côlon du nouveau-né de 10 jours, mais très en-deçà du niveau basal atteint chez l'adulte (Braniste *et al.* ; travaux non publiés). Si, malgré tout, ces données montrent que le raton à un âge précoce présente tous les acteurs pour élaborer une réponse inflammatoire, nos résultats concluent qu'un stress de quelques heures de SM ne déclenche aucune réponse immunitaire de cet ordre dans les muqueuses intestinales, malgré la perte marquée d'intégrité de l'épithélium dans le côlon. A ce stade des observations, il serait intéressant de réaliser une cinétique d'effet de la SM de 4h, lorsqu'elle est répétée une fois tous les jours dès la première semaine de vie, pour déterminer à quel moment une réponse inflammatoire, même minime, est susceptible de se mettre en place chez le nouveau-né. Si l'hyperperméabilité intestinale résultante d'un tel protocole (donc maintenue constante du fait de la répétition de la SM) est associée à un terrain micro inflammatoire, ces conditions pourraient contribuer à l'augmentation du nombre de mastocytes dans le côlon démontrée chez le rat adulte « néostressé » (Barreau *et al.*, 2004b). Ainsi, des protéases (Cenac *et al.*, 2002) et certaines cytokines (Berin *et al.*, 1999) sécrétées à « bas bruit » par les mastocytes pourraient contribuer à maintenir une perméabilité intestinale élevée chez ces animaux, longtemps après la fin du stress néonatal de SM.

2.2 Risque d'infection systémique

Dans notre étude, 24 heures après la SM, nous avons analysé chez les rats de 10 et 20 jours l'incidence de translocation bactérienne, c'est-à-dire le nombre d'animaux positifs pour la présence de bactéries viables (par organe ou tissu d'intérêt) sur le nombre total étudié, et en parallèle déterminé la concentration en colonies (i.e. log UFC par organe) en utilisant la méthode traditionnelle de culture sur des milieux non sélectifs (limite de détection à 30 UFC).

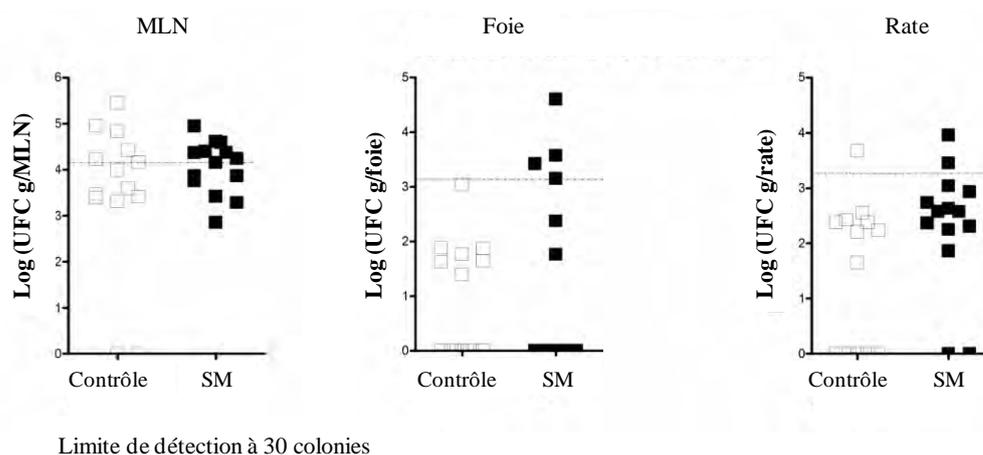
Chez le rat de 10 jours, la SM de 4h ne s'accompagne pas d'un passage de bactéries vers les ganglions mésentériques lymphatiques, déjà positifs chez les témoins quelque soit le sexe. Ces premières observations étaient en accord avec les données de Yajima *et al.* en

2001 qui décrivent ce phénomène comme spontané durant la période néonatale précoce. De plus la charge bactérienne n'a pas été affectée par la SM unique, ce qui sous-entend que cette translocation était déjà maximale en conditions basales et non modifiée par le stress. Plusieurs travaux ont déjà admis pour d'autres facteurs de stress néonatal, à l'exemple de l'hypoxie, ne modifiait pas la fréquence de translocation bactérienne basale vers les ganglions mésentériques (Yajima *et al.*, 2001 ; Urao *et al.*, 1996). Cette translocation physiologique est maximale au 7^{ième} jour de vie chez le raton, pour diminuer avec l'âge et ne plus être détectable à la 5^{ième} semaine (Yajima *et al.*, 2001). Un tel passage bactérien est contemporain à la colonisation bactérienne de l'intestin et de l'installation des grands phylas, permettant de stimuler le développement des fonctions immunitaires (Perez-Cano *et al.*, 2012). A l'inverse, si le foie et la rate sont dépourvus de bactéries en conditions basales, confirmant les données de la littérature (Yajima *et al.*, 2001), le même épisode de SM s'est accompagné d'une translocation de bactéries viables vers ces organes. Une souche bactérienne identifiée dans le foie correspond à *Stenotrophomonas maltophilia*, une bactérie de la flore intestinale du rat, soulignant ici un passage bactérien d'origine endogène. Bien que cette bactérie soit de type aérobie comme la plupart des bactéries constitutives du microbiote chez le rat de 10 jours, elle reste néanmoins minoritaire. En effet, comme souligné par Yajima *et al.* (2001), la translocation bactérienne sera fonction de la capacité que présente la bactérie à transloquer plutôt que de sa quantité au sein du microbiote (Yajima *et al.*, 2001).

Par rapport à l'homme, un tel passage systémique souligne la possibilité d'un risque réel pour le nouveau-né séparé de sa mère de développer une infection systémique si un microorganisme opportuniste, potentiellement pathogène, venait à se présenter au niveau de la lumière intestinale et de l'épithélium. Afin d'explorer cette hypothèse à partir de notre modèle animal, nous avons administré à des rats de 10 jours une souche d'*Escherichia coli* pathogène extra-intestinale (ExPEC). Une ExPEC a été choisie pour sa capacité à coloniser d'autres systèmes en dehors de la sphère intestinale. Elle peut être en effet responsable d'infections du tractus urinaire (cystites et pyélonéphrites), de la cavité abdominale (péritonite), de la pneumonie nosocomiale, de sepsis et aussi de méningites chez le nouveau-né (Johnson et Russo, 2002). La souche utilisée dans notre modèle (Sp15) a été isolée d'une méningite néonatale et présente, compte tenu de ses facteurs de virulence, la faculté entre autre de transloquer vers les organes systémiques (Johnson *et al.*, 2003). Au laboratoire, il a été démontré que cette souche, lorsqu'elle était transmise de la mère au

nouveau-né, était effectivement retrouvée au niveau systémique, mais uniquement au cours des 15 premiers jours de vie et à condition qu'elle ait la faculté de produire une toxine bactérienne, la colibactine.

Pour s'affranchir d'une translocation basale de *E. coli* Sp15 chez nos rats de 10 jours, un gène de virulence (*clbA*), nécessaire à la synthèse de la colibactine, a donc été délété et remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine, nous permettant ainsi de l'isoler et de l'identifier plus facilement au sein des tissus. Après l'administration de 10^9 UFC d'*E. coli*, les rats mâles et femelles de 10 jours ont été exposés à la SM de 4h et le niveau de translocation bactérienne a été analysé 24 heures après que le nouveau-né ait été remis à la mère. Puisqu'aucun dimorphisme sexuel n'a été observé au cours de nos travaux, les données des deux sexes ont été *poolées* et traitées selon les mêmes critères que ceux choisis précédemment (i.e. limite de détection à 30 UFC). Les résultats montrent que la souche exogène ExPEC administrée oralement est présente au niveau des nœuds mésentériques pour plus de la moitié de l'effectif testé, à la fois chez les animaux séparés que chez les contrôles, confirmant une fois de plus que la SM n'a pas d'effet sur la translocation bactérienne physiologique au niveau des ganglions mésentériques à cet âge précoce. Au niveau du foie, nous avons observé une tendance à l'augmentation de la translocation de la souche ExPEC, à la fois en termes de prévalence et de charge bactérienne pour le groupe séparé de la mère et une tendance similaire est apparue au niveau de la rate (*Figure 37*). Afin d'optimiser la sensibilité de détection des bactéries, nous envisageons d'utiliser des outils moléculaires tels que l'analyse de l'ADN bactérien par PCR, pour nous renseigner sur la diversité des bactéries ayant passé la barrière intestinale. De plus, il est envisagé de répéter cette expérience plus tôt dans la vie, comme le suggère l'étude de Birchenough et al. en 2013 où le rat de 2 jours apparaît plus susceptible que celui âgé de 9 jours pour développer une infection systémique après l'exposition à une ExPEC responsable de méningites néonatales (Birchenough *et al.*, 2013).



Limite de détection à 30 colonies

Figure 37 Analyse de la translocation bactérienne après l'administration d' *E.coli* chez le rat de 10 jours exposé à la séparation maternelle de 4 heures.

Les données sont exprimées en UFC par g de tissu testé, SM : séparation maternelle. (n=14 animaux par groupes)

La voie de passage transépithélial supportant la translocation bactérienne en conditions de stress chronique de SM a souvent été discutée. Certains auteurs ont suggéré que la translocation bactérienne systémique était associée à un passage paracellulaire (Barreau *et al.*, 2004b), quand d'autres l'ont attribué essentiellement à la voie transcellulaire (Gareau *et al.*, 2006). De façon intéressante, une étude a montré qu'une infection chez la souris par *Yersinia pseudotuberculosis* provoquait une altération à la fois du passage para- et transcellulaire (Jung *et al.*, 2012). De plus, il a été montré que l'inhibition de la MLCK pouvait prévenir l'augmentation de perméabilité transcellulaire (Barreau *et al.*, 2010), suggérant que la réorganisation des filaments d'actine en conditions de SM pourrait réguler les mécanismes d'endocytose. En utilisant notre modèle expérimental de SM de 4h, il serait intéressant de tester le résultat d'un traitement ML7 sur l'augmentation de perméabilité tant para- que transcellulaire (Figure 38), pour déterminer si l'activation de la MLCK a un impact marqué sur le passage transcellulaire. L'analyse en chambre de Ussing du passage de HRP dans le côlon des rats traités au ML7 après la SM permettrait de vérifier cette hypothèse.

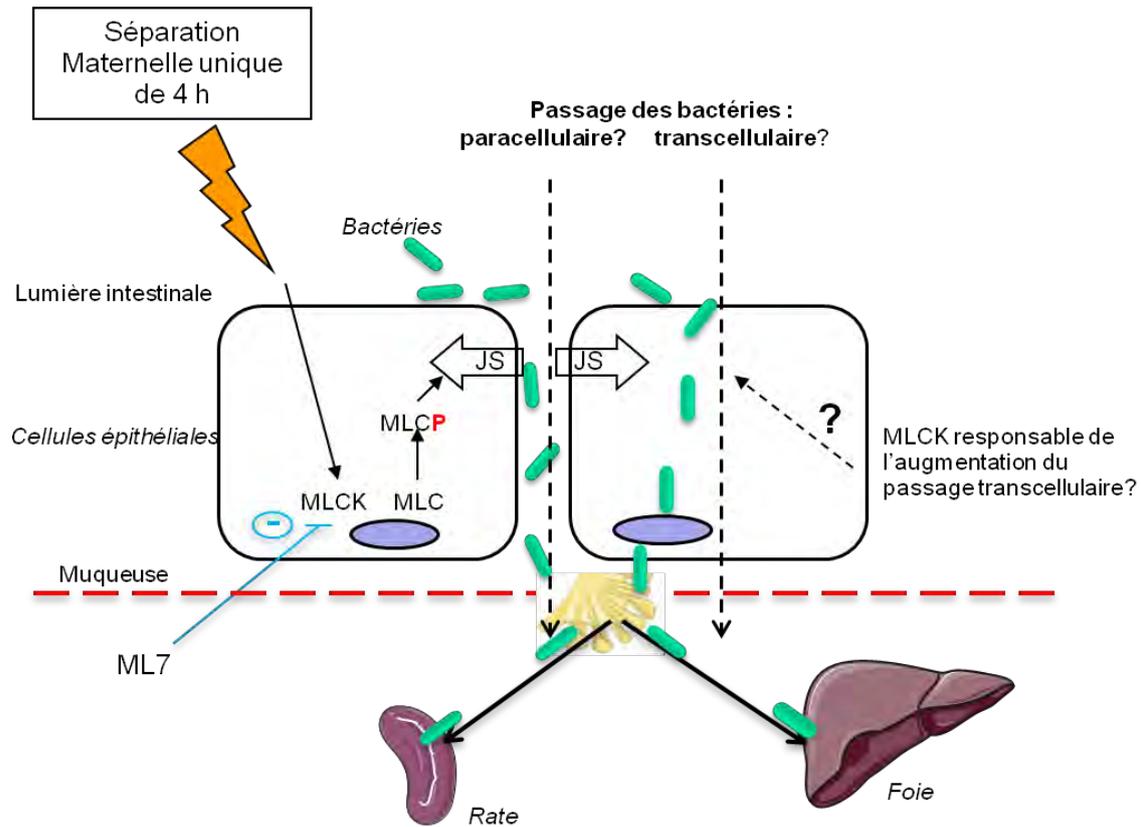


Figure 38 Voies impliquées dans la translocation bactérienne systémique suite à la séparation maternelle.
 La translocation bactérienne peut faire intervenir la voie paracellulaire et la voie transcellulaire. JS : Jonctions serrées ; MLCK : kinase des chaînes légères de myosine MLC : chaîne légère de la myosine. MLCP : Forme phosphorylée de la chaîne légère de la myosine.

Chez l'homme et particulièrement chez l'enfant de faible poids de naissance, les infections nosocomiales sont une cause majeure de mortalité (Stoll *et al.*, 1996). Chez ces enfants, le traitement à la DEX peut s'accompagner d'effets néfastes sur la santé du nouveau-né en termes d'infection systémique, notamment lorsqu'un traitement durant 28 jours dès la naissance était associé à une augmentation de la bactériémie (Yeh *et al.*, 1997). D'autres auteurs ont également rapporté chez ces enfants de faible poids de naissance un risque plus élevé d'infection lorsqu'ils recevaient un traitement de 14 jours à la DEX dès la 2^{ème} semaine de vie (Stoll *et al.*, 1999). L'ensemble de ces observations préconise d'éviter l'utilisation systématique de la thérapie à la Dexaméthasone chez le nouveau-né de faible poids de naissance et de comparer les bénéfices du traitement au risque d'infection.

III Impact d'une séparation maternelle de 4h sur le transcriptome hépatique du rat femelle âgé de 10 jours

En introduction, nous avons vu que le foie et l'intestin entretiennent d'étroites relations incluant des flux de nutriments, de métabolites, d'antigènes, de xénobiotiques et d'acides biliaires notamment. Nous avons également montré qu'alors que la barrière intestinale est en cours de renforcement progressif, les fonctions hépatiques connaissent également une phase de maturation en période post-natale. Enfin, nous avons présenté les quelques études issues de la littérature qui semblent indiquer qu'un lien pourrait exister entre la maturation postnatale des fonctions hépatiques et celle de la barrière intestinale. Ces différents éléments nous ont conduit à envisager que l'altération de la barrière intestinale induite par un stress de séparation maternelle pourrait s'accompagner d'un impact sur le foie.

Afin d'évaluer sans a priori et de manière la plus globale possible la nature des impacts éventuels, nous avons fait le choix de réaliser un criblage du transcriptome hépatique via l'utilisation de microarrays. Après avoir brièvement présenté cette technique, nous présenterons les quelques études disponibles qui décrivent l'évolution du transcriptome hépatique en période périnatale. Ensuite, nous justifierons les choix expérimentaux réalisés, avant de présenter les résultats du criblage transcriptomique. Enfin, nous présenterons les études complémentaires qui nous ont permis de mettre en évidence un impact transitoire sur plusieurs gènes impliqués dans la division cellulaire et de montrer que cet impact est indépendant des effets du stress sur la perméabilité paracellulaire intestinale.

