

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 615 "Sciences Biologiques et Santé"

Equipe de recherche : EA6309 'Maintenance myélinique et neuropathies périphériques'

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Biosanté

présentée et soutenue le 29/05/2018 par le

Dr Quentin BALLOUHEY

Etude de la paroi intestinale dans un modèle murin
d'interruption intestinale : rôles des cellules du SNE et des
cellules neuroendocrines

Thèse co-dirigée par le Dr Sylvie Bourthoumieu et le Pr Franck Sturtz

Composition du JURY :

Rapporteurs

Pr Sabine Sarnacki, Professeur, Chirurgie Pédiatrique, U. de Paris

Pr Hubert Lardy, Professeur, Chirurgie Pédiatrique, U. de Tours

Examineurs

Dr Sylvie Bourthoumieu, Maître de Conférence, U. de Limoges

Pr Laurent Fourcade, Professeur, Chirurgie Pédiatrique, U. de Limoges

Pr Jean-François Guérin, Biologie du Développement, U. de Lyon

M. Michel Neunlist, DR, INSERM U913, U. de Nantes

Pr Franck Sturtz, Professeur, Biochimie, U. de Limoges

A Julia

Qui croit le plus en moi,

A qui je dis toujours que c'est la dernière année que je travaille si fort

Et qui continue la route même si elle ne me croit plus

A mes parents, pour leur soutien indispensable

A nos enfants Arthur, Hannah et Clara

A notre grande et belle famille de « Barriac », des « Anges » et de Berlin

A mon **Système Nerveux Entérique** ou peut-être **neuroendocrine**, avec qui je pense
m'être réconcilié

REMERCIEMENTS

Madame le Professeur Sabine SARNACKI, Professeur de Chirurgie Pédiatrique à l'hôpital Necker Enfants-Malades

Madame et Cher Maître, je tiens à vous remercier sincèrement pour avoir accepté de juger ce travail. Nous espérons par cette Thèse avoir pu participer à l'avancement des connaissances dans ce domaine de recherche où vous êtes pionnière. Nous avons pu apprécier votre précieuse critique pour ce travail et vos conseils avisés dans les étapes qui l'ont précédé. L'énergie et la détermination que vous insufflez dans notre société de chirurgiens pédiatres sont pour nous une source d'admiration.

Monsieur le Directeur de Recherche Michel Neunlist, Directeur de Recherche à l'unité INSERM U913 de Nantes

Monsieur Neunlist, nous sommes honorés que vous ayez accepté de juger ce travail. La participation de votre grande expertise dans le domaine du système nerveux entérique est indiscutablement précieuse pour les perspectives de cette dynamique de recherche.

Madame le Docteur Sylvie BOURTHOUMIEU, Docteur dans le service de génétique et Maître de Conférence Universitaire au CHU de Limoges, coDirecteur de Thèse

Madame le Docteur Bourthoumieu, chère Sylvie, je tiens à te remercier pour ta disponibilité, tes compétences et ton implication à tous les niveaux dans ce travail de Thèse. J'ai pu apprécié ton esprit sans concession tant pour la critique scientifique que pour l'authenticité des relations humaines. Ton soutien et ta constance m'ont permis de débiter et de mener ce travail à son terme.

Monsieur le Professeur Jean François GUERIN, Professeur de Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction au CHU de Lyon

Monsieur le Professeur, nous vous remercions d'avoir accepté notre invitation à ce jury de thèse. Nous avons pu apprécier votre disponibilité et nous espérons que ce travail sera un des nombreux et futurs ponts entre les spécialités de Médecine et Biologie du Développement et celle de Chirurgie Infantile.

Monsieur le Professeur Hubert LARDY, Professeur de Chirurgie Pédiatrique au CHU de Tours

Je tiens à vous remercier chaleureusement d'avoir accepté notre invitation à ce jury de thèse. Nous avons pu apprécier au cours de nos collaborations entre les villes de Tours et de Limoges votre dévotion confiante pour votre art. Il s'agit pour les plus jeunes d'une rampe de projection. Veuillez recevoir notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Laurent FOURCADE, Professeur de Chirurgie Pédiatrique au CHU de Limoges

Monsieur et cher Maître, je tiens à vous remercier de nous avoir confié ce travail dont la thématique revêt une importance particulière. Fort de votre expérience, vous avez judicieusement orienté les débuts de ces travaux, puis vous vous êtes employés à nous transmettre votre savoir-faire sur le modèle animal. Nous avons pu apprécier vos critiques quotidiennes qui soutendent la nécessaire vigilance. Veuillez recevoir notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Franck STURTZ, Professeur de Universités de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine de Limoges, coDirecteur de Thèse

Monsieur le Professeur, vous nous avez accueilli dans votre équipe de recherche et vous nous avez guidé tout au long de ce travail en mettant à profit à vos nombreuses qualités scientifiques et humaines. J'aurais appris auprès de vous à parfaire la démarche vers l'exigence et la tempérance. Soyez assuré de notre gratitude vraie.

Madame le Docteur Laurence Richard, Faculté de médecine de Limoges, je te remercie pour ton aide technique et ton appui qui ont fait efficacement avancer nos recherches.

Je tiens également à remercier toutes les autres **personnes de l'équipe de recherche** :

Angélique Nizou qui m'a aidé à débrouiller de sensibles problèmes d'organisation

Mes codocotorants **Maxime Jouaud** et **Flavien Bessagnet**, toujours disponibles

Anne-Sophie Lia Baldini pour son sourire, son esprit d'équipe et son écoute

Claire Demiot pour ses questions pertinentes et bienveillantes

Le **Professeur Alexis Desmoulière** pour sa bienveillance

Je tenais aussi à remercier toute l'équipe de soins sans qui les contorsions de l'emploi du temps ne seraient pas possibles : **Dr Longis** pour qui une statue doit être érigée, **Dr Grosos** et **Dr Clermidi**, tous les personnels du service sans oublier les secrétaires.

Merci au Professeur **Xavier Gamé** du CHU de Toulouse d'avoir guidé mes premiers pas dans la recherche en partenariat avec l'équipe du CNRS UMR 5089 et l'aide de **Leyre Brizuela-Madrid** et **Guillaume Andrieu**.

Droits d'auteurs



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne :

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

TABLE DES MATIERES

Remerciements	2
Table des matières.....	6
Liste des Abréviations	10
INTRODUCTION	12
PREMIERE PARTIE: ETAT DES CONNAISSANCES.....	15
A. L'intestin normal.....	15
1. Développement du tube digestif.....	15
2. Ontogenèse du tube digestif.....	17
a) Différenciation de l'endoderme ou entoblaste.....	17
b) Différenciation du mésoderme ou mésoblaste	17
c) Ontogénèse du système nerveux entérique	17
(i) Origine ectodermique ou ectoblastique	17
(ii) Migration des cellules des crêtes neurales	18
(iii) Différenciation cellules des crêtes neurales	19
(iv) Régulation de la différenciation du système nerveux entérique	20
(v) La particularité du système nerveux entérique dans l'évolution.....	20
3. Facteurs luminaux de la maturation intestinale	21
a) L'érythropoïétine	21
b) L'Acide Hyaluronique	21
c) Le G-CSF.....	21
d) L'IGF.....	22
e) Le HB-EGF	22
f) Le liquide amniotique	22
g) Les bactéries	22
4. Morphologie de l'intestin grêle	23
a) Anatomie descriptive	23
b) Structure de la paroi intestinale.....	23
c) Innervation intestinale	28
d) Systèmes de protection de la paroi intestinale.....	30
(i) Les systèmes de jonction	31
(ii) Le glycocalyx	31
(iii) Le mucus.....	31
(iv) La défense antimicrobienne.....	33
B. Atrésie de l'intestin grêle	33
1. Généralités.....	33
2. Origine des malformations et classification	34
a) Ethiopathogénie	34
b) Classification.....	34
3. Prise en charge thérapeutique.....	37
a) Diagnostic.....	37
b) Chirurgie.....	37
c) Complications	37
4. Atrésie intestinale et recherche	39

a) Etudes menées chez les nouveau-nés humains	39
b) Modèles expérimentaux de l'atrésie	40
(i) Différents modèles animaux	40
(ii) Procédé de l'obstruction intestinale : ligature et autres	43
(iii) Contribution des modèles animaux	43
c) Implication du SNE dans les dysfonctionnements intestinaux	44
C. Les différentes approches pour l'étude de l'expression des gènes des cellules du système digestif.....	46
1. L'analyse de protéomique	46
2. L'analyse par western-blot.....	46
3. L'analyse par immunomarquage	47
4. L'analyse par transcriptomique par microarray	47
D. Problématique et objectifs de travail de cette thèse	48
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	51
A. MATERIEL et METHODES	51
1. Projet	51
2. Modèle d'atrésie.....	51
a) Justification du modèle	51
b) Expérimentation animale.....	52
(i) Ethique.....	52
(ii) Protocole préanesthésique.....	52
(iii) Protocole anesthésique.....	52
(iv) Protocole opératoire	53
(v) Recueil des échantillons.....	53
3. Etude de l'expression génique.....	56
a) Extraction de l'ARN.....	56
b) Etude transcriptomique.....	56
c) Quantification par PCR en temps réel	57
4. Etude morphologique.....	59
a) Microscopie photonique	59
(i) Préparation histologique	59
(ii) Réaction PAS	59
(iii) Immunohistochimie (IHC).....	59
(iv) Etude morphométrique	61
(v) Modélisation de l'absorption intestinale	61
b) Microscopie électronique.....	62
5) Analyses statistiques.....	63
B. RESULTATS	63
1) Morphométrie	63
2) Résultats de l'analyse globale du transcriptome	66
b) Etude différentielle entre segments proximal et distal.....	67
3) Etude du SNE	70
a) Expression génique.....	70
(i) Transcriptome	70
(ii) RT-PCRq.....	75
b) Histopathologie	76
(i) Immunohistochimie	76
(ii) Microscopie électronique.....	78
4) Etude des cellules neuroendocrines.....	82