3.1 Analyse du transcriptome par microarray ou puce à ADN

Les microarrays ou puces à ADN permettent de mesurer à haut débit l'abondance de la majeure partie des ARN messagers présents dans un échantillon : ce que l'on appelle le transcriptome (du moins sa partie codante). Dans notre étude, nous avons utilisé la technologie Agilent car la version de l'annotation du génome utilisée pour la fabrication de ces puces était la plus récente disponible à l'époque. Sur une lame de verre des oligonucléotides de 60 bases de long (60-mers) sont synthétisés *in situ* grâce à une technologie apparentée à l'impression jet d'encre. Ces oligonucléotides sont qualifiés de

sondes et chaque sonde, synthétisée en de multiples exemplaires identiques, est positionnée dans une zone bien délimitée du microarray appelé «spot». Les spots sont disposés de manière ordonnée sur la surface du microarray sous forme d'une matrice (ligne x colonne). Chaque sonde est complémentaire d'un ARN issu de la transcription d'un gène du génome du rat. Afin d'étudier le transcriptome des échantillons biologiques (tissus, cellules, etc. *Figure 39*), on commence par extraire les ARNs totaux des échantillons. Ces ARN subissent ensuite une transcription reverse en présence d'un oligodT contenant le promoteur de la T7 ARN polymérase. Les ADNc obtenus servent de matrice à une transcription in vitro réalisée par la T7 ARN polymérase en présence de CTP marqué à la cyanine 3 (Cy3). Les ARN copie, marqués à la Cy3, sont ensuite purifiés, fragmentés, puis hybridés sur les microarrays. Chaque ARN marqué va alors s'hybrider sur l'oligonucléotide qui lui est complémentaire. Après lavage, les microarrays sont lavés et scannés à l'aide d'un scanner de haute résolution. Les images sont analysées et l'intensité des spots est quantifiée. On obtient ainsi une matrice de données contenant des gènes (ou sondes) en ligne et des échantillons en colonne. Ces données vont d'abord subir une série de filtres visant à éliminer les signaux dont les niveaux sont trop proches du bruit de fond. Les données sont ensuite normalisées (normalisation quantile) sur la base de l'hypothèse que la distribution des données ne devrait pas différer d'un échantillon à l'autre. On recherche enfin les gènes différentiellement exprimés entre conditions expérimentales en utilisant des statistiques de Student modérées (package limma de Bioconductor) et en tenant compte de la multiplicité des tests (contrôle du taux de faux positifs ou FDR pour False Discovery Rate). Diverses analyses multidimensionnelles sont également réalisées comme des analyses en composantes principales (ACP) ou des classifications ascendantes hiérarchiques («hierarchical clustering» en anglais). Le protocole détaillé des analyses transcriptomiques qui ont été conduites dans le cadre de mon doctorat est présenté en annexe 1. Dans le cadre de ces analyses, j'ai obtenu les échantillons biologiques, réalisés les extractions et contrôlé la qualité de mes échantillons, puis j'ai participé à la génération des données brutes (marquage et hybridation des échantillons, lavage, scan et analyse d'image des microarrays). L'analyse statistique a été conduite par Pascal Martin.

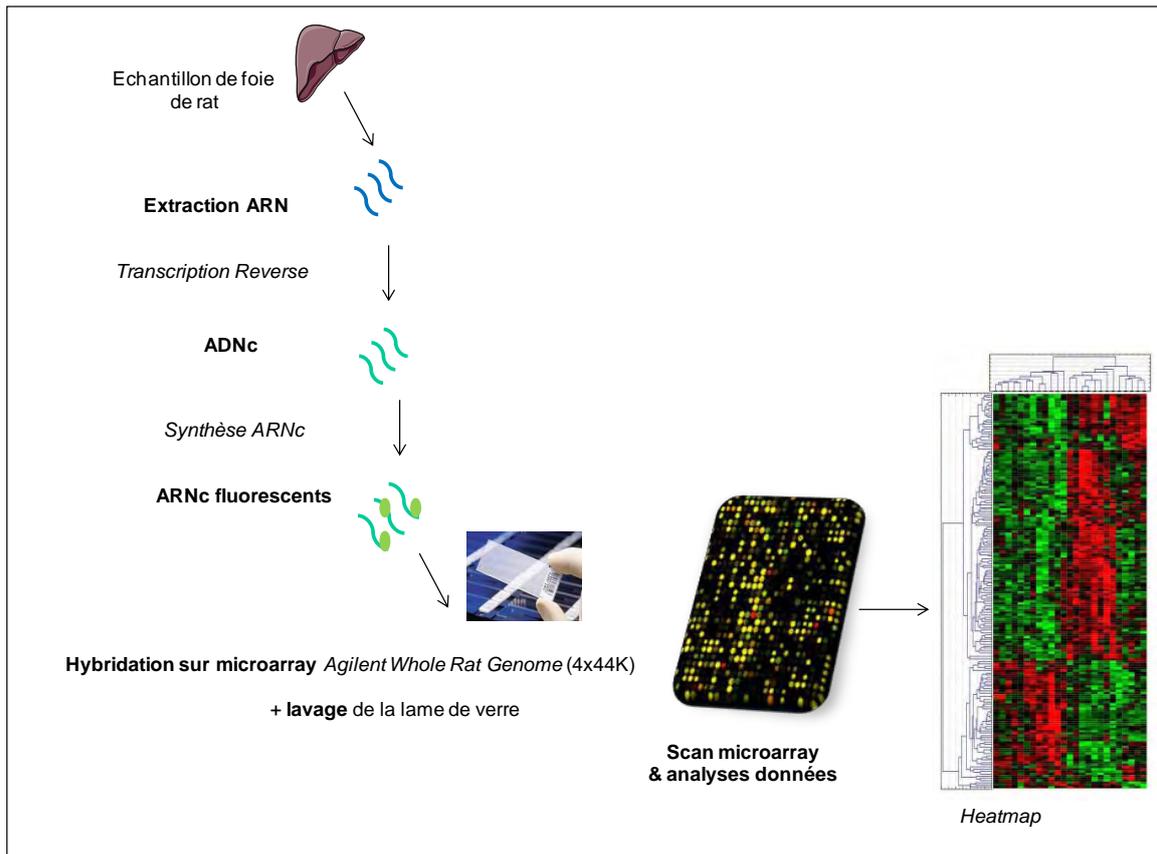


Figure 39 Principe général de l'analyse sur puce à ADN.

L'extraction des ARN du foie vont servir à la synthèse des ADNc. Les ADNc vont permettre de synthétiser des ARNc qui vont incorporer pendant leur synthèse de la cyanine 3 qui est un marqueur fluorescent. L'hybridation des ARNc fluorescents de l'échantillon étudié va être réalisée sur une lame de verre où sont disposées les différentes sondes des transcrits du génome du rat. La puce utilisée correspond à une puce Agilent simple couleur de format 4 packs. Après une étape de lavage, la puce va être scannée. Les images issues de ce scan vont servir à l'analyse des données et permettre d'identifier l'intensité du signal correspondant à chaque spot. L'ensemble des données vont pouvoir être représentée sous forme de Heatmap où l'expression des différents gènes de chaque échantillon testé va être représentée selon un code couleur où le vert va correspondre à une faible intensité, le rouge à une forte intensité et le noir à une intensité moyenne. ADNc: ADN complémentaire ; ARNc : ARN complémentaire

Compte tenu du coût élevé des analyses transcriptomiques, nous n'avons pas pu analyser tous les échantillons disponibles (10 jours, 20 jours, mâle et femelle). Nous avons donc été amenés à faire des choix et à privilégier l'étude de certaines conditions expérimentales. Nous verrons au paragraphe 2.3 que nos observations sur l'intestin ont largement guidé nos choix. Cependant, nous nous sommes également appuyés sur quelques études décrivant l'évolution du transcriptome hépatique en période périnatale chez le rongeur.

3.2 Evolution du transcriptome hépatique en période périnatale chez le rongeur

Les évènements de maturations des fonctions hépatiques ont été étudiés principalement chez la souris dont les outils génétiques sont fortement développés par rapport au modèle du rat. Actuellement, nous ne disposons que de quelques études relatives aux changements transcriptionnels pouvant s'opérer durant le développement post-natal du foie.

L'étude de Li et al. en 2009 a permis d'identifier les principaux changements transcriptionnels s'établissant au niveau du foie entre le stade embryonnaire et l'âge adulte chez la souris (*Figure 40*) (Li *et al.*, 2009). Pour cela, le transcriptome hépatique a été analysé en 14 points comprenant le stade foetal, le jour de naissance, la période de lactation et le stade adulte. L'analyse de l'expression des gènes révèle deux périodes bien distinctes qui correspondent au stade embryonnaire et à la période postnatale où les gènes vont s'exprimer de façon différente. Au cours du stade embryonnaire, une majorité de gènes associés à la division cellulaire vont fortement s'exprimer par rapport aux autres stades du développement. Ces gènes sont associés aux mécanismes de réplication, de transcription, du traitement des ARNm et de leur traduction. De façon intéressante, les auteurs ont constaté que la régulation à la hausse de ces gènes était également observée dans le foie de patients atteints d'hépatocarcinomes. Les gènes liés à la prolifération cellulaire durant la période embryonnaire pourraient donc également jouer un rôle important dans l'apparition de cancer du foie ou être ré-activés dans ces cancers. Par ailleurs, une autre étude réalisée en 2012 par Lee et al. a également observé la surexpression des gènes impliqués dans la division cellulaire au stade embryonnaire (Lee *et al.*, 2012). Parmi ces gènes figurent ceux impliqués dans le contrôle de la réplication et de la réparation des dommages à l'ADN (Lee *et al.*, 2012). Les gènes associés à la régulation et à la transition des phases G1/S et G2/M vont être fortement exprimés. Ces mêmes auteurs décrivent à cette période de

développement une régulation à la baisse de nombreux gènes associés à une autre fonction clé du foie qui correspond à la détoxification et l'élimination des xénobiotiques. En effet, les gènes codant pour les cytochromes P450 de phases I ainsi qu'un grand nombre de gènes codant pour les enzymes de conjugaison de phase II et les transporteurs impliqués dans la phase III sont sous exprimés pendant le stade fœtal (Lee *et al.*, 2012). Cette régulation à la baisse va être observable jusqu'au 7^{ième} jour de vie postnatale.

La période postnatale va présenter un profil d'expression des gènes bien différent de celui observé au stade embryonnaire. En effet, l'étude de Li *et al.* montre une sous-expression des gènes associés à la division cellulaire contrairement aux gènes associés aux propres fonctions du foie qui vont s'exprimer fortement. En effet, le profil d'expression des gènes associés à l'immunité va montrer une hausse d'expression dès le troisième jour de vie. Puis, au 7^{ième} jour, les gènes associés à la fonction de métabolisation des acides gras et des lipides vont être fortement exprimés. Au même moment, l'expression des ARNm des gènes associés au processus de coagulation sanguine vont présenter également une augmentation d'expression (Li *et al.*, 2009). Une seule étude a étudié le transcriptome du rat durant les périodes postnatales comprenant la période de lactation, la puberté, le premier stade adulte jusqu'au stade de vieillissement (Kwekel *et al.*, 2010). L'évolution d'expression des gènes associés aux fonctions de l'immunité, de la détoxification et du métabolisme des lipides va être progressive durant les trois premiers stades postnatals pour ensuite montrer une augmentation d'expression significativement au cours du vieillissement.

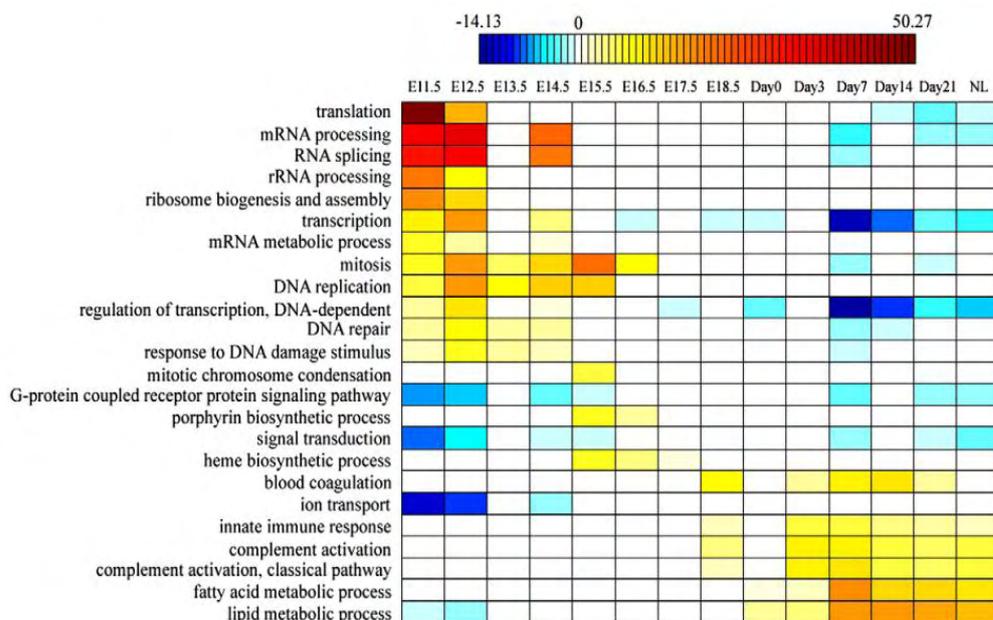


Figure 40 Analyse transcriptomique des gènes impliqués dans les fonctions hépatiques au cours du développement.

Au stade embryonnaire les gènes associés au cycle cellulaire sont fortement exprimés contrairement aux gènes impliqués dans la réponse immunitaire dont l'expression va augmenter que dès la naissance. Les gènes associés aux fonctions métaboliques s'expriment dans les derniers stades de développement. (D'après Li *et al.*, 2009)

Ces études indiquent que la période périnatale constitue une période de changement relativement marquée du transcriptome hépatique. Ces données mais également nos observations sur l'intestin ont servi de base à la définition des conditions expérimentales utilisées pour l'analyse du transcriptome hépatique suite à un stress de séparation maternelle de 4h.

3.3 Justification des choix expérimentaux

Notre première étude a consisté à étudier les effets du stress de séparation maternelle à la fois chez le rat mâle et femelle. Nous avons constaté que quelque soit le paramètre étudié, il n'y avait pas de différence entre le groupe mâle et le groupe femelle. En effet, les mesures de la perméabilité intestinale vis à vis du FD4 et de la HRP, de la corticostéronémie et de la translocation bactérienne ne montrent pas de dimorphisme sexuel. De plus, l'évolution du transcriptome hépatique du rat de 10 jours ne semble pas être différente entre les mâles et les femelles (Kwekel *et al.*, 2010). A l'âge adulte en revanche, un dimorphisme sexuel marqué est observé sur le transcriptome hépatique

(Conforto et Waxman, 2012). Au cours de mon stage de master, j'ai pu évaluer ces différences chez la souris et étudier l'impact d'une délétion du récepteur aux estrogènes α sur ce dimorphisme sexuel du transcriptome hépatique. Le fait que nous disposions de données chez la femelle dans le cadre d'études d'autres stimuli d'intérêt pour l'équipe (exposition au BPA notamment) nous ont conduit à privilégier l'étude des femelles. Les éléments ci-dessus, suggèrent néanmoins que des résultats proches, voire identiques, auraient été obtenus chez le mâle.

Au vu des résultats obtenus lors de la première étude, nous avons constaté que le stress de séparation maternelle de 4 heures induisait une altération transitoire de la barrière intestinale chez le rat de 10 jours accompagnée d'une translocation bactérienne systémique. Cependant, chez le rat de 20 jours ces effets n'étaient pas observables et pouvait s'expliquer par la sensibilité de l'intestin aux glucocorticoïdes qui était plus faible à cet âge là par rapport au rat de 10 jours. Le choix c'est donc naturellement porté sur les animaux de 10 jours. De plus, nous avons observé la présence de bactérie au niveau de foie 24 heures après le stress de séparation maternelle. Nous avons donc choisi d'évaluer le transcriptome hépatique des rats à ce même temps de 24 heures après le début du stress de séparation maternelle.

Les effets du stress de séparation maternelle ont donc été étudiés au niveau du foie chez le rat femelle de 10 jours, 24 heures après la séparation maternelle. Nous avons analysé le transcriptome hépatique de 5 rats stressés et de 4 rats contrôles.

3.4. Impact d'un stress unique de séparation maternelle sur le transcriptome hépatique chez le raton âgé de 10 jours

Le microarray utilisé dans notre étude porte 45220 spots (Agilent Whole rat genome 4x44K v3) dont 966 spots vides. Les fichiers de données brutes contiennent donc des informations sur 44254 spots. Parmi ceux-ci, on dénombre 1377 spots contrôles (contrôles Agilent) dont 153 contrôles négatifs et 618 spots localisés dans les coins des microarrays (utilisés pour l'alignement de la grille). 42877 spots correspondent donc à des oligonucléotides (sondes) ciblant des transcrits de rat. 1390 oligonucléotides sont répliqués à l'identique sur 10 spots distincts au sein de chaque microarray (spots répliqués). Chaque array porte donc 30367 sondes différentes. Certaines sondes ciblent le même

gène/transcrit. En se basant sur l'annotation du génome au jour de l'analyse des données, ce microarray permet de mesurer l'abondance des transcrits issus de 26269 gènes distincts.

L'ensemble des analyses de données ont été conduites par Pascal Martin sous le logiciel R (www.r-project.org) à l'aide de packages Bioconductor (www.bioconductor.org). Après avoir importé les données brutes, les données ont été filtrées pour ne retenir que les valeurs situées nettement au-dessus du bruit de fond sur au moins 4 microarrays d'un groupe expérimental. L'objectif est ici d'éliminer dans la mesure du possible les données correspondant à des gènes qui ne seraient pas exprimés dans le foie. Après transformation des données en logarithme (base 2), une normalisation des données est effectuée par la méthode des quantiles. Elle vise à corriger d'éventuels biais techniques (intensité globalement plus forte dans un échantillon que dans l'autre, présence de zones plus intenses sur un microarray, etc.). Dans le cas de spots répliqués, la médiane des données normalisées est conservée. A l'issue de ces étapes, 17604 sondes uniques sont analysées. L'ensemble des données brutes et des informations sur la production de ces données a été déposé dans la base de données GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) sous l'identifiant GSE44241. Les données sont pour l'instant privées mais seront rendues publiques une fois publiées.