a) Expression génique.....	82
(i) Transcriptome.....	82
(ii) RT-PCRq.....	84
b) Histopathologie.....	85
(i) Immunohistochimie.....	85
(ii) Microscopie électronique.....	86
5) Etude de l'épithélium intestinal.....	87
a) Expression génique.....	87
(i) Les enzymes digestives.....	87
(ii) Les constituants de la barrière intestinale.....	89
(iii) Les agents antimicrobiens.....	90
b) Histopathologie.....	92
c) Microscopie électronique.....	93
(i) Les entérocytes.....	93
(ii) Les cellules caliciformes.....	97
6) Etude ultrastructurale de la couche musculaire.....	98
7) Etude de facteurs de maturation intestinale.....	99
8) Résultats préliminaires chez des nouveau-nés humains.....	99
a) Etude du SNE.....	100
b) Etude du système endocrine.....	100
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	103
A. Maturation de l'intestin fœtal entre E15 et E21.....	103
B. Conséquences globales de l'atrésie sur les intestins d'amont et d'aval.....	103
C. Conséquences tissulaires de l'obstruction intestinale.....	104
1) Le système nerveux entérique.....	104
2) Le système neuroendocrine.....	105
3) L'épithélium.....	110
a) Fonction de digestion et d'absorption.....	110
b) Fonction de barrière intestinale.....	111
c) Fonction de défense antimicrobienne.....	112
IV. Perspectives.....	114
CONCLUSION.....	116
publications.....	117
1. Communications orales.....	117
2. Communications affichées.....	117
3. Article.....	117
ANNEXES.....	119
Annexes-tableaux.....	120
Tableau 1 : Série des atrésies jéjuno-iléales publiées chez l'homme depuis 1999	120
Tableau 2 : Série des atrésies jéjuno-iléales expérimentales publiées chez l'animal	121
depuis 2001.....	121
Table des illustrations.....	122
Table des tableaux.....	124
Bibliographie.....	125

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

Ach : Acétylcholine

ARN : Acide RiboNucléique

CSE : Cellules du Système Neuroendocrine

DE : jours de développement embryonnaire

HES : hématoxyline éosine safran

ICC : Cellules Interstitielles de Cajal

IHC : ImmunoHistoChimie

IPAN : Neurone Afférent Primaire (neurone sensitif)

LA : Liquide Amniotique

NO : monoxyde d'azote

PCR : Polymerase Chain Reaction

PYY : Polypeptide YY

SA : Semaine d'Aménorrhée

SE : Système Endocrine Diffus

SNE : Système Nerveux Entérique

SNC : Système Nerveux central

TFF3 : Facteur TreFoil 3

TLR : Récepteur Toll-Like

5-HT : 5 Hydroxy Tryptamine ou sérotonine

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'atrésie intestinale est une malformation congénitale du tube digestif qui se définit par une interruption de sa continuité. Son incidence est de 4/10 000 naissances [1]. Il n'existe pas de cause élucidée à cette affection; particulièrement dans sa localisation jéjuno-iléale, très peu de facteurs génétiques ont été identifiés [2]. Elle nécessite une intervention chirurgicale précoce. Les suites opératoires sont grevées par des troubles fonctionnels digestifs nécessitant une longue hospitalisation. Une morbidité élevée conduisant parfois au décès de ces patients est malheureusement à déplorer pour les cas les plus sévères. Des anomalies du développement du système nerveux entérique (SNE) ont été suspectées comme étant à l'origine de ces troubles fonctionnels graves. Le SNE est organisé comme un réseau de neurones et de cellules gliales qui régulent la motilité et les sécrétions digestives [3]. Dans les cas d'atrésie, son organisation est altérée sur le segment digestif en distal (aval) mais aussi sur celui en proximal (amont) [4].

L'expression moléculaire de ces anomalies du SNE se traduit par une anomalie de sécrétion de neuromédiateurs, l'expression cellulaire en est une apoptose, l'expression histologique une modification de la taille et du nombre des ganglions des plexus nerveux et l'expression fonctionnelle une anomalie de contraction musculaire. Ces anomalies pourraient être directement responsables de la dysfonction intestinale [5, 6]. Cependant, il n'existe aucune certitude concernant les mécanismes des altérations du SNE participant aux troubles de motilité ou de sécrétions digestives observées après traitement chirurgical des atrésies congénitales. Dans la période néonatale, il est admis que le développement du SNE se réalise sous le contrôle du microbiote intestinal. Cependant, les modèles animaux nous apprennent que les troubles observés débutent dès la période anténatale. L'hypothèse est que la maturation anténatale du SNE ne s'effectue pas correctement du fait de l'absence de circulation de facteurs trophiques présents dans le liquide amniotique donc dans la lumière digestive fœtale. Cette théorie expliquerait la différence de maturation entre l'intestin d'amont et celui d'aval.

Le travail présenté ici a donc eu pour but de reprendre les éléments connus et les zones d'ombre afin de comprendre les mécanismes qui sous-tendent la physiopathologie de l'atrésie congénitale de l'intestin grêle chez l'homme. Dans la première partie, après des rappels d'embryologie qui posent les bases de la réflexion, seront exposées les connaissances actuelles sur l'atrésie intestinale tant chez l'homme que sur les modèles animaux. La deuxième partie rendra compte des travaux expérimentaux menés sur un modèle animal (atrésie chez le fœtus de rat) puis sur des prélèvements humains d'atrésie intestinale. Enfin, dans la dernière partie, nous discuterons les points importants de cette recherche et nous envisagerons les perspectives à donner à ce travail.

Partant des connaissances actuelles des mécanismes de la physiopathologie de l'atrésie digestive, nous avons pensé qu'il était nécessaire d'avoir une vision plus globale de l'expression génique des gènes intestinaux lors du développement embryonnaire et dans le cadre d'une obstruction digestive. Nous avons donc réalisé une étude transcriptomique globale (21000 gènes) basée sur un modèle d'atrésie intestinale chez le rat, modèle développé par le Pr Fourcade dans l'équipe du Pr Sarnacki. Cette étude transcriptomique a été réalisée en partie à Paris (Plateforme de transcriptomique de l'Institut Cochin) et à Limoges dans l'EA6309 (Maintenance myélinique et neuropathies périphériques). Notre attention a porté sur les modifications du système nerveux entérique, bien sûr, mais aussi sur celles des cellules épithéliales digestives et enfin sur les cellules neuroendocrines de l'intestin car celles-ci se sont révélées beaucoup plus informatives qu'on ne le pensait initialement.

PREMIERE PARTIE: ETAT DES CONNAISSANCES

PREMIERE PARTIE: ETAT DES CONNAISSANCES

Dans ce chapitre, sont rappelés les fondements du développement embryologique de l'intestin normal puis les mécanismes pathologiques de l'atrésie digestive, les différents modèles expérimentaux qui ont permis de l'étudier. Sont exposées ensuite les différentes méthodes possibles d'investigation dans cette pathologique

A. L'intestin normal

1. Développement du tube digestif

L'intestin en tant qu'organe apparaît au début de la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire (DE). Ce tube digestif primitif, également appelé intestin primitif, s'individualise à partir de la vésicule vitelline lors du phénomène de plicature embryonnaire (Figure 1).

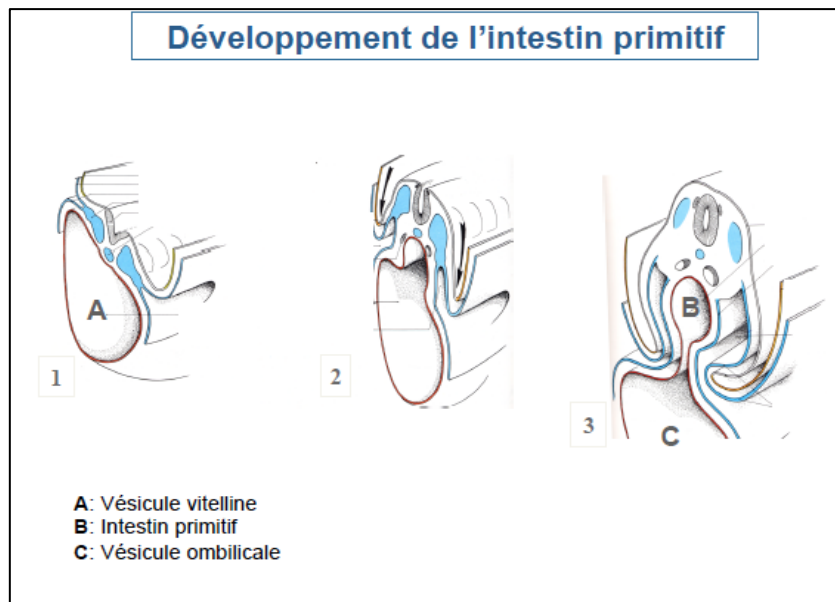


Figure 1 : Individualisation de l'intestin primitif

Individualisation à partir de la vésicule vitelline (A) avec apparition de l'intestin primitif et de la vésicule ombilicale durant le processus de plicature embryonnaire. Source : Traité d'embryologie humaine par Larsen [7]

Cet intestin primitif est rectiligne et situé dans le plan sagittal médian. Son développement se poursuit dans ce plan sagittal sous la forme d'un tube impair et médian. On le divise alors en intestin antérieur, moyen et postérieur (Figure 2) :

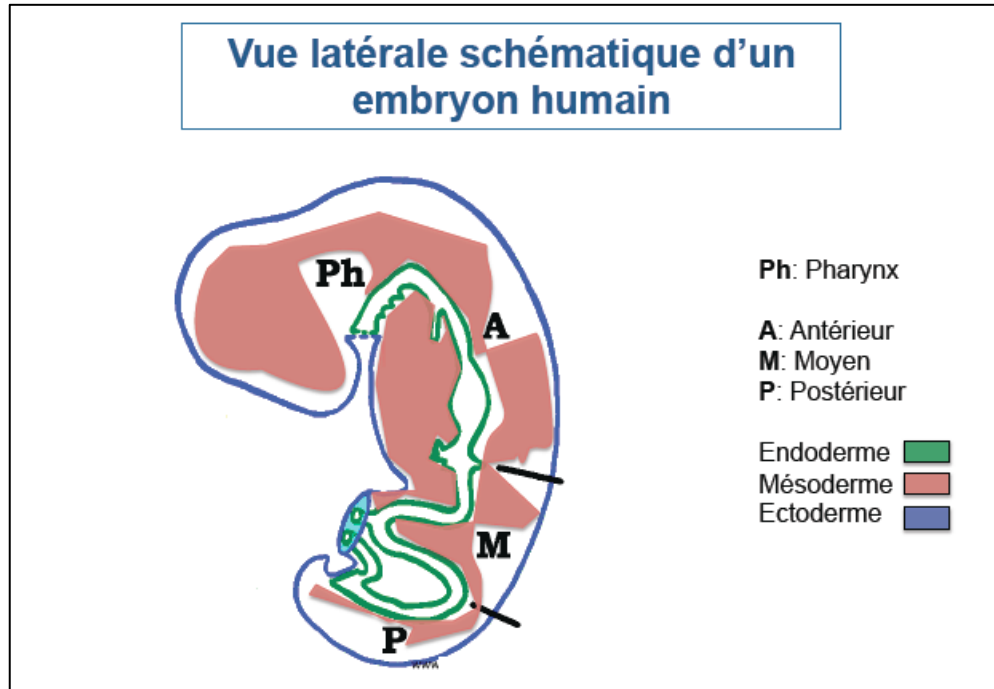


Figure 2 : Développement embryonnaire de l'intestin primitif

Vue schématisée latérale d'un embryon d'un embryon humain à 3 semaines de développement embryonnaire. Différenciation des 3 composantes pour donner l'intestin antérieur, moyen et postérieur.

-Intestin antérieur est à l'origine de l'intestin pharyngien (poches entoblastiques des arcs branchiaux), l'œsophage, l'estomac, la première partie du duodénum et des glandes annexes, foie et pancréas.

-Intestin moyen vascularisé par l'artère mésentérique supérieure est à l'origine de la partie distale du duodénum, du jéjunum, de l'iléum et du côlon droit. L'intestin moyen est relié à la vésicule ombilicale, vestige de la vésicule vitelline, par le canal vitellin.

-Intestin postérieur vascularisé par l'artère mésentérique inférieure donne le côlon transverse, gauche, sigmoïde et rectum. A la 4^{ème} semaine, la partie caudale de l'intestin postérieur en continuité avec l'allantoïde forme le cloaque. Le cloisonnement de ce dernier par le septum uro-rectal est à l'origine du sinus uro-génital dans sa portion ventrale et du canal ano-rectal pour sa portion dorsale.

Les deux extrémités du tube sont initialement fermées par des membranes qui sont restées didermiques depuis la fin de la gastrulation :

- en crânial, la membrane bucco-pharyngienne se résorbe à la 4^{ème} semaine de DE.
- en caudal, la membrane anale se résorbe à la 9^{ème} semaine de DE.

2. Ontogénèse du tube digestif

L'intestin se présente comme un tube épithélial d'origine endodermique (vésicule vitelline), doublé à l'extérieur par du mésoderme provenant des lames latérales (splanchnopleure et somatopleure).

a) Différenciation de l'endoderme ou entoblaste

Tous les épithéliums de revêtement du tube digestif, à l'exception de ceux de la cavité buccale et du tiers inférieur du canal anal qui proviennent de l'ectoblaste, sont d'origine entoblastique.

Par conséquent, toutes les cellules épithéliales (entérocytes, cellules de *Paneth*...) dérivent de l'entoblaste. Il existe une polémique quant à l'origine des cellules du système endocrine diffus. Elles étaient auparavant considérées comme d'origine ectoblastique mais il est établi qu'une grande partie d'entre elles dérive aussi de l'entoblaste [8-10]. Les glandes annexes y compris intra-pariétales du tube digestif dérivent également de l'entoblaste.

b) Différenciation du mésoderme ou mésoblaste

Le mésoblaste se différencie en une large variété de tissus. Les cellules mésenchymateuses sont des cellules multipotentes à l'origine :

- des cellules musculaires lisses formant la musculature de la paroi du tube digestif (musculeuse, musculaire muqueuse et média des vaisseaux)
- des îlots angioformateurs à l'origine des vaisseaux de la paroi du tube digestif
- des fibroblastes formant le tissu conjonctif de soutendu chorion de la muqueuse et la sous-muqueuse.
- des « cellules pace-maker » du tube digestif appelées encore cellules de Cajal

Les lames latérales du mésoblaste sont à l'origine des séreuses, le feuillet viscéral du péritoine dérive de la splanchnopleure mésodermique et son feuillet pariétal de la somatopleure (séreuses) ainsi que des méso (= les replis péritonéaux qui unissent le péritoine pariétal au péritoine viscéral).

c) Ontogénèse du système nerveux entérique

(i) Origine ectodermique ou ectoblastique

Le système nerveux entérique (SNE) dérive des crêtes neurales qui se détachent lors de la formation du tube neural vers le 21^{ème} jour de DE.

L'ectoblaste est à l'origine de la plaque neurale (ou neuroectoblaste) et de l'épiblaste (futur épiderme). La zone de jonction entre épiblaste et neuroectoblaste est constituée des cellules des crêtes neurales. Lors de la fermeture de la gouttière neurale par fusion des

bords, les crêtes neurales se détachent et s'individualisent de chaque côté du tube neural (Figure 3). Ces crêtes neurales, du fait de leur importance, ont parfois été appelées le 4^{ème} feuillet embryonnaire. Ces cellules possèdent les trois particularités essentielles des cellules souches : de grandes capacités de prolifération, de migration et de différenciation en différents types cellulaires leur conférant un caractère multipotent.

Les cellules des crêtes neurales migrent en effet vers la périphérie et se différencient en divers types cellulaires en fonction de leur localisation dans l'embryon pour donner en l'occurrence les neurones et les cellules gliales du système nerveux entérique. Cependant, leurs dérivés cellulaires sont multiples comprenant également d'autres cellules neuronales telles les neurones des ganglions sensitifs, les cellules chromaffines des glandes surrénales, des cellules satellites des ganglions telles les cellules de Schwann mais également la plupart des cellules mésenchymateuses de la face (chondrocytes et cellules musculaires lisses), les améloblastes (cellules à l'origine de l'émail dentaire), mais aussi les cellules pigmentaires de l'iris et les mélanocytes [7]. La pathologie générale des crêtes neurales est spécifiquement désignée sous le terme de neurocristopathie. Une partie des cellules neuroendocrines avaient été initialement considérée comme dérivés des crêtes neurales mais cette notion a été définitivement écartée [8-10]. Nous ne nous intéresserons ici qu'à un de leurs dérivés particuliers : le système nerveux entérique.

(ii) Migration des cellules des crêtes neurales

La migration la plus spectaculaire des cellules des crêtes neurales est sans doute illustrée par la mise en place du système nerveux entérique. Il naît ainsi par deux vagues de migrations successives. La première est crânio-caudale, à partir de deux niveaux :

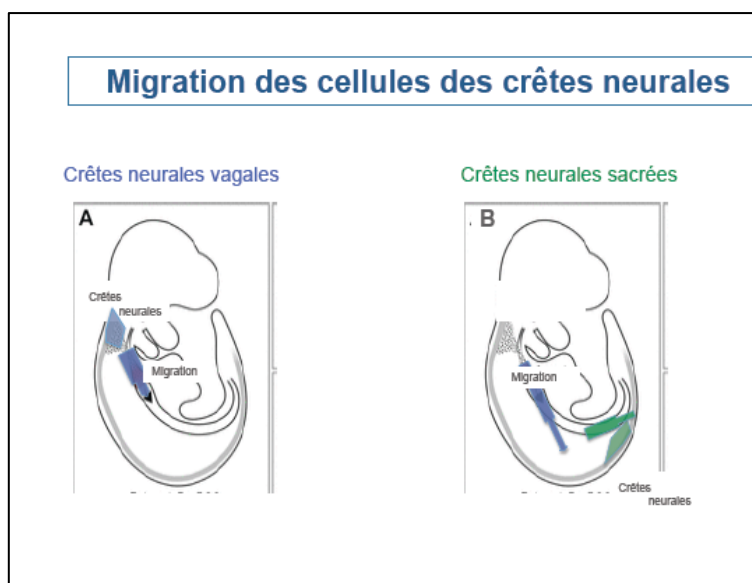


Figure 3 : Migration des cellules des crêtes neurales

Ces cellules vont coloniser l'intestin primitif à partir des crêtes neurales vagues (A) et des crêtes neurales sacrées (B). Source : Obermayer et al 2013 [11]

-les cellules des crêtes neurales vagues situées en regard des somites 1 à 7 subissent une migration ventrale pour coloniser l'intestin antérieur puis poursuivent une migration longitudinale selon un axe crânio-caudal dans la paroi du tube digestif jusqu'à atteindre sa partie toute distale (anus) vers la 9^{ème} semaine de DE (Figure 3A).

-les cellules des crêtes neurales sacrées situées au-delà de la 28^{ème} paire de somites vont coloniser la partie toute distale du tube digestif [11] (Figure 3B).

Le deuxième mouvement de migration, consécutif au premier, se fait dans la paroi du tube digestif selon un axe centripète de la périphérie vers la lumière. Ce phénomène débute avant que la migration crânio caudale ne soit terminée (Figure 4).