Le package limma de Bioconductor a été utilisé pour détecter les gènes différentiellement exprimés dans le foie des rats ayant été séparés de leur mère par rapport aux rats contrôles. Les p-values brutes issues des tests de Student modérés ont été corrigées par la méthode des q-values (Storey et Tibshirani, 2003) afin de contrôler le taux de faux positif au seuil de 5%.

Cette analyse suggère que le stress de séparation maternelle a eu un impact conséquent sur le transcriptome hépatique car de nombreux gènes présentent un différentiel d'expression entre les rats stressés et les rats contrôles. Nous avons ainsi détecté dans le foie des rats séparés de leur mère une augmentation de l'expression de 596 gènes (979 sondes uniques, qvalue <0,05) et une diminution d'expression de 606 gènes (781 sondes uniques, qvalue <0,05) en comparaison du groupe contrôle. Ces données sont présentées dans un fichier Excel mis à la disposition des membres du jury. Nous avons représenté les variations d'expression mesurées par ces sondes sous la forme d'une heatmap dont les lignes et les colonnes ont été réorganisées par classification ascendante hiérarchique (*Figure 41*). L'impact marqué sur le transcriptome doit cependant être relativisé dans la mesure où un nombre relativement restreint d'individus ont été analysés (n=4 et 5 pour les

groupes contrôle et stressé respectivement) et où l'observation des tableaux de résultats révèle souvent des facteurs de variation de faible ampleur.

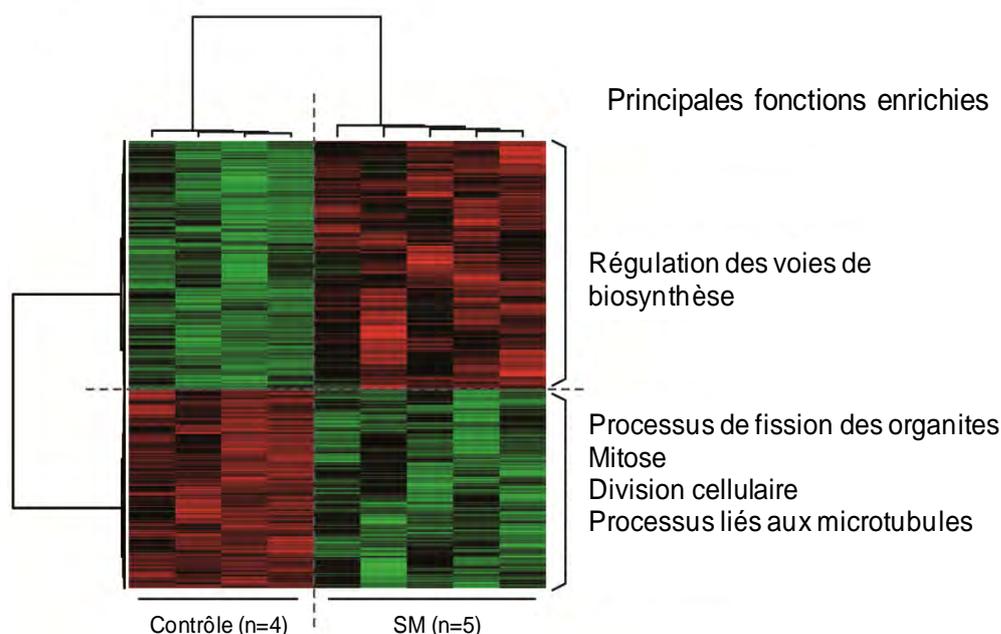


Figure 41 Classification des différents gènes différentiellement exprimés suite à la séparation maternelle de 4 heures et les fonctions associées.

Le transcriptome hépatique des rats femelles de 10 jours exposés ou non à la séparation maternelle a été analysé 24 heures après l'exposition en utilisant la puce à ADN Agilent (4x44k v3). La classification ascendante hiérarchique met en évidence un effet significatif de la séparation maternelle sur l'expression des gènes impliqués dans la régulation des voies de biosynthèse qui sont régulés à la hausse et des gènes associés à la division cellulaire dont l'expression va diminuer.

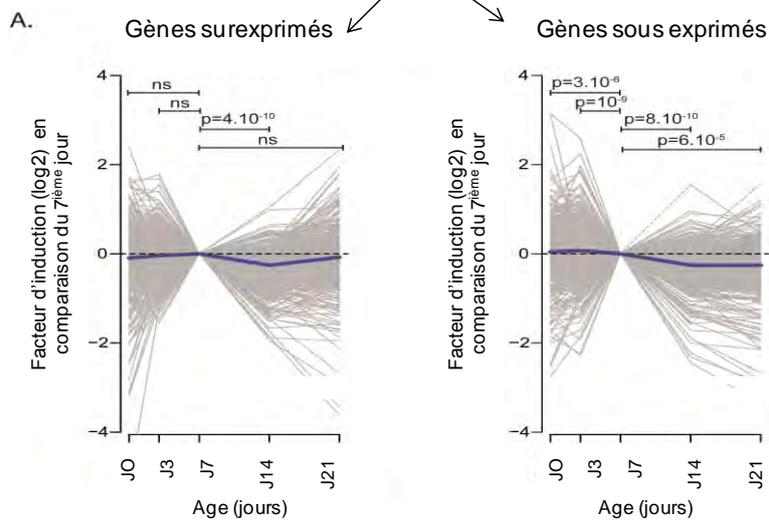
Afin d'apprécier de manière globale les voies biologiques dans lesquelles les gènes différentiellement exprimés sont impliqués, nous avons conduit une analyse d'enrichissement des catégories fonctionnelles issues de Gene Ontology (www.geneontology.org). Ces analyses ont été conduites à l'aide du package GStats de Bioconductor. Gene Ontology regroupe des annotations sur les gènes de différents génomes. Nous nous sommes focalisés ici sur les annotations des gènes concernant leur implication dans des processus biologiques (ontologie « biological processes »). Les résultats de ces analyses sont présentés dans les (Tableaux 1 et 2 de l'Annexe 3) et sont résumées de manière globale dans la Figure 41. Cette analyse d'enrichissement a mis en évidence que les gènes surexprimés (et annotés) sont principalement associés à diverses fonctions assez générales de biosynthèse. En revanche parmi les gènes sous-exprimés suite à la séparation maternelle, nous avons constaté l'enrichissement de plusieurs annotations clairement en lien avec le cycle cellulaire. Plus précisément, les annotations correspondent

aux processus de fission des organites, à la mitose, à la réplication et au compactage de l'ADN, à l'organisation du fuseau mitotique ou encore à la ségrégation des chromosomes. Soulignons cependant que chez le rat de nombreux gènes ne sont pas annotés sur le plan fonctionnel. Les résultats de ces analyses ne tiennent donc pas compte de nombreux gènes dont l'expression semble pourtant modifiée par le stress de séparation maternelle. Ainsi plus de 20% des gènes dont l'expression diminue et plus de 36% des gènes dont l'expression augmente suite au stress de séparation maternelle ne disposaient d'aucune annotation au jour de l'analyse.

Nous avons vu que le transcriptome hépatique est encore dans un processus de maturation autour de 10 jours post-partum (paragraphe 3.2 de la discussion). Nous avons donc souhaité examiner comment se comportent les gènes modulés par la séparation maternelle au cours du développement périnatal du foie. Pour cela, nous avons exploité les données disponibles sur l'évolution du transcriptome au cours de l'ontogénèse du foie. A notre connaissance, aucune donnée n'étant disponible chez le rat nouveau-né, nous avons utilisé les données disponibles chez la souris (Li *et al.*, 2009 ; Lee *et al.*, 2012). Pour chaque gène dont l'expression était modifiée suite à la séparation maternelle, nous avons recherché le gène orthologue chez la souris en utilisant la base de données Ensembl (www.ensembl.org). Seuls les gènes disposant d'un unique orthologue chez la souris ont été retenus, conduisant de fait à écarter de nombreux gènes de cette analyse également. Les données brutes de Li *et al.* (2009) et de Lee *et al.* (2012) ont été téléchargées à partir de la base de données GEO. Ces données, issues de microarray Affymetrix, ont été normalisées à l'aide de la méthode RMA (Irizarry *et al.*, 2003). Les données ont été exprimées en facteur de variation (en log base 2) par rapport au niveau d'expression au jour 7 post-partum, âge le plus proche du jour 10 utilisé dans nos expériences. Pour chacun des deux ensembles de gènes : sur- ou sous-exprimés suite à la séparation maternelle, nous avons représenté les variations d'expression des orthologues murins au cours de l'ontogénèse hépatique (Figure 42). Chaque gène est représenté par un trait gris et le « gène moyen » par un trait bleu plus épais. Afin d'évaluer si les variations d'expression observées pour nos gènes d'intérêt étaient significatives ou reflétaient uniquement une tendance globale du transcriptome, nous avons utilisé des tests exacts de Fisher. Ces tests nous ont permis d'évaluer l'enrichissement en gènes issus de nos listes parmi les gènes dont l'expression augmente ou diminue entre deux âges de mesure. Les p-values de ces tests d'enrichissement sont indiquées sur la Figure 42.

Concernant les gènes dont l'expression est augmentée dans le foie du raton de 10 jours soumis à une séparation maternelle, les gènes orthologues murins n'ont pas montré de tendance nette dans leur niveau d'expression au cours de l'ontogenèse postnatale du foie (*Figure 42*). Certains gènes voient leur expression augmenter, d'autres diminuer, d'autres enfin ne présentent pas de variations et aucune tendance globale ne se dégage. En revanche, pour les gènes dont l'expression est diminuée dans le foie du raton de 10 jours soumis à une séparation maternelle, on observe que leurs orthologues murins présentent une tendance globale à la baisse de leurs niveaux d'expression au cours de l'ontogenèse postnatale du foie. Plusieurs exceptions existent naturellement comme l'illustre la *Figure 42* mais la tendance globale se révèle significative dans les deux études indépendantes de *Li et al.* (2009) et de *Lee et al.* (2012).

Données issues de Li *et al.* 2009 (GSE 13149)
Les gènes orthologues régulés par la séparation maternelle de 4 heures au niveau
du foie du rat de 10 jours



Données issues de Lee *et al.* 2012 (GSE 21224)
Les gènes orthologues régulés par la séparation maternelle de 4 heures au niveau
du foie du rat de 10 jours

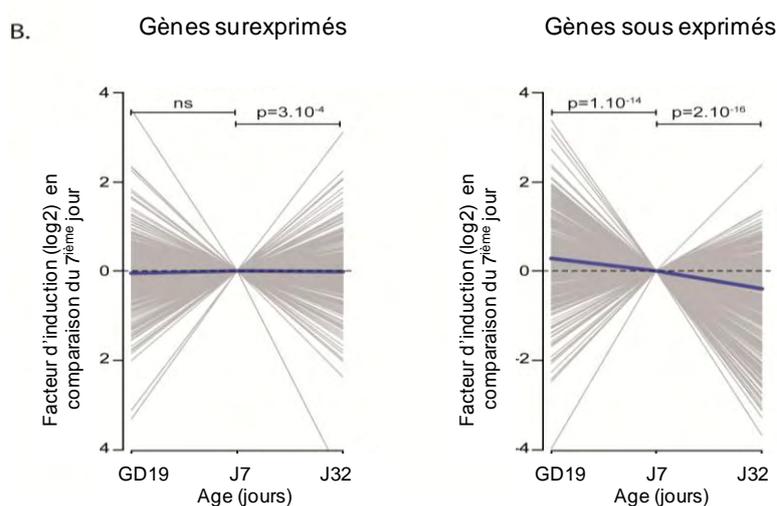


Figure 42 Expression des gènes hépatiques régulés par la séparation maternelle chez le rat en comparaison de l'expression des gènes exprimés durant l'ontogénie du foie chez la souris.

(A) Les données de l'expression de gènes issues de l'étude de Li *et al.* en 2009 (GSE13149) nous ont permis de comparer les modifications d'expression du jour 0 au 21^{ème} jour avec 3 temps intermédiaires (n=1 ou 2 par âge) (Li *et al.*, 2009). Les gènes orthologues surexprimés suite à la séparation maternelle sont enrichis parmi les gènes sous exprimés au 14^{ème} jour par rapport au 7^{ème} jour mais ne montrent aucune tendance systématique entre le jour 0 et le jour 21 (graphique de gauche). En revanche, les gènes orthologues sous-exprimés suite à la séparation maternelle (graphique de droite) montrent une baisse globale du niveau d'expression durant l'ontogénèse du foie entre le jour 0 et le 21^{ème} jour.

(B) Les données de l'expression de gènes issues de l'étude de Lee *et al.* en 2012 (GSE21224) nous ont permis de comparer les modifications d'expression entre le 19^{ème} jour du stade gestationnel (GD19), le 7^{ème} et le 32^{ème} jour de vie postnatal (n=4 par âge) (Lee *et al.*, 2012). Les gènes orthologues de la souris correspondant aux gènes surexprimés chez le rat suite à la séparation maternelle étaient légèrement enrichis entre le 7^{ème} et le 32^{ème} jour (graphique de gauche). En revanche, les gènes orthologues sous-exprimés suite à la séparation maternelle montrent en condition physiologique une forte sous-expression entre GD19 et le 32^{ème} jour (graphique de droite).

3.5 Un impact ciblé sur les gènes impliqués dans le cycle cellulaire

3.5.1 Absence d'impact sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et la réponse de phase aigüe

L'analyse des listes de gènes dont l'expression hépatique semble augmentée suite à une séparation maternelle (analyse microarray ci-dessus) nous a conduits à suspecter un impact sur des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique. Nous avons donc répété à l'identique le protocole expérimental de séparation maternelle chez le rat femelle de 10 jours et réalisé une analyse de l'expression de plusieurs gènes par qPCR dans des foies prélevés 24 heures après la séparation maternelle (*Annexe 1 protocole de qPCR*). Nous avons étudié l'expression de 6 gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et sa régulation : Cpt1a (Carnitine palmitoyltransferase I), Acox1 (acyl-CoA oxidase 1), Cd36 (cell surface protein), Abcc3 (ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3), PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) et Sult1b1 (Sulfotransferase Family, Cytosolic, 1B, Member 1). Les résultats, non présentés dans ce manuscrit, ne montrent pas de modification d'expression de ces gènes suite à la séparation maternelle. Une étude indépendante ne permet donc pas de confirmer l'augmentation de l'expression de ces gènes. En contredisant les résultats de notre première étude par microarray, ces observations mettent à nouveau en lumière le fait qu'aucune fonction biologique bien spécifique n'apparaisse enrichie parmi les gènes dont l'expression est apparue augmentée suite au stress de séparation maternelle dans notre étude de microarrays.

Nous avons vu que le stress de séparation maternelle provoquait chez le rat de 10 jours une translocation bactérienne, avec des bactéries vivantes retrouvées y compris au niveau du foie chez certains individus. Bien que nos résultats de microarrays n'indiquent aucun impact dans ce sens, nous avons voulu nous assurer que cette translocation ne s'accompagnait pas d'une réponse de nature inflammatoire ou de phase aigüe au niveau hépatique. Nous avons donc également analysé par qPCR l'expression de gènes impliqués dans ces fonctions. Les gènes codants pour l'haptoglobine, l'alpha 2 microglobuline (A2m) et le fibrinogène alpha ne présentaient pas de modification d'expression après la séparation maternelle. Les niveaux d'expression de l'IL6 et du TNF α étaient indétectables dans la plupart de nos échantillons, sans effet groupe évident. Ce résultat suggère que la présence de bactéries dans le foie ne s'accompagne pas d'une réponse inflammatoire et de phase aigüe. Il est possible qu'une telle réponse existe et que nous ne soyons pas en mesure de la

mettre en évidence, soit en raison d'une variabilité interindividuelle trop importante, soit en raison d'une réponse faible, voire spécifique de certains types cellulaires. Il est également possible que le foie ait mis en place des mécanismes de tolérance vis-à-vis de ces bactéries commensales ne provoquant donc pas de modification d'expression des protéines de l'inflammation et de la phase aigüe (Zeuzem, 2000). Dans ce cadre, il serait intéressant d'évaluer si une séparation maternelle en présence d'un agent pathogène au niveau entérique a ou non une influence sur la réponse inflammatoire hépatique. Cependant, nous avons vu que le rat de 10 jours n'est pas adapté pour l'étude d'une infection et il faudrait utiliser un modèle de rat plus proche de la naissance comme le suggère l'étude de Birchenough et al. en 2013 (Birchenough *et al.*, 2013).

3.5.2 Confirmation des impacts sur l'expression de gènes impliqués dans la division cellulaire

Parmi les gènes détectés par l'analyse microarray comme régulés à la baisse par la séparation maternelle, nous avons analysé l'expression de 8 gènes impliqués dans le cycle et la division cellulaires Ccnb1 (Cyclin B1), Nusap 1 (Nucleolar and spindle associated protein 1), Pttg (Pituitary tumor transforming gene), Ska1 (Spindle and kinetochore associated complex subunit 1), Cdca2 (Cell division cycle associated 2), Kif 20a (Kinesin family member 20 A), Plk1 (Polo-like kinase I) et Top2a (topoisomerase (DNA) II alpha). Ces gènes ont été sélectionnés sur la base de plusieurs critères : 1) l'analyse microarray suggère que leur expression hépatique est diminuée suite à la séparation maternelle chez le rat de 10 jours, avec des facteurs de modulation d'ampleur certes globalement assez faible mais relativement différente d'un gène à l'autre, 2) ces gènes sont bien annotés et leurs fonctions sont, au moins pour partie, bien décrites dans la littérature, 3) leurs fonctions relèvent de plusieurs catégories GO identifiées comme enrichies parmi les gènes régulés à la baisse dans notre étude par microarrays. Dans un premier temps, nous avons confirmé par qPCR que l'expression de ces gènes était bien diminuée 24 heures après un stress de séparation maternelle en analysant un ensemble d'échantillons plus large mais incluant les échantillons analysés par microarray (*Figure 43*).