Initialement les cellules des crêtes neurales sont des cellules souches multipotentes. Au cours de ces phénomènes migratoires, leur potentiel de différenciation se restreint. Ce potentiel de différenciation et cette capacité migratoire sont sous le contrôle d'un réseau de gènes régulateurs et de gènes effecteurs, comprenant des signaux moléculaires et des facteurs de transcription.

(iii) Différenciation cellules des crêtes neurales

La migration crânio caudale s'étend comme un front de migration qui progresse à partir la 5^{ème} semaine de développement chez l'homme. Elle s'accompagne de la mise en place d'un réseau de connexion neuronale. Bien avant que le front ait atteint la région cloacale vers la 9^{ème} semaine, une activité électrique est déjà décelable dans ce réseau [12].

Parallèlement à cette migration crânio caudale, les cellules des crêtes neurales migrent également selon un axe centripète tout en poursuivant leur différenciation. Les cellules sont donc différenciées d'autant plus tardivement que leur emplacement définitif se situe proche de la lumière digestive et proche de l'anus. Ainsi, les cellules du plexus nerveux musculaire se différencient avant celles du plexus sous muqueux.

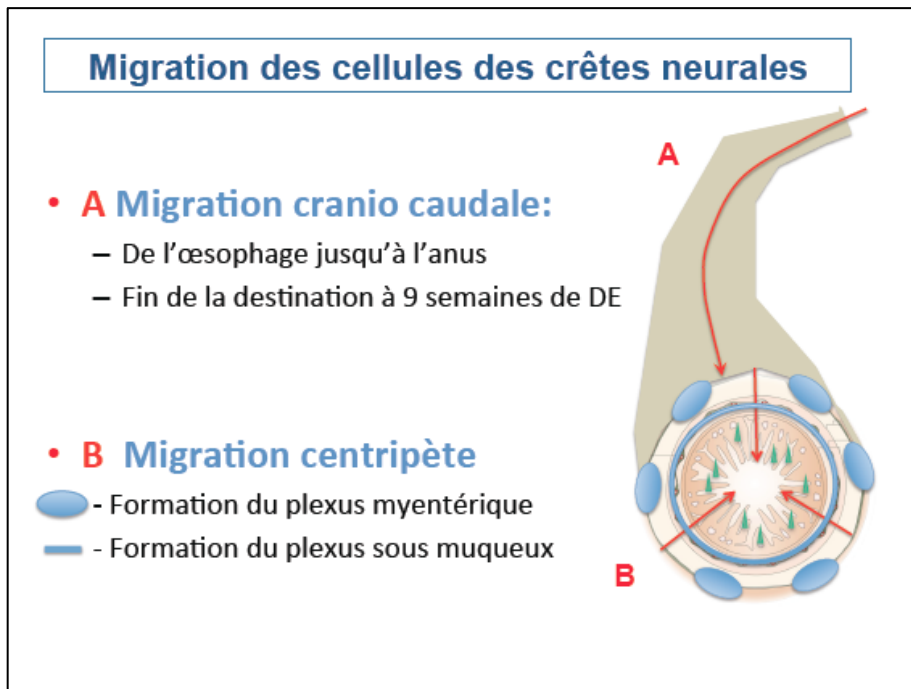


Figure 4 : Migration des cellules des crêtes neurales

Cette migration s'effectue selon deux axes : l'axe crânio caudal de l'intestin (A) puis selon une orientation centripète (B).

(iv) Régulation de la différenciation du système nerveux entérique

Les gènes connus dans la maturation du SNE sont divisés en facteurs qui inhibent la différenciation comme l'endothéline 3, SOX 8 et SOX 10 [13-15]. A l'inverse, les facteurs connus pour favoriser sa différenciation sont le liquide amniotique et plus particulièrement l'acide rétinoïque et ces récepteurs, [16], le Bone Morphogenetic Protein [17]. Ainsi, l'absence de récepteurs à la neurotrophine de type NT-3 ou Trkc induit une forte diminution de la concentration neuronale en particulier dans le plexus sous muqueux [18].

(v) La particularité du système nerveux entérique dans l'évolution

Le SNE comprend 300 millions de neurones, sachant que le système nerveux central d'un mammifère supérieur en comporte 3 milliards. Chez ces mammifères, ce système nerveux constitue aussi le deuxième ensemble nerveux en termes de nombre de neurones et pour cela certains l'appellent le deuxième cerveau [19, 20].

Une théorie phylogénétique avance que le SNE aurait été délocalisé du cerveau au cours de l'évolution dans une optique d'économie d'énergie, afin de disposer l'ensemble des neurones au plus près de la source calorifique qu'est la lumière digestive.[19]

3. Facteurs luminaux de la maturation intestinale

Les facteurs influençant la maturation du système gastrointestinal sont à la fois systémiques et luminaux [21] avec une probable prédominance pour ceux contenus dans la lumière digestive. Il s'agit pour la plupart des facteurs de croissance contenus dans le liquide amniotique ou dans le lait maternel [22]. Ils ont un fort effet trophique sur les cellules digestives immatures avant et après la naissance. A côté de ces facteurs de croissance génériques tels EGF, IGF-1, FGF, HGF, et TGF-alpha, deux autres molécules sont d'importance : l'érythropoïétine et l'acide hyaluronique.

a) L'érythropoïétine

L'érythropoïétine ou EPO est un facteur de croissance produit par le rein en réponse à l'anémie. Elle régule la production des globules rouges grâce à des récepteurs membranaires présents sur les progéniteurs érythropoïétiques. A partir de 1985 ; l'EPO de synthèse a permis de traiter l'anémie chez les grands prématurés.

Ensuite, la présence d'EPO dans le lait maternel [23] et de ses récepteurs dans le petit intestin du fœtus [24] a fait supposer un rôle dans la croissance et le développement du tractus digestif fœtal. Les récepteurs à l'EPO existent sur les entérocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les neurones, autant de cellules présentes dans l'intestin en développement. Ainsi, *Ledbetter et al* a montré son rôle protecteur à l'égard des entéocolites [25] chez le prématuré. Chez le rat nouveau né sain, le rôle érythropoïétique de l'EPO est indépendant de son absorption digestive ; cependant il agit par cette voie comme un facteur trophique intestinal en augmentant la longueur digestive et la surface villositaire [26]. Chez l'homme, l'EPO recombiné administrée par voie orale n'a aucune action érythropoïétique [27].

Dans le liquide amniotique (LA), l'origine de l'EPO semble être les reins, le placenta et le foie [28], les membranes fœtales plus que les reins ou le poumon [29]. Sa concentration dans le LA permettrait de distinguer les fœtus constitutionnellement petits de ceux présentant une hypotrophie non constitutionnelle chez qui elle serait augmentée [30].

b) L'Acide Hyaluronique

Il a un rôle dans la cicatrisation fœtale par deux voies [31]: imbibition de la peau fœtale par contact et stimulation de la production endogène par des facteurs de croissance. L'acide hyaluronique agit en augmentant la migration, la différenciation et la prolifération des cellules souches. Une étude a montré que l'acide hyaluronique contenu dans le lait maternel favorise les défenses antimicrobiennes digestives notamment contre les salmonelles [32].

c) Le G-CSF

Le G-CSF (Granulocyte (Macrophage)-Colony Stimulating Factor) est considéré comme un facteur hématopoïétique influençant le développement du tractus digestif. Les

raisons sont sa forte concentration dans le LA et le lait maternel ainsi que la forte concentration des récepteurs sur les entérocytes de l'intestin fœtal. Cependant son absorption digestive chez le rat nouveau né est très faible [33].

d) L'IGF

L'Insulin Growth Factor administré par voie orale chez le fœtus de brebis compense l'obstruction digestive haute en terme de trophicité des organes, de poids corporel total et d'épaisseur digestive [34].

e) Le HB-EGF

L'Heparin-Binding Epidermal Growth Factor appartient à la famille des EGF et a la particularité d'avoir une forte affinité pour l'héparine. On connaissait son effet protecteur notamment lors des agressions digestives, en particulier dans les ischiémies/hypoperfusions [35]. En 2002, *Michalsky et al* décrit pour la première fois sa présence dans le liquide amniotique et le lait maternel [36]. Son action est synergique des cellules souches mésenchymateuses en particulier celles extraites du LA comme prouvé récemment [37]. Il agit comme un agent chimiotactique [38].

f) Le liquide amniotique

Produit par les reins puis par les alvéoles pulmonaires du fœtus. Il a été prouvé qu'il favorise la cicatrisation nerveuse chez le fœtus de rat [39]. Son ingestion par le fœtus est aussi importante tant pour la trophicité digestive que pour celle des autres organes.

g) Les bactéries

Les bactéries sont présentes dès la naissance après contact avec le milieu extérieur. L'ensemble de ces bactéries forment le microbiote. On sait que ce dernier est indispensable à la maturation du SNE. Chez la souris, sa soustraction conduit à l'absence de développement et de maturation [40].

Tableau 1: Facteurs trophiques et de maturation pour la maturation digestive

Abréviation	Nom	Effet
EPO	Erythropoïétine	Trophicité sur entérocytes, augmente surface villositaire
AH	Acide hyaluronique	Prolifération cellules souches ; défense antibactérienne
G-CSF	Granulocyt-CSF	Développement du tractus digestif
IGF	Insulin G Factor	Trophicité sur tous les organes
HB-EGF	Epithelial G factor	Agent chimiotactique
LA	Liquide Amniotique	Trophicité digestive, cicatrisation nerveuse
Bactéries	Microbiote	Maturation du Système Nerveux entérique
Virus	Virobiote	Maturation du Système Nerveux entérique

4. Morphologie de l'intestin grêle

a) Anatomie descriptive

L'intestin comprend le petit intestin (ou intestin grêle) et le côlon. En raison de la localisation choisie de l'atrésie, nous nous intéressons ici qu'à la partie mobile du petit intestin: le jéuno-iléon. Il possède 16 à 18 anses intestinales. Le jéjunum correspond à la partie proximale de l'intestin grêle, et l'iléum à la partie distale.