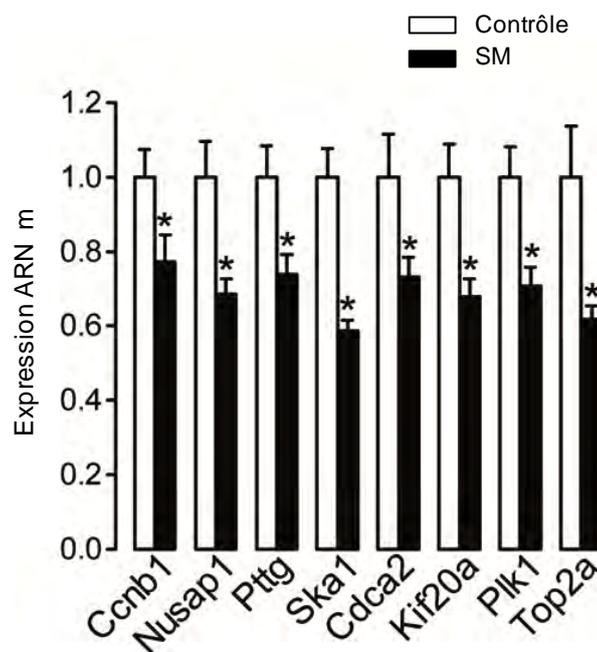


Figure 43 Diminution d'expression hépatique des gènes du cycle cellulaire suite à la séparation maternelle de 4 heures

L'expression des gènes codant pour les gènes : Ccnb1 (Cyclin B1), Nusap 1 (Nucleolar and spindle associated protein I), Pttg (Pituitary tumor transforming gene), Ska1 (Spindle and kinetochore associated complex subunit 1), Cdca2 (Cell division cycle associated 2), Kif 20a (Kinesin family member 20 A), Plk1 (Polo-like kinase I) et Top2a (topoisomerase (DNA) II alpha) ont été analysés par qPCR dans le foie des rats femelles 24 heures après la séparation maternelle ainsi que dans le groupe contrôle resté à la mère (n=7-8 par groupe, incluant les individus analysés sur la puce à ADN). Les données de qPCR ont été normalisées par la moyenne géométrique de l'expression des gènes Tbp (TATA-box binding protein) et Polr2a (RNA polymerase II polypeptide A). Les valeurs indiquées représentent la moyenne \pm SEM *p<0,05 par rapport au contrôle, Test de Student. SM= Séparation maternelle.

Compte tenu de ces résultats, nous avons fait le choix de poursuivre nos investigations sur cet ensemble cohérent de gènes impliqués dans la division cellulaire et qui présente une baisse de leur expression suite à la séparation maternelle. Dans un premier temps, nous avons souhaité évaluer si ces modulations persistaient au-delà de 24h après la séparation maternelle.

Nous avons répété le protocole de séparation maternelle comme précédemment chez le rat femelle de 10 jours et nous avons analysé l'expression hépatique des ARNm des 8 gènes impliqués dans le cycle cellulaire au bout de 24 heures ou de 48 heures après la séparation maternelle, ainsi que chez des animaux âgés de 25 jours (post-sevrage). Les résultats sont présentés dans la Figure 44.

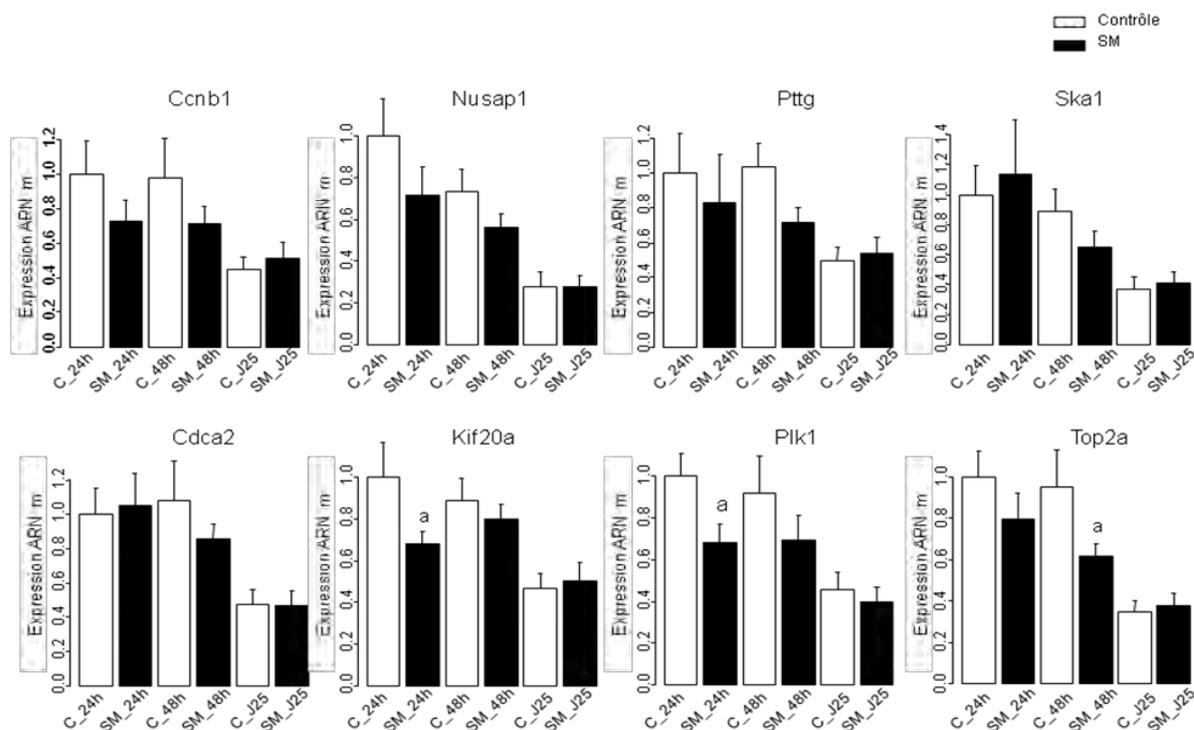


Figure 44 Effets de la séparation maternelle de 4 heures sur l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire 24 heures, 48 heures après l'exposition et au 25^{ème} jour.

Les niveaux d'expression des ARNm de Ccnb1, Nusap1, Pttg, Ska1, Cdca2, Kif20a, Plk1 et Top2a ont été évalués dans le foie de rats femelles 24 heures, 48 heures et au 25^{ème} jour après la séparation maternelle ainsi que dans le groupe contrôle resté à la mère. La qPCR a été réalisée comme précédemment et les valeurs indiquées représentent la moyenne \pm SEM (n=6-8 par groupe) a p<0,05 par rapport au contrôle SM= Séparation maternelle

Pour tous les gènes sauf Cdca2 et Ska1, nous avons retrouvé une expression plus faible chez les animaux séparés de leur mère au temps 24h (Figure 44). Cependant, la différence d'expression ne s'est avérée significative que pour les gènes Kif20a et Plk1. Pour le gène Nusap1, la diminution d'expression est proche du seuil de significativité en comparaison du groupe contrôle (p=0.07). 48 heures après le stress, le niveau d'expression hépatique des 8 gènes est plus faible chez les animaux ayant subi la séparation maternelle que chez les rats contrôle. Seule la baisse d'expression Top2a atteint néanmoins le seuil de significativité. Nous avons déjà souligné que l'ampleur des impacts sur l'expression de ces gènes était limitée, en lien avec la nature modérée du stress étudié. Nous avons observé dans cette nouvelle expérience une variabilité plus importante de l'expression basale des 8 gènes qui est vraisemblablement liée à une plus grande variabilité d'origine expérimentale (maturité de développement de l'organe un peu moins homogène que dans l'expérience de la Figure 43, temps de conservation des échantillons plus long et variable entre échantillons, pas de contrôle de la qualité des échantillons sur Bioanalyzer comme pour l'expérience de microarrays). Elle explique en grande partie l'absence de significativité

observée dans cette expérience car les tendances en matière de variation d'expression sont pour la plupart cohérentes avec nos résultats précédents.

Au jour 25 post-partum, nous n'observons plus d'effet de la séparation maternelle sur l'expression de l'ensemble des gènes analysés. De plus, nous constatons que le niveau d'expression de ces gènes est plus faible à cet âge là y compris pour le groupe contrôle. Cette dernière observation est cohérente avec les conclusions de Li et al. (Li *et al.*, 2009) ainsi qu'avec nos propres analyses (*Figure 42*) qui suggèrent une baisse globale de l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire lors de la maturation post-natale du foie. Ces résultats suggèrent que le stress de séparation maternelle induit bien une baisse de l'expression de certains gènes impliqués dans la division cellulaire. Ces effets semblent persister, au moins pour partie, jusqu'à 48h après le stress mais aucune différence d'expression entre individus stressés (à J10) et rats contrôles n'est discernable chez le jeune adulte sevré âgé de 25 jours. Malgré nos efforts pour standardiser les conditions expérimentales, nous observons une variabilité interindividuelle parfois conséquente dans nos mesures d'expression de ces gènes (*Figure 44*). L'expression des gènes liés à la division cellulaire que nous avons étudiés ici est manifestement influencée par l'âge de l'animal et le stade de maturation de son foie (Li *et al.*, 2009, *Figure 42* et *Figure 44*). Ainsi, il est probable qu'une part de la variabilité observée est attribuable à des différences interindividuelles de maturité de l'organe. Nous avons également rencontré des difficultés dans l'extraction des ARNs de foie chez les rats de 10 jours, avec l'obtention d'ARNs souvent sensiblement dégradés, alors qu'aucun problème particulier n'est observé dans le foie adulte. Une part de variabilité est donc peut-être également expliquée par des niveaux de dégradation variables entre échantillons, ce qui a été atténué dans notre première étude où une analyse de la qualité des ARNs a été conduite au préalable. Enfin, l'absence d'impact chez le rat âgé de 25 jours montre que les effets observés sur l'expression de ces gènes sont transitoires. Compte tenu des effets de la séparation maternelle que nous avons observés sur la perméabilité intestinale dans le cadre de ce travail de thèse et du dialogue étroit entre le foie et l'intestin, nous avons souhaité évaluer si les modulations d'expression génique hépatique étaient en lien ou non avec l'impact intestinal du stress de séparation maternelle.

Dans le but de déterminer si la sous-expression des gènes associés à la division cellulaire était une conséquence de l'altération de la barrière intestinale induite par la

séparation maternelle, nous avons mesuré l'expression de ces mêmes 8 gènes dans le foie de rats prétraités ou non au ML7. Nous avons vu lors de notre première étude que l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par le stress de SM était liée à l'activité de la MLCK intestinale et qu'un traitement au ML7 prévenait ces effets. Les résultats, présentés en Figure 45, montrent à nouveau une diminution significative de l'expression de ces 8 gènes, significatives pour les gènes *Ccnb1*, *Nusap1*, *Pttg*, et *Ska1* chez les rats séparés de leur mère 24 heures auparavant en comparaison du groupe contrôle. Des effets très similaires, suggérant une baisse de l'expression des 8 gènes, sont observés lorsque les animaux ont été prétraités au ML7, bien que le seuil de significativité ne soit pas atteint (Figure 45). Ainsi, les effets observés sur l'expression hépatique de ces gènes de la division cellulaire sont maintenus même lorsque les effets sur la perméabilité intestinale sont bloqués par le ML7. Ces résultats suggèrent que les modulations du transcriptome hépatique, au moins pour ce qui touche à la division cellulaire, ne sont pas liées à l'augmentation de la perméabilité épithéliale intestinale consécutive à la séparation maternelle. Cependant, le ML7 est décrit pour bloquer spécifiquement les effets du stress sur la perméabilité paracellulaire (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005). On ne peut donc pas exclure que d'autres signaux, issus du passage transcellulaire, puissent contribuer à façonner la réponse du transcriptome hépatique à la séparation maternelle. Une autre hypothèse serait que le stress de séparation maternelle agisse directement sur le foie, de manière indépendante à son effet sur l'intestin. Dans ce cas, la voie des glucocorticoïdes semble un candidat potentiel via lequel ce stress pourrait agir. En effet, le récepteur aux glucocorticoïdes GR est déjà exprimé et est fonctionnel dans le foie à la naissance (Cole *et al.*, 1995). Nous avons mesuré l'expression de l'ARNm de GR par qPCR dans le foie des rats âgés de 10 et de 25 jours ayant subi ou non un stress de séparation maternelle à J10. Contrairement au côlon qui présente un niveau d'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes différents selon l'âge, le foie présente un profil d'expression stable entre le 10^{ième} et le 25^{ième} jour. Cette observation est cohérente avec les données concernant l'activité du récepteur qui est décrite comme stable dans le foie entre le 10^{ième} et le 20^{ième} jour de naissance (Henning *et al.*, 1975). Un effet direct des corticoïdes plasmatiques dont la concentration augmente en réponse à la séparation maternelle pourrait également participer aux changements observés sur le transcriptome hépatique.

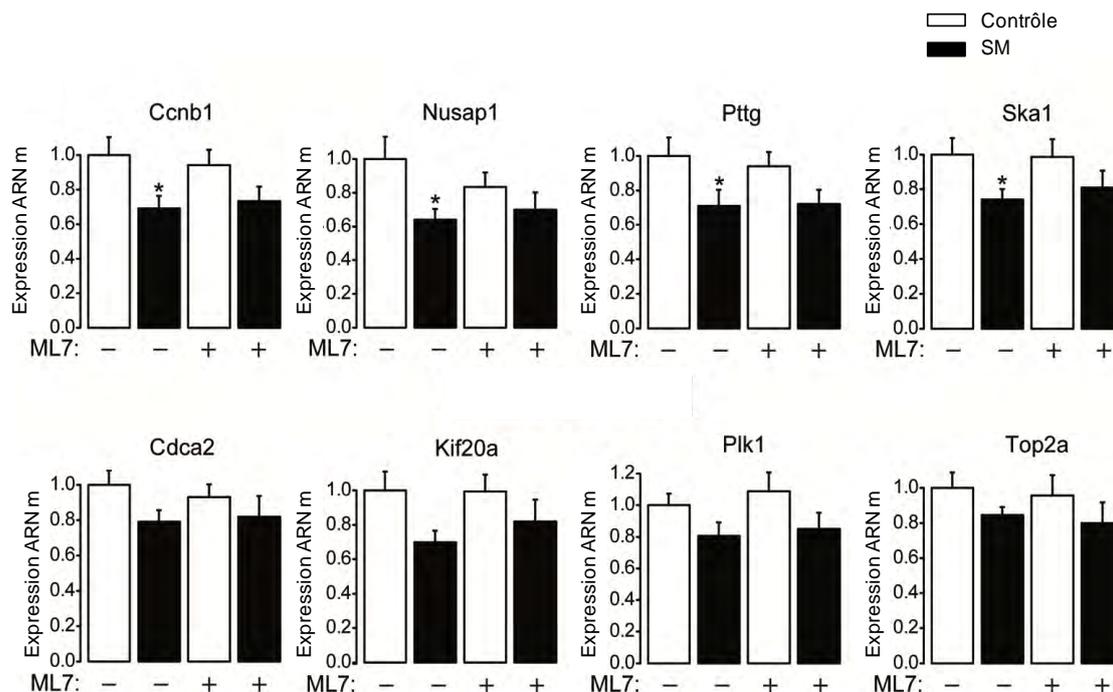


Figure 45 Effets de la séparation maternelle de 4 heures et du prétraitement au ML7 sur l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire.

Le niveau d'expression des ARNm de Ccnb1, Nusap1, Pttg, Ska1, Cdca2, Kif20a, Plk1 et Top2a. ont été évalué au niveau du foie de rats femelles 24 heures après la séparation maternelle ainsi que dans le groupe contrôle resté à la mère en présence ou en absence (Nacl 0.9%) de ML7 (1 mg/kg dans une solution de Nacl 0.9%). La qPCR a été réalisée comme précédemment et les valeurs indiquées représentent la moyenne \pm SEM (n=6-8 par groupe) *p<0,05 par rapport au contrôle, SM= Séparation maternelle

Un stress de séparation maternelle répété est également connu pour avoir un impact sur les taux circulants de glucocorticoïdes (Barreau *et al.*, 2007b). Nous avons souhaité évaluer si un tel stress, où la séparation maternelle est renouvelée 3 jours de suite, pouvait donc également avoir un impact sur l'expression de ce groupe de gènes impliqué dans la division cellulaire.