Sa longueur moyenne chez l'adulte est de 6 mètres et son diamètre décroît de 2 cm à l'origine à 1,5 cm à la fin de l'iléon. Lisse et cylindrique, on lui décrit un bord mésentérique, un bord libre et deux faces. La vascularisation est de type terminal, aux dépens de l'artère mésentérique supérieure.

b) Structure de la paroi intestinale

Comme dans tout le tube digestif, il est décrit quatre tuniques au niveau du jéuno-iléon : (1) une muqueuse -constituée d'un épithélium, d'un chorion et d'une musculaire muqueuse-, (2) une sous-muqueuse, (3) une musculuse et (4) une tunique externe (Figures 5 et 6).

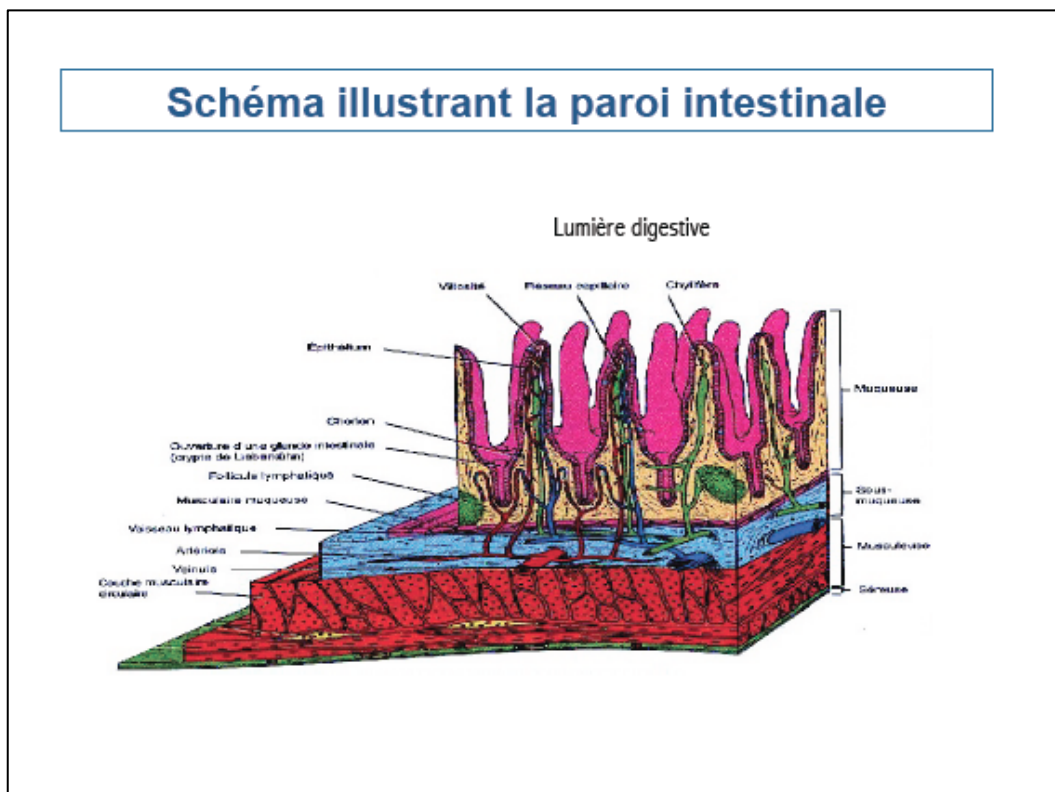


Figure 5 : Schéma illustrant la structure histologique de l'intestin

Les surfaces villositaires intestinales coloriées en rose sont bien visibles, ainsi que la sous-muqueuse surlignée en bleu.

Coupe histologique de la paroi intestinale

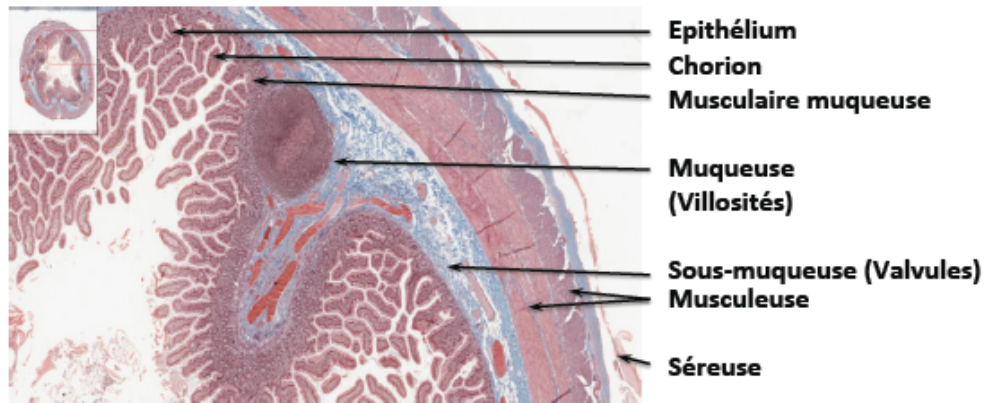


Figure 6 : Coupe histologique d'intestin humain (X200).

Coupe histologique mettant en évidence les différentes couches qui vont de l'épithélium du côté luminal jusqu'à la séreuse. Source : <https://codexvirtualis.fr/codex/tag/histologie> [41]

La muqueuse intestinale forme des replis en doigts de gant, les villosités, dont l'axe est constitué du tissu conjonctif du chorion. Ces villosités permettent d'augmenter la surface d'échange avec la lumière intestinale. A la base des villosités, s'abouchent des glandes intestinales appelées cryptes de *Lieberkhün*.

Les villosités sont recouvertes d'un épithélium prismatique simple à plateau strié composé de plusieurs types cellulaires : entérocytes, cellules caliciformes et cellules endocrines. Il repose sur un chorion formé de tissus conjonctif de soutien riche en lymphocytes formant les plaques de Peyer iléales. L'épithélium recouvrant ces plaques est riche en cellules M, cellules présentatrices d'antigène.

L'épithélium est constitué majoritairement d'entérocytes qui permettent la digestion et l'absorption des nutriments via des microvillosités apicales recouvertes de glycocalyx (ou *cell coat*), véritable maillage de surface protégeant la muqueuse des enzymes digestives. Ils sécrètent des enzymes digestives comme l'entérokinase, la lactase... On y décrit également des cellules caliciformes sécrétant du mucus ayant un rôle protecteur et lubrificateur de la muqueuse ainsi que des cellules endocrines.

Connexion entre la cellule endocrine et le réseau neuronal

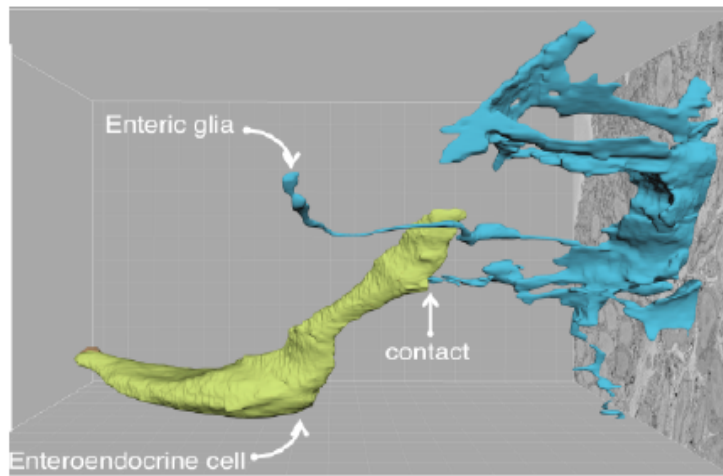


Figure 7 : Coupe de microscopie électronique

Cette coupe met en évidence le lien physique existant entre la cellule neuroendocrine (vert) et la cellule gliale (bleu). L'extrémité gauche de la cellule endocrine se situe dans la lumière digestive.
Source : Bohorquez et al, 2014 [42]

Ces dernières, encore appelées cellules entérochromaffines en raison de leur propriété tinctoriale, vont réguler et coordonner la digestion par la libération d'hormones à action paracrine ou endocrine. Les cellules endocrines au contact de la lumière intestinale par leur pôle apical vont recueillir l'information lumineuse. Par le biais d'un prolongement cellulaire basal appelé neuropore, elles vont délivrer cette information au réseau du système nerveux entérique via les cellules gliales. Ce lien physique a récemment été mis en évidence [42] par technique de microscopie électronique (Figure 7).

Au niveau des cryptes, l'épithélium comporte, outre les entérocytes et cellules caliciformes, des cellules indifférenciées permettant le renouvellement des cellules épithéliales et en particulier des entérocytes avec un mouvement continu de glissement perpétuel de la crypte vers le sommet de la villosité, des cellules endocrines et des cellules de *Paneth* (Figure 8). Les cellules de *Paneth* situées au fond des cryptes sont éosinophiles et jouent un rôle anti infectieux par la sécrétion de peptides antibactériens et antimicrobiens comme le lysozyme ou la défensine.