Nous avons répété le protocole de séparation maternelle de 4 heures aux 8, 9 et 10^{ème} jours et nous avons prélevé les foies des rats stressés et contrôles 24 heures après le dernier épisode de stress. L'expression des 8 gènes impliqués dans la division cellulaire a été étudiée dans le foie des animaux par qPCR. Les résultats obtenus (Figure 46), montrent que l'expression hépatique de ces gènes est soit non affectée, soit augmentée par le stress de séparation maternelle répété. En revanche, le stress de séparation maternelle ne diminue en aucun cas l'expression de ces gènes comme nous l'avons observé lors d'un stress unique. Ce résultat n'exclut pas complètement l'implication éventuelle des glucocorticoïdes dans la régulation de ces gènes et une étude de stress unique en présence ou non d'un

antagoniste de GR (RU486) sera sans doute nécessaire pour trancher cette question. Cependant, ces données indiquent que l'expression de ces gènes est vraisemblablement aussi sous le contrôle d'autres voies de régulations qui seraient modulées différemment entre un stress unique et un stress répété. Si l'identification de ces voies nécessitera des travaux complémentaires, il est intéressant de noter que le foie semble en quelque sorte capable de compenser l'effet du stress lorsque celui-ci est répété en rétablissant des niveaux d'expression comparables, voire parfois supérieurs aux animaux contrôles.

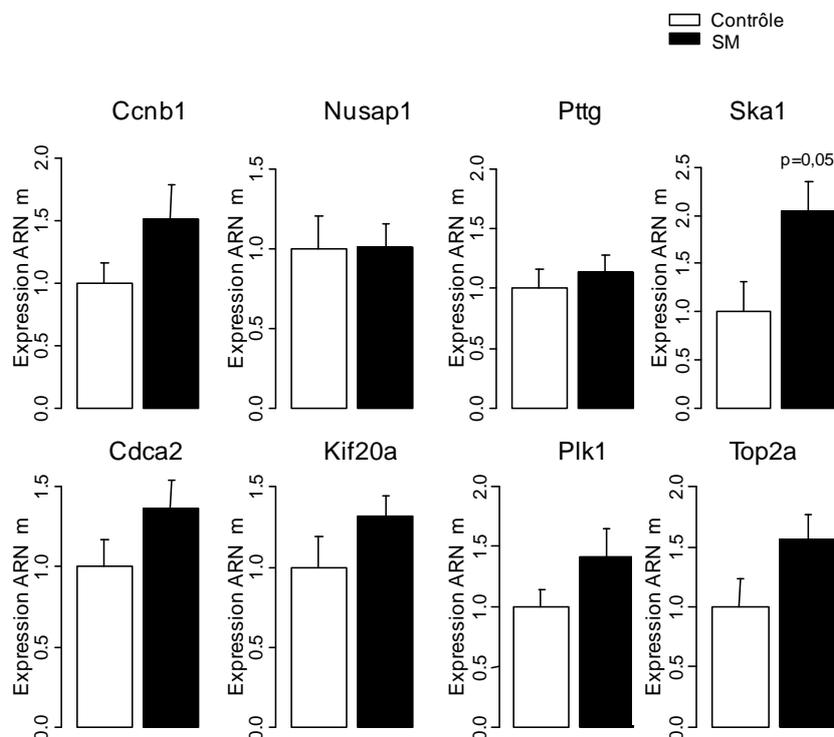


Figure 46 Effets de la séparation maternelle répétée de 4 heures sur l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire 24 heures après le dernier épisode de stress.

Le niveau d'expression des ARNm de Ccnb1, Nusap1, Pttg, Ska1, Cdca2, Kif20a, Plk1 et Top2a ont été évalué au niveau du foie de rats femelles 24 heures après la séparation maternelle réalisée aux 8,9 et 10^{ème} jour ainsi que dans le groupe contrôle resté à la mère. La qPCR a été réalisée comme précédemment et les valeurs indiquées représentent la moyenne \pm SEM (n=6-8 par groupe) SM= Séparation maternelle

3.6 Bilan de l'analyse transcriptionnelle et perspectives

L'ensemble de l'analyse montre qu'une exposition unique de séparation maternelle de 4 heures chez le rat femelle de 10 jours induit une réduction d'expression d'un certain nombre de gènes hépatiques jouant des rôles importants dans les processus de division cellulaire. Afin de déterminer quels pourraient être les mécanismes transcriptionnels impliqués dans ces régulations, nous pourrions réaliser une analyse bioinformatique afin de vérifier si des motifs présents au niveau des promoteurs des différents gènes étudiés seraient régulés de manière identique.

Par ailleurs parmi les différents gènes affectés par la SM, la cycline B1 joue un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et l'orchestration des différentes phases du cycle cellulaire. Le complexe CDK1/cycline B va réguler la transition entre la phase G2/M (Pfaff *et al.*, 2013). D'autre part, les gènes Nusap1 (Ribbeck *et al.*, 2007), Ska1 (Ye *et al.*, 2013) et Pttg (Chesnokova *et al.*, 2010) codent pour des protéines importantes dans l'assemblage des kinétochores et/ou dans la ségrégation des chromosomes. La ségrégation correcte des chromosomes est un élément essentiel dans le contrôle de la stabilité génomique. Des défauts de ségrégation peuvent conduire à l'apparition de cellules filles aneuploïdes, i.e. avec un nombre incorrect de chromosomes. L'aneuploïdie est fréquemment observée dans les tumeurs humaines et joue un rôle clef dans le développement et/ou la progression des cancers (Baker *et al.*, 2009). Comme on a pu l'observer précédemment, la cycline B1, un acteur majeur de la régulation du cycle cellulaire, est affectée par une diminution d'expression génique. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de la séparation maternelle sur la prolifération des hépatocytes en utilisant par exemple une méthode de marquage au BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine). On pourrait administrer à des rates de 10 jours une solution de BrdU qui correspond à un analogue de la thymidine ayant la capacité de s'incorporer à l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire. L'analyse des échantillons de foie après la séparation maternelle permettrait d'identifier par immunohistochimie si la prolifération cellulaire est affectée ou non.

Les effets transcriptomiques observés sont en partie maintenus 48 heures après la séparation maternelle mais sont de plus faible intensité et ils deviennent indiscernables au 25^{ième} jour ce qui révèle la capacité du foie à réadapter les niveaux d'expression de ces gènes. Les modifications transcriptomiques au niveau du foie n'ont pas été retrouvées lors d'un stress répété suggérant ici aussi la possibilité d'une adaptation.

CONCLUSION

La prise en charge du prématuré à la naissance demeure difficile à appréhender de part sa forte sensibilité aux stimulations environnementales. La naissance de ces enfants est souvent associée à un épisode de stress intense pouvant avoir des répercussions sur leur développement. Afin d'atténuer ce stress, certains pays scandinaves et maternités en France ont fait appel à des programmes nord-américains de « soins de développement » ainsi qu'au concept de NIDCAP permettant de favoriser le contact de peau à peau entre le nouveau-né et sa mère, permettant de réduire son état de stress. Actuellement, de plus en plus d'études épidémiologiques montrent les apports bénéfiques de la présence maternelle sur la santé du nouveau-né, en favorisant la stabilité cardiovasculaire, thermique et glycémique. Nos travaux expérimentaux portant chez le jeune rat montrent qu'en plus de ces fonctions physiologiques, la séparation maternelle peut altérer la barrière épithéliale de l'intestin et provoquer des effets transcriptomiques au niveau du foie qui sont plus subtils mais dont l'impact fonctionnel reste à être défini. Le modèle rat nous a permis d'apprécier une période de sensibilité aux glucocorticoïdes se déroulant durant les deux premières semaines de vie qui rend le nouveau-né plus vulnérable à la séparation maternelle par rapport à celui plus proche du sevrage. Cette forte sensibilité aux glucocorticoïdes est également observable chez l'enfant prématuré chez qui la thérapie aux glucocorticoïdes est pratiquée couramment afin de stimuler le développement des fonctions pulmonaires et également favoriser la maturation de l'épithélium intestinal. Cependant nos travaux, et d'autres études épidémiologiques pointent du doigt les effets délétères de cette thérapie même à des doses jugées faibles de Dexaméthasone. Les études chez l'homme relèvent une forte proportion d'enfants atteints de perforations intestinales et de bactériémie après un tel traitement. Nos travaux mettent également en évidence dès 0.1 mg/kg de Dexaméthasone, une augmentation significative de la perméabilité intestinale et un risque élevé de bactériémie après un seul épisode de séparation maternelle. Chez l'homme, le contact de peau à peau semble réduire le risque d'infections nosocomiales néonatales cependant, au vu du faible nombre d'études réalisées il reste nécessaire de poursuivre l'analyse. Des études sont actuellement en cours telle que la cohorte française Elfe (Etude longitudinale française depuis l'enfance) qui a débuté en 2011 au sein de 313 maternités comprenant au total 12600 nouveau-nés. Cette étude longitudinale permettra de suivre l'état de santé des enfants de la naissance à l'âge adulte avec pour objectif d'évaluer les différents facteurs environnementaux et sociaux pouvant interférer avec le développement de l'enfant. Parmi ces éléments, les circonstances de la naissance du nouveau-né, la prématurité, le recours

aux soins sont pris en compte pour permettre de mieux comprendre en quoi les facteurs environnementaux survenant à la naissance peuvent interférer avec la santé de l'enfant. Cette étude permettra d'apporter des données nouvelles dans le débat actuel de la nécessité de recourir aux «soins de développement» après la naissance et de mieux définir le risque associé à la thérapie aux glucocorticoïdes.

Annexe 1

Méthodologie de l'analyse de la puce à ADN

1) Animaux

Pour la réalisation de cette étude des rates Wistar gestantes de 15 jours ont été obtenues du fournisseur Janvier (Le Genest St Isle, France). Les animaux ont été logés individuellement, dans des pièces à température de $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ et un cycle de 12h de lumière et avaient accès à l'eau et à la nourriture ad libitum (UAR pellets, epinay, France). L'étude *in vivo* a été approuvée par le comité d'éthique local de l'INRA et a été réalisée selon la directive 2010/63/UE du parlement européen relative à la protection des animaux.

2) Traitement

Les rates de 10 jours issus de 3 portées différentes minimum ont été séparées de leur mère pendant 4 heures (SM= Séparation maternelle) ou laissées au sein de la portée (groupe contrôle). Les animaux séparés ont été remis à leur mère pour 24 heures avant l'analyse par microarray de leur foies.

3) Protocole d'extraction

Immédiatement après l'euthanasie, un échantillon d'environ 100 mg de foie a été prélevé, mis directement dans l'azote liquide et stocké à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN. Les ARN totaux ont été extraits des échantillons de foie congelés avec le réactif TRIzol (Invitrogen) suivant les instructions du fournisseur. L'intégrité de l'ensemble des échantillons d'ARN a été contrôlée avec le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies) puis les ARN ont été dosés à 260 nm sur le Nanodrop ND-1000 spectrophotomètre (Thermo Scientific).

4) Protocole de marquage

Pour chaque échantillon, les ARNc ont été marqué à la cyanine 3 (Cy3) à partir de 200 ng d'ARN total selon les instructions du fournisseur (One-color Low Input Quick Amp Labeling Kit, Agilent Technologies) puis purifiés sur colonne RNeasy (QIAGEN,

Courtaboeuf , France). La quantification et le contrôle des ARNc marqués ont été réalisés avec le NanoDrop ND-1000 spectrophotomètre.

5) Protocole d'hybridation

1,65 µg d'ARNc marqués à la Cy3 ont été fragmentés à 60 ° C pendant 30 minutes dans un volume réactionnel de 55 µl contenant du tampon réactionnel de fragmentation 1X et du tampon de blocage 2X selon les instructions du fournisseur. A l'issue de la réaction de fragmentation, 55 µl de tampon d'hybridation 2X ont été ajoutés au mélange de fragmentation. Les échantillons ont été hybridés sur la puce Agilent de rat 4x44K v3 (design 028282).Le tout a été mis dans une chambre d'hybridation puis hybridés pendant 17 heures à 65 ° C. Après l'hybridation, les puces ont été lavées de manière séquentielle avec le tampon 1 de lavage (Agilent Technologies, 1 min) et le tampon 2 de lavage (Agilent Technologies, 37 ° C, 1 min).

6) Protocole de Scan

Les lames ont été analysées immédiatement après le lavage avec un scanner Agilent de haute résolution (G2565CA)

7) Analyse des données

Les images numérisées ont été analysées avec le logiciel Feature Extraction 10.10 (Agilent) en utilisant les paramètres par défaut (protocole GE1_1010_Sep10 et grille : 028282_D_F_20110906). Toutes les analyses de données ont été faites sous R (www.r-project.org) en utilisant des packages de Bioconductor (www.bioconductor.org). Les données brutes (médiane de l'intensité des pixels) ont été importées dans R en utilisant la fonction `read.maimages` du package `limma` avec la fonction de poids basée sur le rapport signal/ bruit de fond (l'attribution d'un poids de 1 ou 0 à chaque spot) :

```
myfunw<-function(x)
{okType<-x$ControlType==0
okFoundGreen<-x$gIsFound==1
okPos=x$gIsPosAndSignif==1
okWellAbove<- x$gIsWellAboveBG==1
as.numeric(okType & okFoundGreen & okPos & okWellAbove)}
```

Les données filtrées ont ensuite été stockées sous forme d'objet sous `ExpressionSet` et normalisées par la méthode des quantiles en utilisant la fonction `normalize.quantiles` du

package preprocessCore. Les sondes répliquées sur la puce (nom de la sonde identique) ont été pris en compte en prenant le signal médian normalisé de chaque sonde répliquée. La matrice résultante présente 17604 lignes où chacune correspondant à un nom de sonde unique.

Les données obtenues ont été transformées en logarithme de base 2

Protocole de qPCR

L'extraction des ARN a été réalisée au niveau du foie de rats femelles de 10 jours ayant été exposés à la séparation maternelle 24 heures avant ou restés à la mère (groupe contrôle). La transcription reverse des ARN en ADNc a été réalisée à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies, Courtaboeuf, France). La quantification de l'expression des gènes étudiés a été mesurée par qPCR via la fluorescence du Syber green mesurée à l'aide du thermocycleur Vii7 system (Life Technologies). Les données de qPCR ont été normalisées avec la moyenne géométrique de l'expression des gènes Tbp (TATA-box binding protein) et Polr2a (RNA polymerase II polypeptide A) et l'analyse du niveau d'expression des gènes étudiés a été réalisée avec la formule $2^{-\Delta Ct}$ après une étape de calibration avec la moyenne du groupe contrôle. Les données ont été analysées par l'analyse de la variance suivie d'un test t de Student. Une P value <0.05 a été considérée comme significative.

Annexe 2

<u>Séquences des oligonucléotides utilisés pour la qPCR</u>		
Gène	NCBI Refseq	Primer Sens (5'-3') : F Primer Anti sens (3'-5') : R
Cpt1a	NM_031559	F : GGTGCTGCTCTCCTACCACG
		R : CATGGGCTTCCGACCTGA
Acox1	NM_017340	F : ACCTACGCCAGACGGAGAT
		R : ATGCCCAAGTGAAGGTCCAA
Cd36	AF113914	F : GGAGGCATTCTCATGCCG
		R : TGAAAGCAATGGTTCCTTCTTCA
Abcc3	NM_080581	F : GGGAGCTGGGCTCCAAGT
		R : TTGCTGGCCTGGGTTCC
PPAR α	NM_013196	F : CATCGAGTGTCTGAATATGTGGG
		R : TGCAGCTTCGATCACACTTGT
Sult1b1	NM_022513	F : GAACAAAATGTTCTGGAGCAAG
		R : TGATGGAGTTTCTTCAAGAGTTCAA
Ccnb1	NM_171991	F : AGCCTGAACCTGTTATGGAAGTG
		R : GTTTCATTGGGCTTGGAGAG
Nusap1	NM_001107762	F : ACGTGATGACCGTCCCCTC
		R : CTTTCAAGGCTCTTAACAACCTTGTCTG
Pttg1	NM_022391	F : TCCTGCTCCTGATGATGCCTA
		R : GGAGAAGTGAGATCTGGTGCTCTT
Ska1	NM_001106134	F : TGCTCTTATGTTAATGAGAAGATTGAGA
		R : TCATTGACCGTAATGATCTCATCTCC

Cdca2	NM_001107273	F : GATCCGCTTCATAGCTCAGCA
		R : ACCGAAAAGCAGACATTCGCT
Kif20a	NM_001108426	F : GTCCGAAAGGACCTGTTGTCAG
		R : CTGTCTCTCCAGCTCAGAAGTTAAGAA
Plk1	NM_017100	F : CAATAGCTCCCAGCAGCCTAGA
		R : CCCGAACCACTGGTTCCTC
Top2a	NM_022183	F : ATGAAGATTCATTGAAAACCTCTTCGTTA
		R : AAAACGATGTCGCAGAAGAGATG
Hp	NM_012582	F : CCCTTCTGGAAAGAGGTGAGAG
		R : ACCCCAGAGCAGGAGAGTGA
A2m	NM_012488	F : GCGTGCTGCTCATGAAACC
		R : CTTTCACTGGTAGCAGGTCATAAATC
Nr3c1	NM_012576	F : CTGACATGTGGAAGCTGCAAAG
		R : CGAATTTTATCAATGATGCAATCG
Tbp	NM_001004198	F : CCACACCAGCCTCTGAGAGC
		R : AGCCAAGATTCACGGTGGAT
Polr2a	XM_343922	F : TCCTGAGTCCGGATGAGTTGA
		R : TGTTGTCTCTGGGTATTTGATACCA