Schéma de la villosité intestinale en coupe

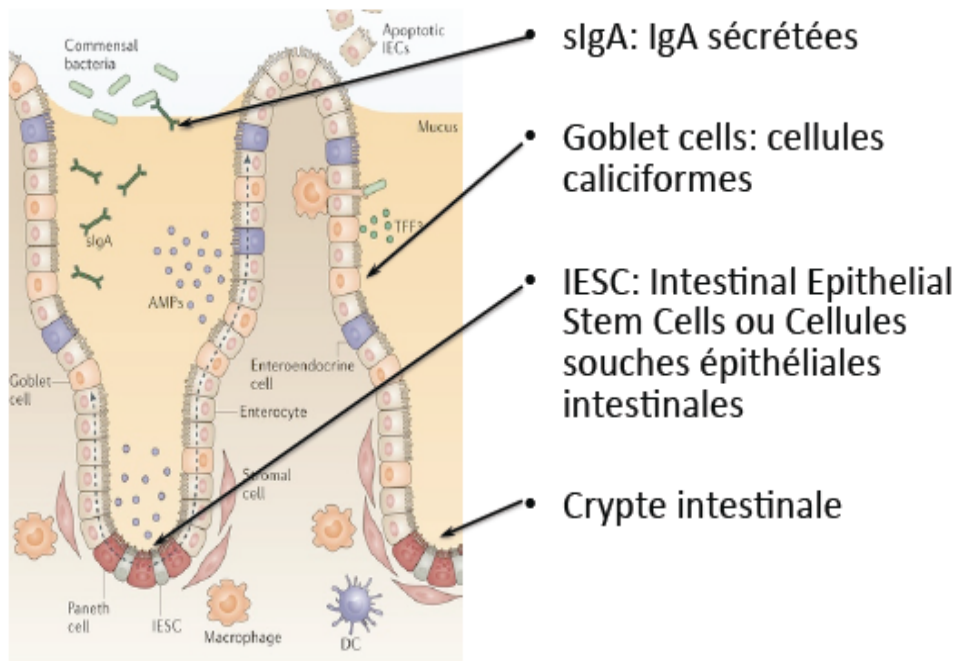


Figure 8 : Schéma de villosité intestinale avec les cellules souches épithéliales.

Au sein de cette crypte, s'organise un flux épithélial depuis la crypte jusqu'au sommet de la villosité pour les entérocytes, les cellules de *Paneth*, les cellules caliciformes et les cellules neuroendocrines.

Source : *Peterson et al*, 2014 [43]

La sous-muqueuse forme des replis visibles macroscopiquement (plis circulaires) appelés valvules conniventes qui permettent également d'augmenter la surface d'échange. Elle est constituée de tissu conjonctif vascularisé et innervé par le plexus sous-muqueux de Meissner. Celui-ci apporte l'innervation à la muqueuse et joue donc un rôle dans la régulation de la sécrétion et de l'absorption glandulaire digestive.

Coupe histologique de la musculouse

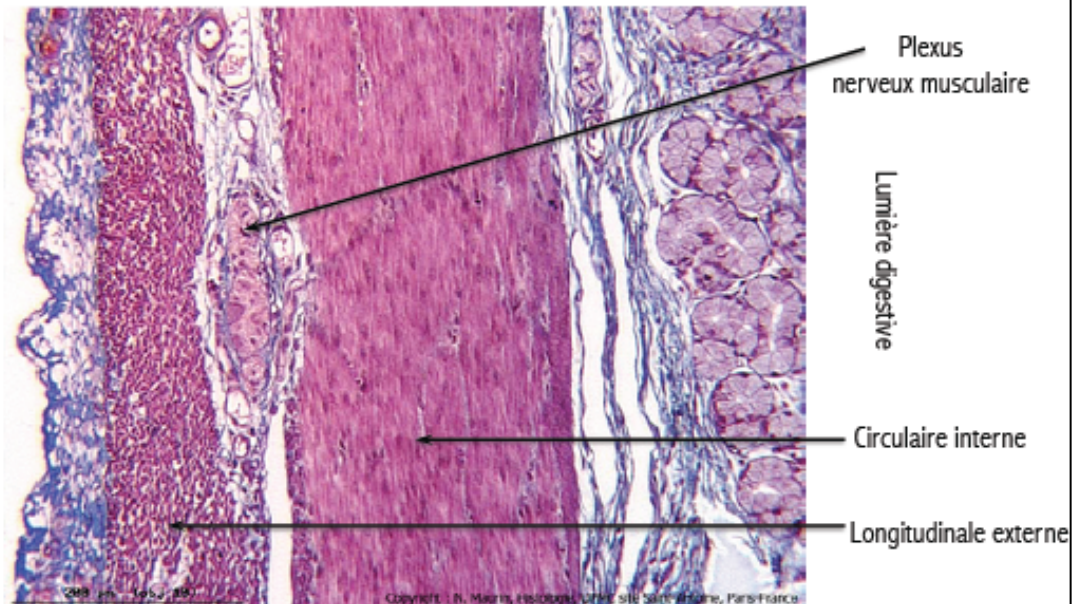


Figure 9 : Coupe intestinale à l'hématoxyéosine chez le cochon.

Cette coupe met en évidence les deux couches musculaires circulaire interne et longitudinale externe. Le plexus nerveux musculaire (dit d'Auerbach) se situe entre les ces couches. Grossissement X400.
Source : collection du Dr Maurin- Hôpital Saint Antoine- Paris

La musculouse est constituée d'une couche longitudinale externe et d'une couche circulaire interne de muscle lisse (Figure 9). Est compris entre ses deux couches le plexus myentérique d'Auerbach, maillage de cellules neuronales qui est un support de l'activité électrique et ainsi du péristaltisme intestinal. Au sein de ce réseau, sont disséminées les cellules de *Cajal* (cellules pacemaker). Ces dernières représentent 5% des cellules musculaires et comme elles sont issues du feuillet mésoblastique [7]. Elles forment un maillage relié au réseau nerveux entérique et qui régule le péristaltisme par génération d'impulsion électriques [44].

La tunique externe est une séreuse qui correspond au péritoine viscéral. Elle est constituée d'un mésothélium en regard de la cavité péritonéale qui repose sur du tissu conjonctif sous-jacent au contact de la musculouse.

c) Innervation intestinale

L'innervation extrinsèque de l'intestin grêle est assurée par le système nerveux autonome, via un contingent sympathique (plexus solaire ou cœliaque) et parasympathique (branches du nerf vague) (Figure 10). Il permet la connexion avec le système nerveux central où les fibres afférentes sont dites motrices et les fibres efférentes sensibles [45].

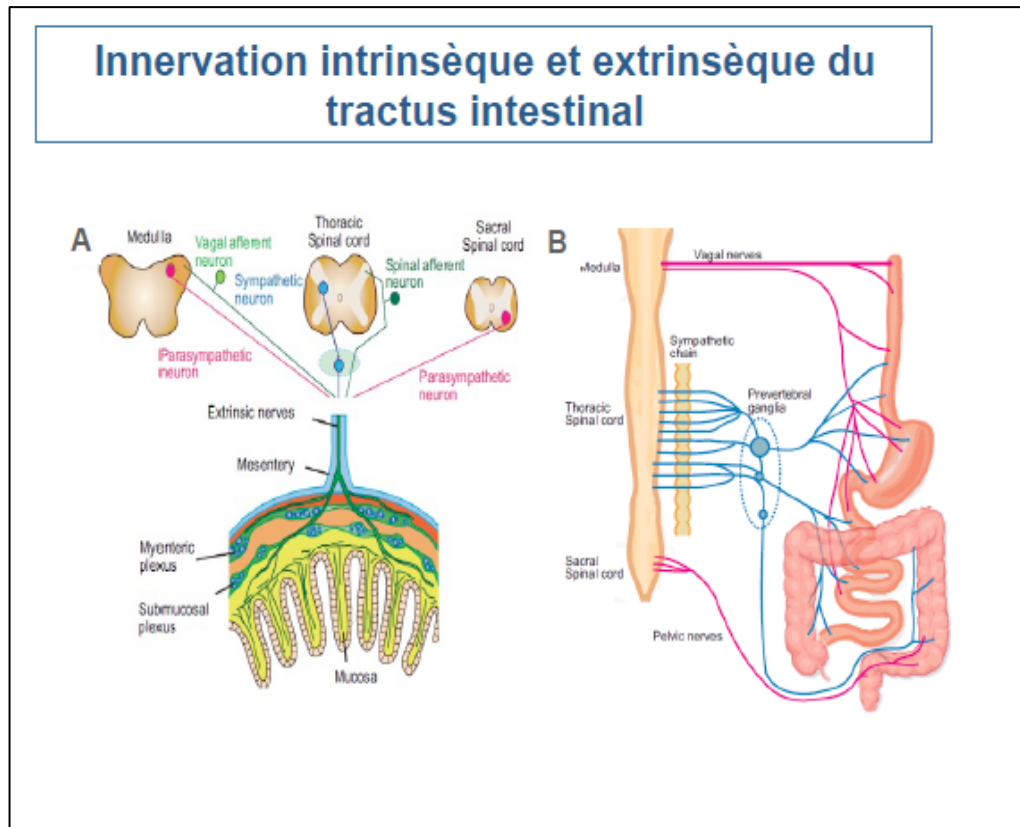


Figure 10 : Diagramme schématisant les diverses projections nerveuses.

Ces voies nerveuses projetées sur l'intestin en régulent la mobilité, les sécrétions, absorptions et flux sanguin. A : Projection des différents neurones extrinsèques pour innervent les deux plexi nerveux musculaires et muqueux. B : Innervation sympathique (bleu) et parasympathique (rose) du tube digestif. Source : Useka et al, 2016 [45]

Le système nerveux autonome innerve la paroi entérique par l'intermédiaire de deux plexus nerveux ganglionnaires qui forment le SNE : le plexus myentérique d'Auerbach et le plexus sous-muqueux de Meissner. Le plexus sous-muqueux innerve la musculature muqueuse et les glandes épithéliales et est responsable de la vasomotilité, du débit vasculaire local et de la régulation des sécrétions gastro-intestinales. Le plexus myentérique innerve la musculature et régule la motilité intestinale et le péristaltisme permettant la progression du bol intestinal. Il est plus important en termes de taille et de nombre de cellules.

Ces plexus nerveux sont constitués d'un système ganglionnaire renfermant des cellules gliales et des corps cellulaires de neurones créant une véritable ceinture nerveuse bi cylindrique à l'origine de l'innervation intrinsèque. Des corps cellulaires neuronaux partent

des prolongements ou neurites (dendrites et axone) assurant des interconnexions entre les neurones et les cellules effectrices (Figure 11).