Annexe 3

Tableau 1 : Catégorie de gènes surexprimés

GOBPID	OddsRatio	ExpCount	Count	Size	Term	Pvalue	qvalue
GO:2000112	1,67	80,16	116	1406	regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	7,88E-06	0,01125245
GO:2001141	1,67	72,46	106	1271	regulation of RNA biosynthetic process	1,41E-05	0,01125245
GO:0009889	1,59	87,92	122	1542	regulation of biosynthetic process	3,31E-05	0,01757962
GO:0045934	1,87	30,73	52	539	negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	0,00010015	0,032413
GO:0010558	1,86	31,53	53	553	negative regulation of macromolecule biosynthetic process	0,0001016	0,032413
GO:0044260	1,43	187,12	223	3282	cellular macromolecule metabolic process	0,0002086	0,05068906
GO:0009892	1,65	48,06	72	843	negative regulation of metabolic process	0,00022755	0,05068906
GO:0031327	1,77	32,84	53	576	negative regulation of cellular biosynthetic process	0,00028754	0,05068906
GO:0010557	1,71	38,54	60	676	positive regulation of macromolecule biosynthetic process	0,00029697	0,05068906
GO:0048715	22,25	0,40	4	7	negative regulation of oligodendrocyte differentiation	0,00031776	0,05068906

Tableau 2 : Catégorie de gènes sous-exprimés

GOBPID	OddsRatio	ExpCount	Count	Size	Term	Pvalue	qvalue
GO:0048285	5,08	9,19	36	165	organelle fission	6,36E-13	2,21E-09
GO:0000279	4,43	9,30	33	173	M phase	1,09E-10	1,60E-07
GO:0051301	4,16	10,42	35	189	cell division	1,38E-10	1,60E-07
GO:0007017	4,31	8,61	30	157	microtubule-based process	1,24E-09	1,07E-06
GO:0000278	4,02	8,13	27	154	mitotic cell cycle	2,56E-08	1,78E-05
GO:0007059	6,60	3,03	15	56	chromosome segregation	1,63E-07	9,44E-05
GO:0006261	6,98	2,73	14	49	DNA-dependent DNA replication	2,49E-07	0,00012361
GO:0007052	14,16	1,11	9	20	mitotic spindle organization	4,59E-07	0,00019894
GO:0007067	4,08	6,20	21	115	mitosis	6,71E-07	0,00025843
GO:0051276	2,39	20,49	43	368	chromosome organization	2,35E-06	0,0008146
GO:0006323	4,85	3,84	15	69	DNA packaging	4,23E-06	0,00133232
GO:0022402	2,42	13,87	30	269	cell cycle process	4,78E-05	0,01381706
GO:0051321	4,63	3,17	12	57	meiotic cell cycle	5,45E-05	0,01452932
GO:0006281	2,65	10,19	24	183	DNA repair	7,18E-05	0,01778757
GO:0090304	1,51	109,82	144	1972	nucleic acid metabolic process	8,70E-05	0,02012858
GO:0051726	3,22	6,07	17	113	regulation of cell cycle	9,90E-05	0,02145979
GO:0045132	34,23	0,33	4	6	meiotic chromosome segregation	0,00013004	0,02506011
GO:0051988	34,23	0,33	4	6	regulation of attachment of spindle microtubules to kinetochore	0,00013004	0,02506011
GO:0051303	10,31	0,89	6	16	establishment of chromosome localization	0,00014283	0,026076
GO:0051313	14,29	0,61	5	11	attachment of spindle microtubules to chromosome	0,00018267	0,03168132
GO:0051640	3,13	5,85	16	105	organelle localization	0,00020607	0,03403804
GO:0000086	7,14	1,33	7	24	G2/M transition of mitotic cell cycle	0,00022793	0,03593712
GO:0006260	3,20	5,36	15	99	DNA replication	0,00025645	0,03855877
GO:0007051	12,57	0,65	5	12	spindle organization	0,00026679	0,03855877

GO:0000090	22,93	0,39	4	7	mitotic anaphase	0,00028506	0,03870099
GO:0007076	22,82	0,39	4	7	mitotic chromosome condensation	0,00029008	0,03870099
GO:0051225	6,69	1,39	7	25	spindle assembly	0,00031609	0,04060895
GO:0007093	4,70	2,34	9	42	mitotic cell cycle checkpoint	0,00040682	0,05039789
GO:0034641	1,41	142,00	174	2550	cellular nitrogen compound metabolic process	0,00048509	0,05802249

Légende

GOBPID: Gene Ontology Biological Process ID

OddsRatio: Odd ratio

ExpCount: Expected number of genes among the up- or down-regulated genes to be found at each tested GO BP Term

Count: Number of genes among the up- or down-regulated genes annotated at each GO BP Term

Size: Number of genes from the gene universe that are annotated at each GO BP Term

Term: GO BP Term

Pvalue: Raw p-value (Hypergeometric test)

Qvalue: q-value

Hypergeometric tests for enrichment of GO Biological Processes Terms among the up- or down-regulated genes were performed using the GOstats package from Bioconductor

REFERENCES

A

Abreu MT. (2010) Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 10(2):131-44

Adkins B (1999) T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today* 20: 330-335

Agbemafle BM, Oesterreicher TJ, Shaw CA, Henning SJ (2005) Immediate early genes of glucocorticoid action on the developing intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288: G897–G906

Ait-Belgnaoui A, Bradesi S, Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L. (2005). Acute stress induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* 113: 141-147

Alcorn J, McNamara PJ (2002) Ontogeny of hepatic and renal systemic clearance pathways in infants: Part I. *Clin Pharmacokinet* 41:959-98

Anderson RC, Dalziel JE, Gopal PK, Bassett S, Ellis A et al. (2012) The Role of Intestinal Barrier Function in Early Life in the Development of Colitis. *Colitis* 10, 1-29

Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ (1980) Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun.* 28: 893-898

Arsenault P, Menard D 1985. Influence of hydrocortisone on human fetal small intestine in organ culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 4: 893–901

Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C (2011) Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol.* 8: 36-45

B

- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. (2007) Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol.* (4):464-71
- Baker DJ, Jin F, Jeganathan KB, van Deursen JM (2009) Whole chromosome instability caused by Bub1 insufficiency drives tumorigenesis through tumor suppressor gene loss of heterozygosity. *Cancer Cell* 16: 475-486
- Barker N, van de Wetering M, Clevers H (2008) The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 22: 1856-1864
- Barreau F, Cartier C, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L (2004a) Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats. *Gastroenterology* 127:524–534
- Barreau F, Cartier C, Leveque M, Ferrier L, Moriez R et al. (2007a) Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *J Physiol.* 580:347–356
- Barreau F., Ferrier L., Fioramonti J., Bueno L (2004b) Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 53:5016
- Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L (2007b) New insights in the etiology and pathophysiology of irritable bowel syndrome: contribution of neonatal stress models. *447 Pediatr Res.* 62: 240-245
- Barreau F, Madre C, Meinzer U, Berrebi D, Dussailant M et al. (2010) Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut* (2):207-17

- Barreau F, Salvador-Cartier C, Houdeau E, Bueno L, Fioramonti J (2008) Long-term alterations of colonic nerve-mast cell interactions induced by neonatal maternal deprivation in rats. *Gut* 57: 582-590
- Bauer CR, Morrison JC, Poole WK, Korones SB, Boehm JJ, et al. (1984) A decreased incidence of necrotizing enterocolitis after prenatal glucocorticoid therapy. *Pediatrics* 73: 682-688
- Beach RC, Menzies IS, Clayden GS, Scopes JW (1982) Gastrointestinal permeability changes in the preterm neonate. *Arch Dis Child.* 57: 141-145
- Beath SV (2003) Hepatic function and physiology in the newborn. *Semin Neonatol.* 8: 337-346
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, et al. (2012) The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol.* 56: 952-964
- Berin MC, Yang PC, Ciok L, Wasserman S, Perdue MH (1999) Role for IL-4 in macromolecular transport across human intestinal epithelium. *Am J Physiol* 276:C1046–C1052
- Bezerra JA, Thompson SH, Morse M, Koldovský O, Udall JN Jr (1990) Intestinal permeability to intact lactose in newborns and adults. *Biol Neonate.* (6):334-42
- Biagini G, Pich EM, Carani C, Marrama P, Agnati LF (1998) Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int J Dev Neurosci.* 16:187–197
- Bijlsma PB, Peeters RA, Groot JA, Dekker PR, Taminiou JA, et al. (1995) Differential in vivo and in vitro intestinal permeability to lactulose and mannitol in animals and humans: a hypothesis. *Gastroenterology* 108: 687-696

Biol-N'garagba MC, Niepceron E, Mathian B, Louisot P (2003) Glucocorticoid-induced maturation of glycoprotein galactosylation and fucosylation processes in the rat small intestine. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 84:411–422

Bischoff SC, Kramer S (2007) Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. *Immunol Rev.* 217: 329-337

Bjarnasson I, Macpherson A, Hollander D (1995) Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 108: 1566-81

Blondel B, Bréard G, Du Mazaubrum C, Supernant K (2005) Enquête nationale périnatale 2003 situation en 2003 et évolution depuis 1998 Unité de recherches épidémiologiques sur la santé périnatale et la santé des femmes. 149. Paris: Inserm – U

Boj SF, van Es JH, Huch M, Li VS, Jose A et al. (2012) Diabetes risk gene and Wnt effector Tcf7l2/TCF4 controls hepatic response to perinatal and adult metabolic demand. *Cell* 151: 1595-1607

Bourillon A (2003) Pédiatrie pour le praticien. 4e ed. Paris: Masson, 681

Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L (2002). Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats. *Neurogastroenterol Motil.* 14: 75-82

Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB (2013) The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol.* 14: 660-667

Buddington RK, Sangild PT (2011) Companion animals symposium: development of the mammalian gastrointestinal tract, the resident microbiota, and the role of diet in early life. *J Anim Sci* (5): 1506-1519

Buddington RK, Sangild PT, Hance B, Huang EY, Black DD (2012) Prenatal gastrointestinal development in the pig and responses after preterm birth *J Anim Sci.* 4:290-8

Bystrova K, Ivanova V, Edhborg M, Matthiesen AS, Ransjo-Arvidson AB, et al. (2009) Early contact versus separation: effects on mother-infant interaction one year later. *Birth* 36: 97-109

C

Carlo WA, McDonald SA, Fanaroff AA, Vohr BR, Stoll BJ (2011) Association of antenatal corticosteroids with mortality and neurodevelopmental outcomes among infants born at 22 to 25 weeks' gestation. *JAMA* (21):2348-58

Catassi C, Bonucci A, Coppa GV, Carlucci A, Giorgi PL (1995) Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 21: 383-386

Cenac N, Coelho AM, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P et al. (2002) Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am J Pathol.* (5):1903-15

Chaloner A, Rao A, Al-Chaer ED, Greenwood-Van Meerveld B (2010) Importance of neural mechanisms in colonic mucosal and muscular dysfunction in adult rats following neonatal colonic irritation. *Int J Dev Neurosci.* 28:99–103

Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ (1998) Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 28: 1187-1190

Chassaing B, Etienne-Mesmin L, Gewirtz AT (2013) Microbiota-liver axis in hepatic disease. *Hepatology* 10.1002

Chesnokova V, Melmed S (2010) Pituitary senescence: the evolving role of Pttg. *Mol Cell Endocrinol.* 326: 55-59

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Krieglstein K, Schmid W et al. (1995) Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* (13):1608-21

Conde-Agudelo A, Belizán JM, Diaz-Rossello J (2011) Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* (3):CD002771

Conforto TL, Waxman DJ (2012) Sex-specific mouse liver gene expression: genome-wide analysis of developmental changes from pre-pubertal period to young adulthood. *Biol Sex Differ.* 3:9

Coombes JL, Powrie F (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 8, 435-446

Corthesy B, Gaskins HR, Mercenier A (2007) Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr.* (3 Suppl 2):781S-90S

Costalos C, Gounaris A, Sevastiadou S, Hatzistamatiou Z, Theodoraki M, et al. (2003) The effect of antenatal corticosteroids on gut peptides of preterm infants--a matched group comparison: corticosteroids and gut development. *Early Hum Dev.* 74: 83-88

Coutinho SV, Su X, Sengupta JN, Gebhart GF (2000) Role of sensitized pelvic nerve afferents from the inflamed rat colon in the maintenance of visceral hyperalgesia. *Prog Brain Res.*129:375-87

Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, Miller JC, Zhou H et al. (2002) Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2):G307-16

Cray C, Zaias J, Altman NH (2009) Acute phase response in animals: a review. *Comp Med.* 59: 517-526

Crowley P, Chalmers I, Keirse MJ (1990) The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol.* 97(1):11–25

Cummins AG, Thompson FM (2002) Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. *Gut* 51: 748-754

D

Dageville C, Casagrande F, De Smet S, Boutté P (2011) The mother-infant encounter at birth must be protected. *Arch Pediatr.* 18(9), 994-1000

Daniels WM, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ (2004) Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis.* 19:3–14

Daugé V. (2003) Neurobiological impact of separating mothers from newborns in rodents. *Med Sci.* (5):607-11

Dawkins MJ (1963) Glycogen Synthesis and Breakdown in Fetal and Newborn Rat Liver. *Ann N Y Acad Sci.* 111: 203-211

Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD (2013) Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *Br J Nutr.* 2:S81-5

De Chateau P, Wiberg B (1977) Long-term effect on mother-infant behaviour of extra contact during the first hour post partum. II. A follow-up at three months. *Acta Paediatr Scand.*; 66:145–151

Dickerson RN, Karwoski CB (2002) Endotoxin-mediated hepatic lipid accumulation during parenteral nutrition in rats. *J Am Coll Nutr.* 21: 351-356

Dong P, Yang Y, Wang WP (2010) The role of intestinal bifidobacteria on immune system development in young rats. *Early Hum Dev.* (1):51-8

Drozdowski LA, Clandinin T, Thomson AB (2010) Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World J Gastroenterol.* 16: 787-799

E

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, et al. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635-1638

Emori TG, Gaynes RP (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol. Rev* 6, 428–444

F

Fäk F, Ahrné S, Molin G, Jeppsson B, Weström B (2008) Microbial manipulation of the rat dam changes bacterial colonization and alters properties of the gut in her offspring. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (1):G148-54

Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI (1998) Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* (4):1157-70

Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr. Suppl* 91: 48-55

Ferrier L, Bérard F, Debrauwer L, Chabo C, Langella P, et al. (2006) Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. *Am J Pathol.* (4):1148-54

Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, Desreumaux P, Janin A et al. (2003) Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 125:795–804

Field T, Diego M, Hernandez-Reif M (2010) Preterm infant massage therapy research: a review. *Infant Behav Dev.* 33: 115–24

Flacking R, Lehtonen L, Thomson G, Axelin A, Ahlqvist S, et al. (2012) Closeness and separation in neonatal intensive care. *Acta Paediatr.* 101: 1032-1037

Ford HR, Avanoglu A, Boechat PR, Melgoza D, LumCheong RS, et al. (1996) The microenvironment influences the pattern of bacterial translocation in formula-fed neonates. *J Pediatr Surg.* 31: 486-489

Frasinariu OE, Ceccarelli S, Alisi A, Moraru E, Nobili V (2013) Gut-liver axis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: an input for novel therapies. *Dig Liver Dis.* 45: 543-551

G

Gareau MG, Jury J, Perdue MH (2007b) Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293:G198–G203

Gareau MG, Jury J, Yang PC, MacQueen G, Perdue MH (2006) Neonatal maternal separation causes colonic dysfunction in rat pups including impaired host resistance. *Pediatr Res.* (1) : 83-8

Gareau MG, Silva MA, Perdue MH (2008) Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr Mol Med.* (4) :274-81

Gérard P (2012) Microbiote intestinale et lipides : impact sur la santé humaine. *OCL* (4): 223–227

Giannone PJ, Schanbacher BL, Bauer JA, Reber KM (2006) Effects of prenatal lipopolysaccharide exposure on epithelial development and function in newborn rat intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (3):284-90

Girard J, Ferre, P, Pegorier JP, Duee PH (1992). Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev.* 507-562

Go LL, Albanese CT, Watkins SC, Simmons RL, Rowe MI (1994) Breast milk protects the neonate from bacterial translocation. *J Pediatr Surg.* 29: 1059-1063

Go LL, Ford HR, Watkins SC, Healey PJ, Albanese CT, et al. (1994) Quantitative and morphologic analysis of bacterial translocation in neonates. *Arch Surg.* 129: 1184-1190

Gonzalez-Mariscal L, Lechuga S, Garay E (2007) Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog Histochem Cytochem.* 42: 1-57

Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D (2008) Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1778: 729-756

Gordon P, Rutledge J, Sawin R, Thomas S, Woodrum D (1999) Early postnatal dexamethasone increases the risk of focal small bowel perforation in extremely low birth weight infants. *JPerinatol.* 19: 573–577

Gotteland M, Isolauri E, Heyman M, Tome D, Desjeux JF (1989) Antigen absorption in bacterial diarrhea: in vivo intestinal transport of beta-lactoglobulin in rabbits infected with the entero-adherent *Escherichia coli* strain RDEC-1. *Pediatr Res.* 26: 237-240

Gow PJ, Ghabrial H, Smallwood RA, Morgan DJ, Ching MS (2001) Neonatal hepatic drug elimination. *Pharmacol Toxicol.* 88: 3-15.