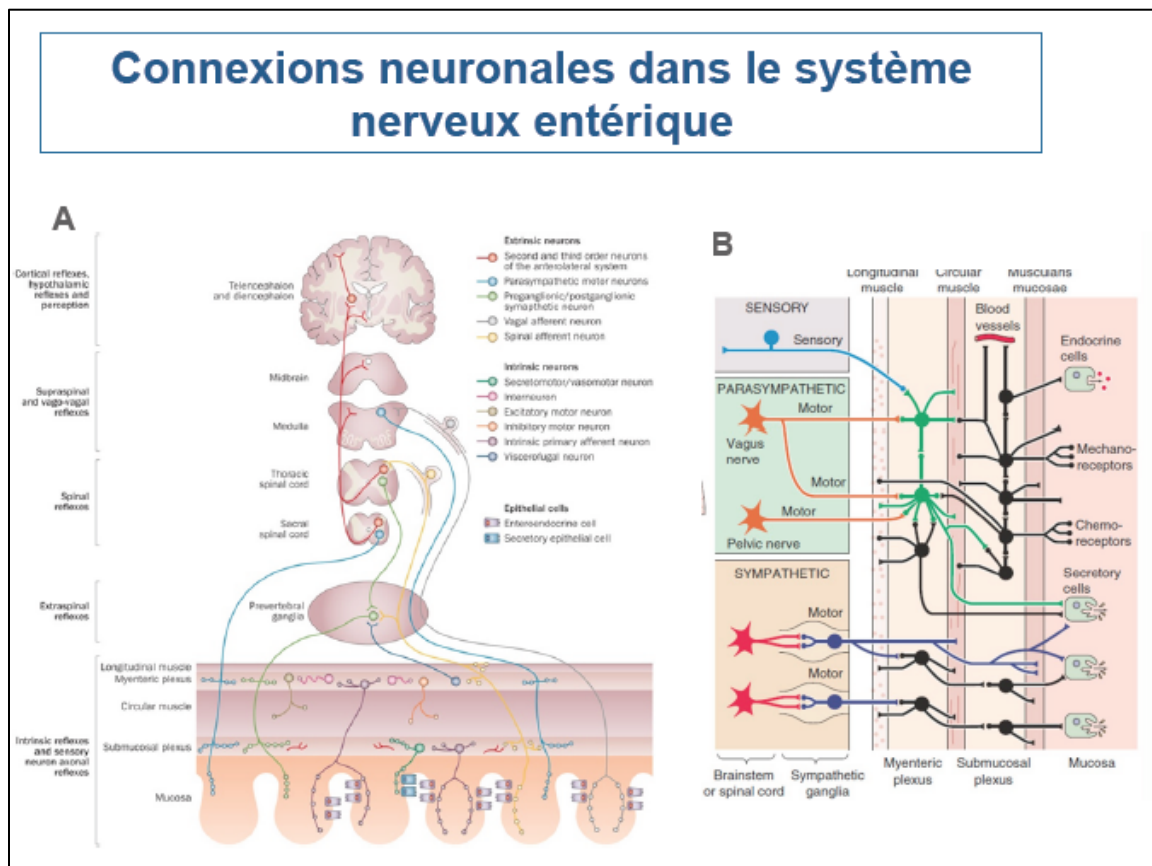


Figure 11 : Diagramme des connexions neuronales

Illustration schématique des connexions cellulaires entre les différents types neuronaux pour le système nerveux entérique extrinsèque (A) et pour le système nerveux intrinsèque (B). Source : *Brierley et al*, 2014 [46]

Ces deux plexus possèdent une composante sensitive, sensible à la distension et à la douleur. Ces neurones sensitifs sont en relation avec les barorécepteurs, les chémorécepteurs et les mécanorécepteurs de la muqueuse. Ils possèdent également une composante motrice, ils obéissent de façon réflexe aux cellules du système endocrine et aux cellules pacemaker (ou cellules de *Cajal*) pour réguler le péristaltisme intestinal, avec une influence du système nerveux central. Il existe au moins 14 sous types de motoneurones [47]. Ces motoneurones innervent les muscles, ils sont excitateurs ou inhibiteurs et régulent ainsi la motilité intestinale. Il existe également des neurones sécréto-moteurs qui régulent les sécrétions des cellules glandulaires et des neurones vasomoteurs qui régulent la vasomotricité. Les motoneurones excitateurs libèrent de l'acétylcholine au contact de la membrane des cellules musculaires lisses provoquant une contraction musculaire. Les motoneurones inhibiteurs libèrent des médiateurs différents (vasoactive intestinal peptide ou VIP, et monoxyde d'azote notamment) qui entraînent une relaxation de la fibre musculaire lisse. De très nombreux interneurones font le lien entre les ganglions des deux plexus et au sein d'un même plexus, intègrent les signaux sensitifs et organisent les réponses

excitatrices ou inhibitrices, rendant possibles les réflexes entériques tels que le réflexe péristaltique.

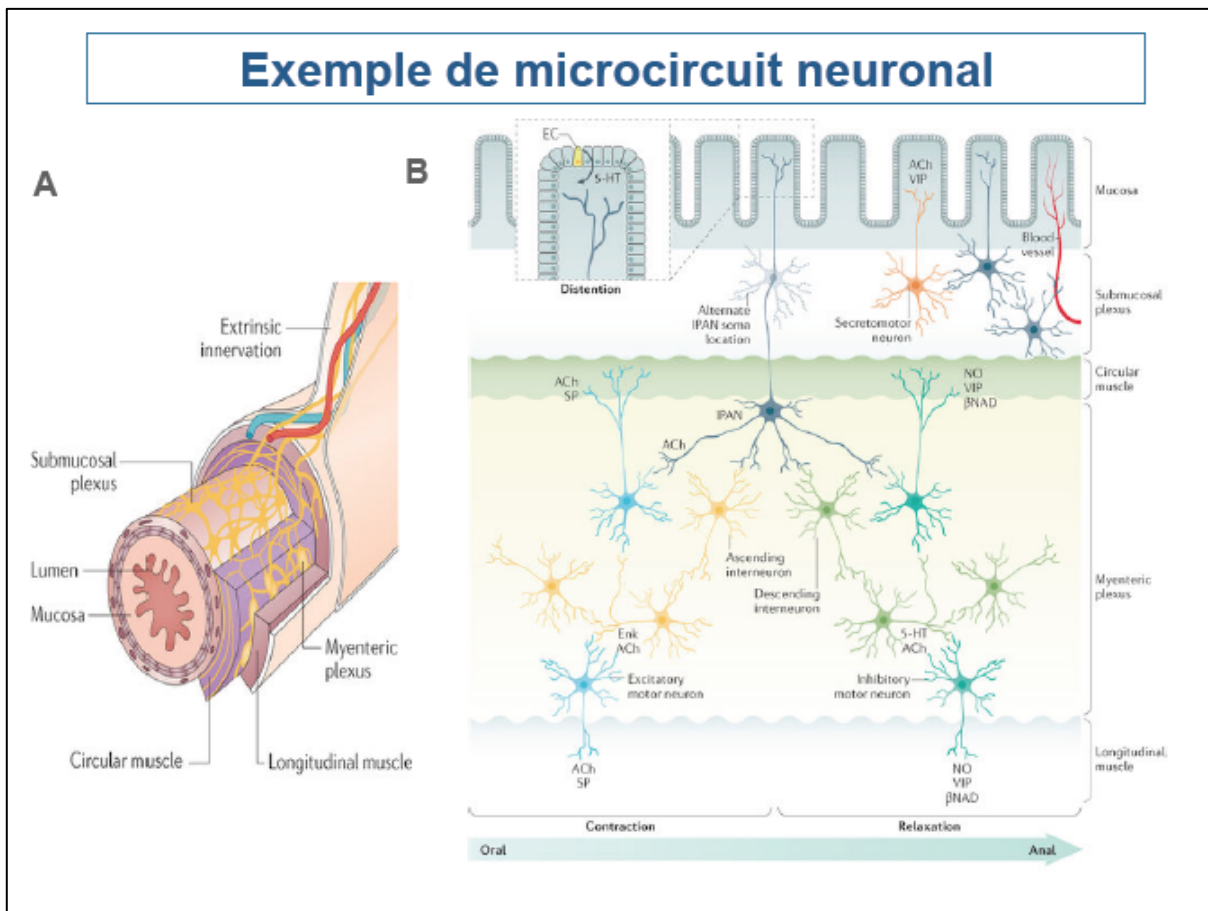


Figure 12 : Exemple de circuit neuronal.

Illustration de son support anatomique (A) constitué des deux plexi myentériques et sous muqueux permettant le péristaltisme par arc réflexe sous contrôle de stimulations luminale et orchestré par le microcircuit neuronal comprenant des Inter Primary Afferent Neurons (IPAN) (B). Source : Rao et al, 2016 [48]

Une catégorie particulière de neurones, les IPAN (Inter Primary Afferent Neurons) répondent aux récepteurs sensitifs (mécano et chémo-récepteurs) muqueux. Ils ont un trajet traversant la paroi pour rejoindre les couches nerveuses les plus profondes de la paroi.

Le neuromédiateur principal du SNE est l'Acétylcholine, elle représente 80% des neuromédiateurs du tube digestif. Il existe également des neurones dopaminergiques et sérotoninergiques.

d) Systèmes de protection de la paroi intestinale

Le tractus gastro-intestinal est en contact direct avec l'environnement extérieur, ce qui nécessite la mise en place de systèmes de protection pour maintenir l'intégrité de la paroi intestinale.

(i) Les systèmes de jonction

Les différents systèmes cellulaires épithéliaux forment une barrière épithéliale physique continue, en étant latéralement connectés les uns aux autres par des systèmes de jonctions et en particulier les jonctions serrées. Ces jonctions sont composées principalement de claudine et d'occludines. Elles jouent un rôle fondamental dans la perméabilité de l'épithélium, empêchant tout transport paracellulaire.