Grewal IS, Flavell RA (1998) CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.*16:111-135

Groschwitz KR, Hogan SP (2009) Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 124: 3-20

Gue M, Del Rio-Lacheze C, Eutamene H, Theodorou V, Fioramonti J et al. (1997) Stress-induced visceral hypersensitivity to rectal distension in rats: role of CRF and mast cells. *Neurogastroenterol Motil.* 9:271-279

Gunnar MR, Brodersen L, Krueger K, Rigatuso J (1996). Dampening of adrenocortical responses during infancy: normative changes and individual differences. *Child Dev.* 67:877—889

Gunnar MR, Talge NM, Herrera A (2009) Stressor paradigms in developmental studies: what does and does not work to produce mean increases in salivary cortisol *Psychoneuroendocrinology* 34:953—967

Guillemot L (2008) The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta* 1778(3):601–613

Gunnar MR, Donzella B (2002) Social regulation of the cortisol levels in Early human development. *Psychoneuroendocrinology* 27:199–220

H

Halac E, Halac J, Begue EF, Casanas JM, Indiveri DR, et al. (1990) Prenatal and postnatal corticosteroid therapy to prevent neonatal necrotizing enterocolitis: a controlled trial. *J Pediatr.* 117: 132-138

Hales DJ, Lozoff B, Sosa R, Kennell JH (1977) Defining the limits of the maternal sensitive period. *Develop Med Child Neurol.* 19:454–461

Henning SJ, Ballard PL, Kretchmer N (1975) A study of the cytoplasmic receptors for glucocorticoids in intestine of pre- and postweanling rats. *J Biol Chem.* 250: 2073-2079

Henning SJ (1978) Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol.* (5):E451-6

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM et al. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* (3):151-80

Herrera E, Amusquivar E (2000) Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res Rev.* 16: 202-210

Hines RN, MC Carver DG (2002) The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: Phase I oxidative enzymes. *J Pharmacol Exp Ther.* 300:355-60

Hirano S, Kataoka K (1986) Histogenesis of the mouse jejunal mucosa, with special reference to proliferative cells and absorptive cells. *Arch Histol Jpn* 49: 333-348

Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, Anderson JM (2006) Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns* (6):581-8

Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG et al. (2001) Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291:881–884

Hooper LV (2004) Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.* 12: 129-134

Hooper LV, Macpherson AJ (2010) Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 10(3):159-69

I

Insoft RM, Sanderson IR, Walker WA (1996) Development of immune function in the intestine and its role in neonatal diseases. *Pediatr Clin North Am* 43: 551-571

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ et al. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* (2):249-64

J

Jacob AI, Goldberg PK, Bloom N, Degenshein GA, Kozinn PJ (1977) Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 72: 1268-1270

Jimenez E, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Olivares M, et al. (2008) Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol.* 159: 187-193

Johnson TN (2003) The development of drug metabolising enzymes and their influence on the susceptibility to adverse drug reactions in children. *Toxicology* 192:37-48

Johnson JR, Gajewski A., Lesse AJ, Russo TA (2003). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* cause of invasive nonurinary infections. *J Clin Microbiol.* 41:5798-802

Johnson JR, Russo TA (2002) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *J Lab Clin Med.* (3):155-62

Jung C, Meinzer U, Montcuquet N, Thachil E, Chateau D et al. (2012) *Yersinia pseudotuberculosis* disrupts intestinal barrier integrity through hematopoietic TLR-2 signaling. *J Clin Invest.* 122:2239-2251

K

Kaminsky LS, Zhang QY (2003) The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. *Drug Metab Dispos.* (12):1520-5

Kane TD, Alexander JW, Johannigman JA. (1998) The detection of microbial DNA in the blood: a sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients *Ann Surg.* 227(1):1-9

Kalhan SC, Parimi P, Van Beek R, Gilfillan C, Saker F, et al. (2001) Estimation of gluconeogenesis in newborn infants. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 281: E991-997

Kamada N, Chen GY, Inohara N, Nunez G (2013) Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol.* 14: 685-690

Kansagra K, Stoll B, Rognerud C, Niinikoski H, Ou CN, et al. (2003) Total parenteral nutrition adversely affects gut barrier function in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 285: G1162-1170

Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, Berin MC, Taminiou JA et al (1998). Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol.* 275:G1037-1044

Kimura RE, Warshaw JB (1983) Metabolic adaptations of the fetus and newborn. *J Pediatr Gastroenterol. Nutr* 2 Suppl 1: S12-15

Kmieć Z (2001) Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 161: III-XIII

Konig J, Muller F, Fromm MF (2013) Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol Rev.* 65: 944-966

Kurundkar AR, Killingsworth CR, McIlwain RB, Timpa JG, Hartman YE, et al. (2010) Extracorporeal membrane oxygenation causes loss of intestinal epithelial barrier in the newborn piglet. *Pediatr Res.* 68: 128-133

Kwekel JC, Desai VG, Moland CL, Branham WS, Fuscoe JC (2010) Age and sex dependent changes in liver gene expression during the life cycle of the rat. *BMC Genomics* 11: 675

Kyd JM, Cripps AW (2008) Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens. *Vaccine* 26, 6221–6224

L

Labrune P, Trioche-Eberschweiler P, and Gajdos V (2010) Diagnostic de l'ictère du nouveau-né. EMC (Encyclopédie Médico-chirurgicale), Pédiatrie - Maladies infectieuses. 1, 4-002-R-30

Lade A, Noon LA, Friedman SL (2013) Contributions of metabolic dysregulation and inflammation to nonalcoholic steatohepatitis, hepatic fibrosis, and cancer. *Curr Opin Oncol.* (1):100-7

Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM (2004) Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry* 55:367–375

Larauche M, Gourcerol G, Wang L, Pambukchian K, Brunnhuber S et al. (2009) Cortagine, a CRF1 agonist, induces stress like alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 297:G215–G227

Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, et al. (2007) JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med.* 204: 3067-3076

Lambert-Zechovsky N, Bingen E, Denamur E, Brahimi N, Brun P et al. (1992) Molecular analysis provides evidence for the endogenous origin of bacteremia and meningitis due to *Enterobacter cloacae* in an infant. *Clin Infect Dis.*; 15:30-2

LeClerc S, Palaniswami R, Xie BX, Govindan MV (1991) Molecular cloning and characterization of a factor that binds the human glucocorticoid receptor gene and represses its expression. *J Biol Chem.* (26):17333-40

Lee JS, Ward WO, Knapp G, Ren H, Vallanat B, et al. (2012) Transcriptional ontogeny of the developing liver. *BMC Genomics* 13:33

Levine S, Huchton DM, Wiener SG, Rosenfeld P (1991) Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol.* 24:547–558

Le Rouzic V, Corona J, Zhou H (2011) Postnatal development of hepatic innate immune response *Inflammation.* (6):576-84

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124: 837-848

Li AP (2001) Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discov Today* 6: 357-366

Lin HY, Chang JH, Chung MY, Lin HC (2013) Prevention of necrotizing enterocolitis in preterm very low birth weight infants: Is it feasible? *J Formos Med Assoc.* 1-8

Lonnerdal B (2013) Bioactive proteins in breast milk. *J Paediatr Child Health* 49 Suppl 1: 1-7

Lozoff B, Brittenham GM, Trause MA, Kennell JH, Klaus MH (1977) The mother-newborn relationship: limits of adaptability. *J Pediatr.* 91: 1-12

Lu L, Li T, Williams G, Petit E, Borowsky M et al. (2011) Hydrocortisone induces changes in gene expression and differentiation in immature human enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (3):G425-32

Lumsden AB, Henderson JM, Kutner MH (1988) Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 8:232–236

MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, et al. (1999) Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 45: 223-228

MacFie J (2004) Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br Med Bull.* 71:1-11

Madi A, Svinareff P, Orange N, Feuilleley MG, Connil N (2010) *Pseudomonas fluorescens* alters epithelial permeability and translocates across Caco-2/TC 7 intestinal cells. *Gut Pathog* 2:16

Maheshwari A, Zemlin M (2006) Ontogeny of the intestinal immune system. *Haematol Report* 2(10):18-26

Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR (2005) New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol.* 33(1):27-34

Marshall JC, Christou NV, Meakins JL (1993) The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. *Ann Surg.* 218, 111–119

Marshall JC, Foster D, Vincent JL, Cook DJ, Cohen J, et al. (2004) Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis.* (3):527-34

Marshall JC, Foster DM, Harris D, Ribeiro M, Paice J et al. (2002) Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit Care* (4): 342–348

Marshall JK, Thabane M, Garg AX, Clark W, Meddings J, et al. (2004). Intestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome after a waterborne outbreak of acute gastroenteritis in Walkerton. Ontario. *Aliment Pharmacol Ther.* 20, 1317-1322

Martin FP, Wang Y, Sprenger N, Yap IK, Lundstedt T, et al. (2008) Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol Syst Biol.* 4: 157

Martin PG, Guillou H, Lasserre F, Déjean S, Lan A, et al. (2007) Novel aspects of PPARalpha-mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study. *Hepatology* (3):767-77

Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF (2013) Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol.* 21: 167-173

Mayer EA (2000) The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 47:861-9

McCarver DG, Hines RN (2002) The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: Phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 300:361-6

McCracken VJ, Lorenz RG (2001) The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol.* (1):1-11

Meddings JB, Swain MG (2000) Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* 119:1019-28

Medema JP, Vermeulen L. (2011) Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* (7351):318-26

Menard S, Cerf-Bensussan N, Heyman M (2010) Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* 3: 247-259

Mandell KJ, Babbitt BA, Nusrat A, Parkos CA (2005) Junctional adhesion molecule 1 regulates epithelial cell morphology through effects on beta1 integrins and Rap1 activity. *J Biol Chem.* (12):11665-74

Menzies IS “Absorption of intact oligosaccharide in health and disease”, *Bioch. Soc. Trans.* 1974 (2)

Mertz HR (2003) Irritable bowel syndrome. *N Engl J Med.* (22):2136-46

Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, et al. (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 585: 606-612

Montagner A, Rando G, Degueurce G, Leuenberger N, Michalik L, et al. (2011) New insights into the role of PPARs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* (5):235-43

Monteiro AC, Sumagin R, Rankin CR, Leoni G, Mina MJ, et al. (2013) JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Mol Biol Cell.* 24: 2849-2860

Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ (1999) Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology* 116: 702-731

Moore FL, Evans SJ (1999) Steroid hormones use non-genomic mechanisms to control brain functions and behaviors: a review of evidence. *Brain Behav Evol.* (1):41-50

Moore ER, Anderson GC, Bergman NJ (2012) Early skin-to-skin contact for mothers and their healthy newborn infants. *Cochrane Database Syst.* 16; 5:CD003519

Mooseker MS (1985) Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Annu Rev Cell Biol.* 1: 209-241

Morgan BE, Horn AR, Bergman NJ (2011) Should neonates sleep alone? *Biol Psychiatry* 70(9):817-25

Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, Fioramonti J, Eutamene H, et al. (2005) Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol.* 167: 1071-1079

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 136, 2348-2357

Moussa L, Bézirard V, Salvador-Cartier C, Bacquié V, Houdeau E et al. (2012) A new soy germ fermented ingredient displays estrogenic and protease inhibitor activities able to prevent irritable bowel syndrome-like symptoms in stressed female rats. *Clin Nutr.* (1) : 51-8

Mowat AM (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 3: 331-341

Muret L, Priou A, Oliver C, Grino M (1992) Stimulation of adrenocorticotropin secretion by insulin-induced hypoglycemia in the developing rat involves arginine vasopressin but not corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* (5):2725-32

N

Nanthakumar NN, Klopčič CE, Fernandez I, Walker WA (2003) Normal and glucocorticoid induced development of human small intestinal xenograft. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285: R1–R9

Nanthakumar NN, Young C, Ko JS, Meng D, Chen J et al. (2005) Glucocorticoid responsiveness in developing human intestine: possible role in prevention of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (1):G85-92

Nava P, Capaldo CT, Koch S, Kolegraff K, Rankin CR et al. (2011). JAM-A regulates epithelial proliferation through Akt/ β -catenin signalling. *Nature Publishing Group* 12, 314–320

Neish AS (2009) Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* (1):65-80

Neu J (2007) Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *Am J Clin Nutr.* 85: 629S-634S

Newburg DS, Walker WA (2007) Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res.* 61: 2-8

Ng PC, Wong GW, Lam CW, Lee CH, Wong MY, et al. (1997) Pituitary-adrenal response in preterm very low birth weight infants after treatment with antenatal corticosteroids. *J Clin Endocrinol Metab.* (11):3548-52

Ng PC (2000) The fetal and neonatal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 82: F250-254

Nieuwenhuijs VB, Verheem A, van Duijvenbode-Beumer H, Visser MR, Verhoef J, et al. (1998) The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg.* 228: 188-193

Nolan JP (1989) Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury – an idea whose time has come again. *Hepatology* 10:887–891

Nusrat A, Turner JR, Madara JL (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279: G851-857

O

O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, et al. (1998) Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 42: 29-35

Ohlsson A, Jacobs SE (2013) NIDCAP: a systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials. *Pediatrics* (3):e881-93

Oines E, Murison R, Mrdalj J, Gronli J, Milde AM (2011) Neonatal maternal separation in male rats increases intestinal permeability and affects behavior after chronic social stress. *Physiol Behav.* 105: 1058-1066

O'Mahony SM, Hyland NP, Dinan TG, Cryan JF (2011) Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 214: 71-88

Odenwald MA, Turner JR (2013) Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol.* (9):1075-83

Orchinik M, Murray TF, Moore FL (1991) A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science (5014)*:1848-51

Osterholm EA., Hostinar CE., Gunnar MR (2012) Alterations in stress responses of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in small for gestational age infants. *Psychoneuroendocrinology* (10):1719-25

P

Pacha J (2000) Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev.* 80: 1633-1667

Pacha J, Miksik I (1996) 11β -hydroxysteroid dehydrogenase in developing rat intestine. *J Endocrinol.* 148: 561-566, 1996.

Pacha J, Vagnerova R, Bryndova J (2003) Carbenoxolone accelerates maturation of rat intestine. *Pediatr Res.* 53: 808–813

Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5: e177

Park JH, Park DI, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI et al. (2009) The relationship between small-intestinal bacterial overgrowth and intestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome. *Gut liver* (3): 174-9

Parker GA, Picut CA (2005) Liver immunobiology. *Toxicol Pathol.* 33: 52-62

Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, Maheshwari A, Nusrat A, et al. (2012) Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am J Pathol.* (2):626-35

Perez-Cano FJ, Franch A, Castellote C, Castell M (2012) The suckling rat as a model for immunonutrition studies in early life. *Clin Dev Immunol.* 2012 : 537310

Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J et al. (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics.* (3):e724-32

Peters TJ, Bjarnasson I (1988) Uses and abuses of intestinal permeability measurements. *Can J Gastroenterol.* 2: 127-32.

Petrosyan M, Guner YS, Williams M, Grishin A, Ford HR (2009) Current concepts regarding the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int.* 25: 309-318

Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, et al. (2009) Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 58: 196-201.

Pillai Riddell RR, Racine NM, Turcotte K, Uman LS, Horton RE, et al. (2011) Non-pharmacological management of infant and young child procedural pain. *Cochrane Database Syst Rev:* CD006275.

Pfaff KL, King RW (2013) Determinants of human cyclin B1 association with mitotic chromosomes. *PLoS One* 8: e59169

Phillips DI, Walker BR, Reynolds RM, Flanagan DE, Wood PJ, et al. (2000) Low birth weight predicts elevated plasma cortisol concentrations in adults from 3 populations. *Hypertension* 35, 1301—1306

Pijls KE, Jonkers DM, Elamin EE, Masclee AA, Koek GH (2013) Intestinal epithelial barrier function in liver cirrhosis: an extensive review of the literature. *Liver Int.* 33: 1457-1469

Pohlová I, Miksík I, Pácha J (1997) The role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in maturation of the intestine. *Mech Ageing Dev.* (2):139-50

Poilane I, Cruaud P, Lachassinne E, et al. (1993) Enterobacter cloacae cross colonization in neonates demonstrated by ribotyping. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 12:820-6

Puiman P, Stoll B (2008) Animal models to study neonatal nutrition in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11: 601-606

Platt AM, Mowat AM (2008) Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett*; 119(1-2):22-31

Q

Quaroni A Tian JQ, Göke M, Podolsky DK (1999) Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. *Am J Physiol.* (5 Pt 1):G1027-40.

R

Racanelli V, Rehermann B. (2006) The liver as an immunological organ. *Hepatology* (2 Suppl 1):S54-62

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, et al. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 183: 1161-1172.

Renz H, Brandtzaeg P, Hornef M (2012) The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 12: 9-23.

Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204: 572-581

Rescigno M (2013) Mucosal immunology and bacterial handling in the intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 27: 17-24

Reynolds RM., Walker BR., Syddall HE., Andrew R., Wood PJ et al., (2001). Altered control of cortisol secretion in adult men with low birth weight and cardiovascular risk factors. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 86, 245—250

Ribbeck K, Raemaekers T, Carmeliet G, Mattaj JW (2007) A role for NuSAP in linking microtubules to mitotic chromosomes. *Curr Biol.* 17: 230-236

Rivarola MA, Suarez MM (2009) Early maternal separation and chronic variable stress in adulthood changes the neural activity and the expression of glucocorticoid receptor in limbic structures. *Int J Dev Neurosci.* 27:567–574

Roberts D, Dalziel S (2006) Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* (3):CD004454

Romagnani S. (1991) Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res.* 21, 152-158

Rosenfeld P, Suchecki D, Levine S (1992) Multifactorial regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis during development. *Neurosci Biobehav Rev.* 16:553–568

Rosztoczy A, Fioramonti J, Jarmay K, Barreau F, Wittmann T et al. (2003) Influence of sex and experimental protocol on the effect of maternal deprivation on rectal sensitivity to distension in the adult rat. *Neurogastroenterol Motil.* 15:679-86

Hu YJ, Wang YD, Tan FQ, Yang WX (2013) Regulation of paracellular permeability: factors and mechanisms. *Mol Biol Rep.* (11):6123-42.

Rouwet EV, Heineman E, Buurman WA, ter Riet G, Ramsay G, et al. (2002) Intestinal permeability and carrier-mediated monosaccharide absorption in preterm neonates during the early postnatal period. *Pediatr Res.* 51: 64-70

S

Santos J, Benjamin M, Yang PC, Prior T, Perdue MH (2000) Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *Am J Physiol Gastrointest LiverPhysiol.* 278:G847-54

Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, Yang PC, Yates D, et al. (1999) Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial Am J Physiol.277(2 Pt 1):G391-9.

Saunders PR, Kosecka U, McKay DM, Perdue MH (1994) Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am J Physiol.* 267:G794799

Saunders PR, Santos J, Hanssen NP, Yates D, Groot JA et al. (2002). Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Dig Dis Sci.* 47: 208-215

Sapolsky RM, Armanini MP, Packan DR, Sutton SW, Plotsky PM (1990) Glucocorticoid feedback inhibition of adrenocorticotropic hormone secretagogue release. Relationship to corticosteroid receptor occupancy in various limbic sites. *Neuroendocrinology* 51:328–336

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* (1):55-89

Schumann A, Nutten S, Donnicola D, Comelli EM, Mansourian R et al. (2005) Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiol Genomics* (2):235-45

Scott SM, Watterberg KL (1995) Effect of gestational age, postnatal age, and illness on plasma cortisol concentrations in premature infants. *Pediatr Res.* 37: 112-116

Seirafi M, Cunningham S, Hadengue A (2011) Gut microflora in liver and intestinal diseases: a revolution in the making. *Rev Med Suisse.* 7(307):1696-700

Severson EA, Jiang L, Ivanov AI., Mandell KJ, Nusrat A., et al. (2008) Cis-dimerization mediates function of junctional adhesion molecule A. *Molecular Biology Cell.* 19 : 1862–1872

Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V et al. (2006) Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci.* (Pt 10):2095-106

Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR (2011) Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol.* 73:283 309

Schmidt M, Enthoven L, van Woezik JH, Levine S, de Kloet ER, et al. (2004) The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J Neuroendocrinol.* 16: 52-57

Shulman RJ, Schanler RJ, Lau C, Heitkemper M, Ou CN, et al. (1998) Early feeding, antenatal glucocorticoids, and human milk decrease intestinal permeability in preterm infants. *Pediatr Res.* 44: 519-523

Sizun J, Casper C, Ratynski N, Gremmo-Feger G (2010) Perinatal care in France: is the Swedish model possible? *Arch Pediatr.* 17(10):1391-3

Smith BW, Adams LA (2011) Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 48: 97-113.

Soderholm JD, Yang PC, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, et al (2002a) Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 123:1099-108

Soderholm JD, Yates DA, Gareau MG, Yang PC, MacQueen G et al. (2002b) Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283:G1257–G1263

Solomon NS, Gartner H, Oesterreicher TJ, Henning SJ (2001) Development of glucocorticoid-responsiveness in mouse intestine. *Pediatr Res.* 49: 782-788

Souza MR, Diniz Mde F, Medeiros-Filho JE, Araujo MS (2012) Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Gastroenterol.* 49: 89-96

Spiller JC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T et al. (2000) Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 47: 804-811

Stark AR, Carlo WA, Tyson JE, Papile LA, Wright LL et al. (2001) Adverse effects of early dexamethasone in extremely-low-birth-weight infants. *N Engl J Med.* (2):95-101

Steinwender G, Schimpl G, Sixl B, Kerbler S, Ratschek M, et al. (1996) Effect of early nutritional deprivation and diet on translocation of bacteria from the gastrointestinal tract in the newborn rat. *Pediatr Res.*; 39:415–20

Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE et al. (1996) Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr.* (1):63-71

Stoll BJ, Temprosa M, Tyson JE, Papile LA, Wright LL et al. (1999) Dexamethasone therapy increases infection in very low birth weight infants. *Pediatrics* (5):e63

Storey JD, Tibshirani R (2003) Statistical significance for genome wide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (16):9440-5

Suchecki D, Nelson DY, Van Oers H, Levine S (1995) Activation and inhibition of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology* 20:169–182

Szabo G, Bala S (2010) Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J Gastroenterol.* 16: 1321-1329

T

Taché Y, Bonaz B (2007) Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest.* (1):33-40

Taché Y, Kiank C, Stengel A (2009) A role for corticotropin-releasing factor in functional gastrointestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep.* 11:270–277

Taché Y, Perdue MH (2004) Role of peripheral CRF signaling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil.* 16 (Suppl 1):137–142

Tackoen M (2012) Breast milk: its nutritional composition and functional properties. *Rev Med Brux.* 33: 309-317

Taylor SN, Basile LA, Ebeling M, Wagner CL (2009) Intestinal permeability in preterm infants by feeding type: mother's milk versus formula. *Breastfeed Med.* 4: 11-15

Tegethoff M, Knierzinger N, Meyer AH, Meinlschmidt G (2013) Cortisol awakening response in infants during the first six postnatal months and its relation to birth outcome. *Psychoneuroendocrinology.* (5):629-37

Teitelbaum AA, Gareau MG, Jury J, Yang PC, Perdue MH (2008) Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (3):G452-9

Tomas J, Langella P, Cherbuy C (2012) "The intestinal microbiota in the rat model : major breakthroughs from new technologies." *Anim Health Res Rev.* (1): 54-63

Tomas J, Wrzosek L, Bouznad N, Bouet S, Mayeur C et al. (2013) Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during conventionalization. *FASEB J.* (2):645-55

Turgeon B, Meloche S (2009) Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases. *Physiol Rev.* (1):1-26

Turner JR (2000a) Show me the pathway! Regulation of paracellular permeability by Na (+)-glucose cotransport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (3):265-81

Turner JR. (2000b) 'Putting the squeeze' on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol.* 11 (4):301-8

Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9: 799-809

U

Udall JN, Pang K, Fritze L, Kleinman R, Walker WA (1981) Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr Res.* (3):241-4

Urao M, Moy J, Van Camp J, Drongowski R, Altabba M, et al. (1995) Determinant of bacterial translocation in the newborn: small bowel versus large bowel colonization. *J Pediatr Surg.* 30: 831-836

Urao M, Okuyama H, Drongowski RA, Teitelbaum DH, Coran AG (1997) Intestinal permeability to small- and large-molecular-weight substances in the newborn rabbit. *J Pediatr Surg.* 32: 1424-1428

V

Van Camp JM, Tomaselli V, Drongowski R, Coran AG (1995) Bacterial translocation in the newborn rabbit: effect of age on frequency of translocation. *Pediatr Surg Int.* 10: 134-137

Van der Flier LG, Clevers H (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 71: 241-260

Van Elburg RM, Uil JJ, de Monchy JG, Heymans HS (1992) Intestinal permeability in pediatric gastroenterology. *Scand J Gastroenterol. Suppl* 194: 19-24

Van Elburg RM, Fetter WP, Bunkers CM, Heymans HS (2003) Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 88: F52-55

Vázquez DM (1998) Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* (7):663-700

Vazquez DM, Bailey C, Dent GW, Okimoto DK, Steffek A et al. (2006) Brain corticotropin-releasing hormone (CRH) circuits in the developing rat: effect of maternal deprivation. *Brain Res.* 1121:83-94

Velin AK, Ericson AC, Braaf Y, Wallon C, Soderholm J.D (2004) Increased antigen and bacteria uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut* 53:494-500

Verdu EF, Bercik P, Huang XX, Lu J, Al-Mutawaly N, et al. (2008) The role of luminal factors in the recovery of gastric function and behavioral changes after chronic *Helicobacter pylori* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 295: G664-670

W

Wallon C, Soderholm JD (2009) Corticotropin-releasing hormone and mast cells in the regulation of mucosal barrier function in the human colon. *Ann NY Acad Sci.* 1165:206–210

Waffarn F, Davis EP (2012) Effects of antenatal corticosteroids on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis of the fetus and newborn: experimental findings and clinical considerations. *Am J Obstet Gynecol.* (6):446-54

Weaver LT, Laker MF, Nelson R (1984) Intestinal permeability in the newborn. *Arch Dis Child* 59: 236-241

Weaver LT, Laker MF, Nelson R, Lucas A (1987) Milk feeding and changes in intestinal permeability and morphology in the newborn. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 6: 351-358

Wenzl HH, Schimpl G, Feierl G, Steinwender G (2001) Time course of spontaneous bacterial translocation from gastrointestinal tract and its relationship to intestinal microflora in conventionally reared infant rats. *Dig Dis Sci.* (5):1120-6

Widström AM, Lilja G, Aaltomaa-Michalias P, Dahllöf A, Lintula M, et al. (2011) Newborn behaviour to locate the breast when skin-to-skin: a possible method for enabling early self-regulation. *Acta Paediatr.* (1):79-85

Widstrom AM, Wahlberg V, Matthiesen AS, Eneroth P, Uvnas-Moberg K, et al. (1990) Short-term effects of early suckling and touch of the nipple on maternal behaviour. *Early Hum Dev.* 21: 153-163

Wilber AA, Southwood CJ, Wellman CL (2009) Brief neonatal maternal separation alters extinction of conditioned fear and corticolimbic glucocorticoid and NMDA receptor expression in adult rats. *Dev Neurobiol.* 69:73–87

Wittekind CA, Arnold JD, Leslie GI, Luttrell B, Jones MP (1993) Longitudinal study of plasma ACTH and cortisol in very low birth weight infants in the first 8 weeks of life. *Early Hum Dev.* (3):191-200

Wust S, Entringer S, Federenko IS, Schlotz W, Hellhammer DH (2005). Birth weight is associated with salivary cortisol responses to psychosocial stress in adult life. *Psychoneuroendocrinology* 30: 591—598

Y

Yang PC, Jury J, Soderholm JD, Sherman PM, McKay DM et al. (2006) Chronic psychological stress in rats induces intestinal sensitization to luminal antigens. *Am J Pathol.* 168:104–114

Yajima M, Nakayama M, Hatano S, Yamazaki K, Aoyama Y , et al. (2001) Bacterial translocation in neonatal rats: the relation between intestinal flora, translocated bacteria, and influence of milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (5):592-601

Ye AA, Maresca TJ (2013) Cell division: kinetochores SKAdaddle. *Curr Biol.* 23: R122-124

Yeh TF, Lin YJ, Hsieh WS, Lin HC, Lin CH et al. (1997) Early postnatal dexamethasone therapy for the prevention of chronic lung disease in preterm infants with respiratory distress syndrome: a multicenter clinical trial. *Pediatrics* (4):E3

Z

Zelena D, Domokos A, Barna I, Mergl Z, Haller J, et al. (2008) Control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the neonatal period: adrenocorticotropin and corticosterone stress responses dissociate in vasopressin-deficient brattleboro rats. *Endocrinology* (5):2576-83

Zeuzem S (2000) Gut-liver axis. *Int J Colorectal Dis.* 15: 59-82

Zheng G, Wu SP, Hu Y, Smith DE, Wiley JW, et al. (2013) Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner. *Neurogastroenterol Motil.* 25: e127-139

Zmrzljak UP, Rozman D (2012) Circadian regulation of the hepatic endobiotic and xenobiotic detoxification pathways: the time matters. *Chem Res Toxicol.* 25: 811-824

RESUME

Aujourd'hui, de plus en plus d'études épidémiologiques témoignent que des facteurs environnementaux apparaissant tôt dans la vie peuvent influencer le développement de l'enfant, jusqu'à le prédisposer à développer plus tard dans la vie des maladies chroniques, d'ordre métaboliques ou encore auto-immunes. Pour l'intestin de nombreuses études chez l'animal ont mis en lumière l'importance de la présence maternelle au cours des premiers jours de vie dans l'apparition à l'âge adulte de pathologies spécifiques, tels que des troubles fonctionnels digestifs, comme le syndrome de l'intestin irritable (SII). Un modèle expérimental de stress de séparation maternelle (SM) chronique s'est alors développé, permettant de mimer les symptômes associés au SII tels qu'une altération du transit intestinal, une augmentation de la perméabilité intestinale ainsi qu'une hyperalgésie viscérale. . Les défauts de barrière intestinale sont associés à une altération persistante de l'axe corticotrope et à l'action de médiateurs du stress au niveau du côlon. Toutes ces observations ont conclu qu'une SM chronique durant la période postnatale pouvait avoir des effets délétères favorisant le passage incontrôlé de bactéries vers les organes systémiques et aboutissant à un état de micro inflammation.

Alors que toutes ces manifestations ont essentiellement été décrites chez l'adulte, aucune étude n'a en retour considéré l'impact immédiat du stress accompagnant la SM chez le nouveau-né, quand celui-ci présente une barrière intestinale et des fonctions hépatiques en cours de maturation, donc sensibles à de nombreux facteurs environnementaux. C'est d'autant plus le cas chez le nouveau-né prématuré qui présente une vulnérabilité plus élevée, car plus sensible à l'action des glucocorticoïdes (GC) qui participent à la maturation des fonctions intestinales, en particulier dans le côlon. De plus, aucune étude ne s'est intéressée aux effets de la SM sur le développement des fonctions hépatiques, alors qu'elles s'établissent en lien étroit avec celui de l'intestin.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé un modèle expérimental de SM chez le rat en utilisant un épisode unique et de courte durée (4 heures) de privation maternelle telle qu'elle est pratiquée en routine lors de la prise en charge d'un nouveau-né dans les services hospitaliers, en particulier chez l'enfant prématuré. Dans l'optique d'en analyser les conséquences selon l'âge de l'individu, nous avons privilégié deux stades de développement chez le rat : 10 jours et 20 jours post-partum. D'après la littérature le rat âgé de 10 jours, constitue un modèle pertinent à plusieurs égards pour l'enfant prématuré, en particulier concernant l'immaturité de son intestin et de ses fonctions de barrière, en plus des fonctions

hépatiques. Au 20^{ième} jour post-partum, le jeune rat est à la veille du sevrage et est à un stade de maturité plus avancé, relativement comparable à celui d'un enfant né à terme. A ces deux âges, nous avons déterminé les conséquences immédiates de la SM unique sur la barrière intestinale, en étudiant les paramètres clés tels que la perméabilité intestinale et la translocation bactérienne, et étendu l'étude à l'impact sur le transcriptome hépatique, une approche sans *a priori* permettant d'apprécier l'impact global de la SM sur le foie en développement.

Les résultats de ses travaux montrent qu'une SM de 4h appliquée une seule fois chez le nouveau-né est bien un facteur de stress, augmentant la corticostéronémie tant pour le jeune rat de 10 jours que pour celui de 20 jours, mais avec des conséquences délétères sur la barrière intestinale essentiellement observées chez le raton de 10 jours. Chez ce dernier, l'impact du stress se traduit par une augmentation de la perméabilité colique aux macromolécules, déjà élevée en conditions basales, et par une translocation bactérienne systémique vers le foie et la rate. Nous avons montré que ces deux effets étaient liés à l'activité de l'enzyme MLCK impliquée dans la contraction du cytosquelette des cellules épithéliales. En amont, l'augmentation de la perméabilité intestinale était liée à l'action des GC via le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) exprimé dans l'intestin. Une augmentation de la corticostéronémie liée au stress de SM était également observée chez le rat de 20 jours, mais sans pour autant aboutir à des effets délétères sur la muqueuse intestinale. Nous avons constaté que l'intestin du rat de 20 jours était moins sensible à l'action des GC et présentait une faible expression en GR au niveau du côlon en comparaison du rat de 10 jours. Chez ce dernier, les impacts de la SM unique aboutissent également à une modification du transcriptome hépatique, tout particulièrement à une sous-expression de plusieurs gènes impliqués dans la division cellulaire. Ces effets dans le foie sont apparus transitoires et plus subtils que ceux retrouvés au niveau de l'intestin, et dont les éventuelles conséquences fonctionnelles restent à être évalués.

Les travaux de cette thèse reposant sur le modèle rat ont révélé des effets délétères de la séparation maternelle sur la barrière intestinale en cours de développement et des effets indépendants et plus subtils sur le transcriptome hépatique. Ces observations révèlent la nécessité de prise en compte du stress de la séparation maternelle, pratiquée en routine chez l'homme et notamment chez l'enfant prématuré sur la santé de l'enfant et plus tard chez l'adulte.