(ii) Le glycocalyx

Au niveau du pôle apical des entérocytes, les microvillosités sont recouvertes par le glycocalyx encore appelé *cell-coat* (Figure 13). Le glycocalyx est formé de glycoprotéines transmembranaires très hydratées formant un film hydrique protecteur de l'épithélium contre la dégradation par les enzymes digestives.

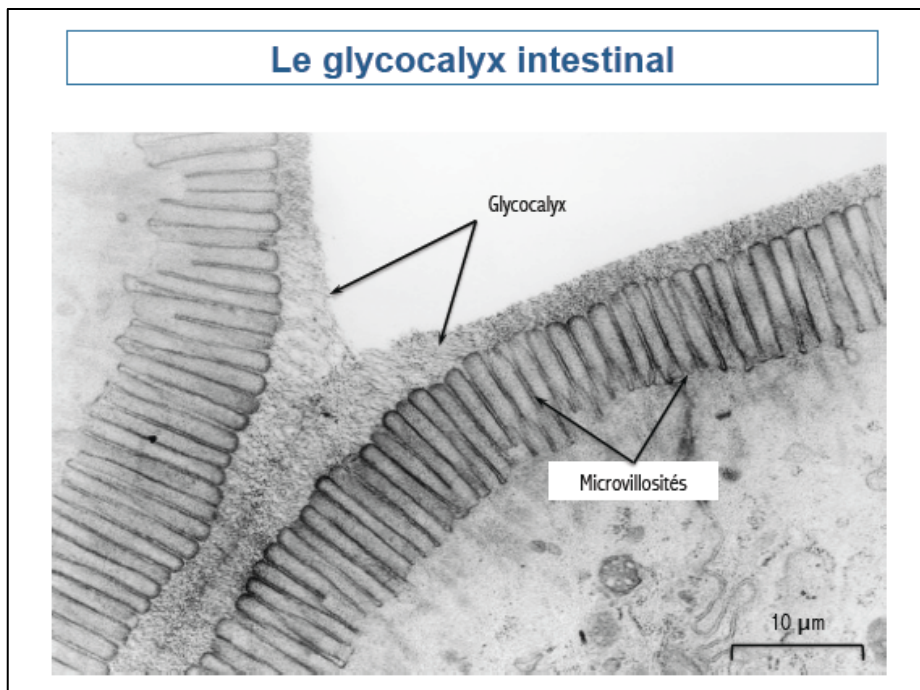


Figure 13 : Coupe des microvillosités intestinales en microscopie électronique.

Cette coupe longitudinale met en évidence le recouvrement des microvillosités du côté de la lumière digestive par un film appelé le glycocalyx. Source: <https://www.gettyimages.it/immagine/glicocalice> [49]

(iii) Le mucus

La première ligne de défense de la paroi intestinale est la double-couche de mucus sécrétée par les cellules caliciformes. C'est une structure complexe qui se compose de deux couches. La couche interne, très fine, repose sur le glycocalyx. La couche externe, en contact avec la lumière digestive, est très épaisse. De constitution poreuse, il s'agit d'une niche pour les bactéries. C'est l'ensemble des agents microbiens qui constitue le microbiote intestinal de l'hôte. Ces deux couches sont principalement composées de mucines, mais également

d'autres molécules comme le Facteur Trefoil 3 (TFF3) qui a un rôle particulier dans la viscosité et l'intégrité du mucus.

Les mucines, longues glycoprotéines composant le mucus, se composent de deux types : les mucines solubles (sécrétées) et les mucines transmembranaires. Les mucines sécrétées, comme les mucines MUC2 ou MUC5b forment le corps structural du gel muqueux. Ce dernier type se répartit sur les deux couches du mucus, et joue un rôle particulier dans la défense contre le microbiote intestinal [50]. Le second type ou mucines transmembranaires, comme les mucines MUC16 ou MUC17, sont exprimées par les entérocytes et les cellules caliciformes. La longueur de leur domaine extracellulaire est fortement variable. Ce domaine extracellulaire n'est présent que dans la couche interne et n'est pas en contact avec le microbiote intestinal. Elles sont impliquées dans les processus inflammatoires et cancéreux, notamment par modifications des sites de glycosylation post-traductionnelle. Une forte augmentation des mucines transmembranaires (spécifiques pour certains types de cancers) est associée à une carcinogenèse, alors qu'un déficit en mucines transmembranaires est lié à des processus inflammatoires [51]. Cette couche forme donc une véritable barrière de protection physique et chimique entre l'épithélium et la lumière intestinale (Figure 14).

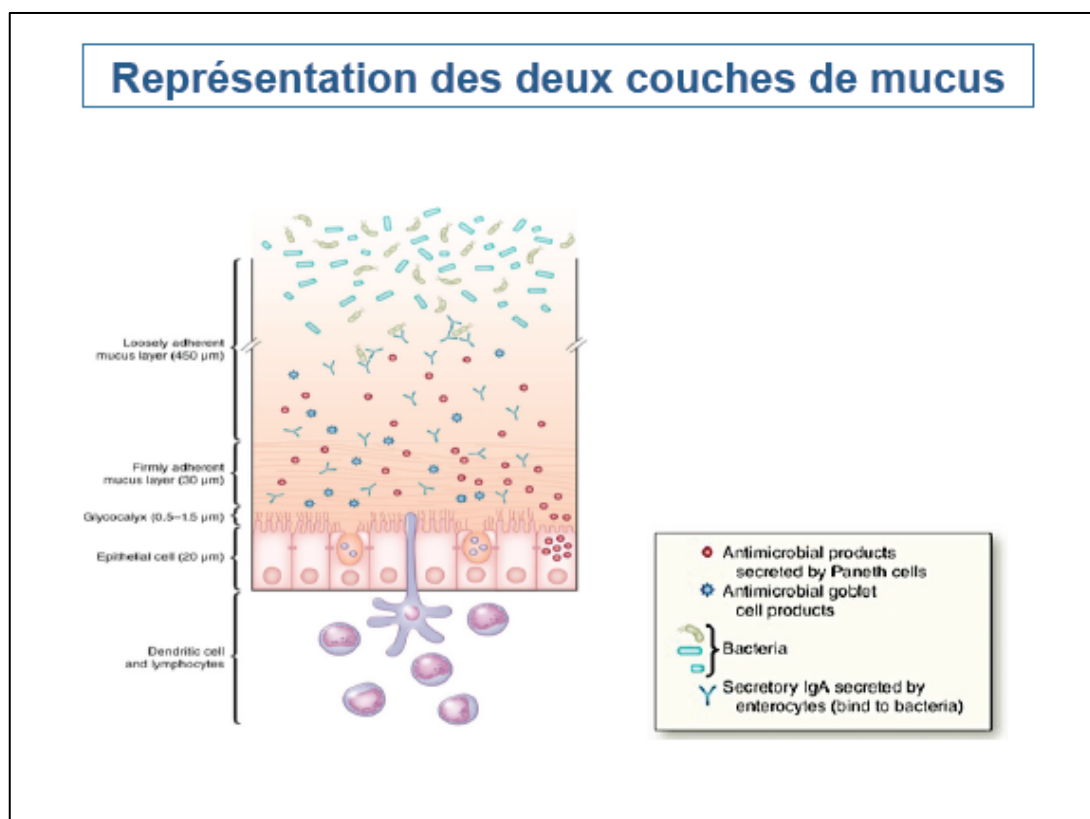


Figure 14 : Représentation schématique des couches de mucus.

Il existe deux couches de mucus recouvrant la surface des cellules épithéliales intestinales. La surface épithéliale intestinale est recouverte par une double-couche de mucus, constituée par un riche réseau de mucines et par des peptides antimicrobiens sécrétés par les différents types cellulaires épithéliaux. Ces molécules se répartissent différemment dans les deux couches de mucus. Source : Kim *et al*, 2010 [50]

(iv) La défense antimicrobienne

La colonisation par le microbiote est essentielle au développement intestinal dès les premières heures de développement. Il permet la maturation du système nerveux entérique et immunitaire lorsque les mécanismes de défense antimicrobienne se mettent en place. Cette défense par le mucus est renforcée par d'autres types cellulaires [40].

Les cellules de *Paneth* ont un rôle indispensable dans la défense antimicrobienne de l'hôte en sécrétant des peptides antimicrobiens (AMP), comme les défensines et le lysozyme. Les défensines sont séparées en deux sous-familles : les α -défensines, uniquement sécrétées par les cellules de *Paneth* et spécifiques de l'intestin grêle, et les β -défensines, sécrétées par plusieurs types cellulaires épithéliaux et retrouvées dans le tractus intestinal, mais également au niveau d'autres barrières épithéliales [52].

Le GALT (Gut Associated Lymphoid tissues) [53] est le tissu dédié à la défense immunitaire acquise de l'intestin. Au niveau de l'intestin grêle, le GALT est constitué de lymphocytes T et B qui s'organisent en agrégats de follicules lymphoïdes formant les plaques de Peyer dans l'iléon mais également des inclusions de plasmocytes et lymphocytes dans la lamina propria. L'épithélium associé à ce tissu lymphoïde est riche en cellules M, cellules présentatrices d'antigènes. Elles expriment à leur surface de nombreux récepteurs, tels les récepteurs Toll-Like, reconnaissant des antigènes spécifiques. Ces cellules permettent ainsi le lien entre défense antimicrobienne par sécrétion peptidique et défense immunitaire par activation lymphocytaire.

Les entérocytes contribuent à la défense immunitaire antimicrobienne par la sécrétion dans la lumière des immunoglobulines IgA.

B. Atrésie de l'intestin grêle

1. Généralités

L'atrésie (du grec : *a* privatif/*trésis* trou), correspond à une obstruction complète de la lumière intestinale. Etymologiquement, elle est distinguée de la sténose (du grec : *stenos* étroit/*is*) qui correspond à un rétrécissement voire une obstruction partielle de la lumière intestinale. Ces anomalies peuvent survenir à n'importe quelle hauteur du tube digestif mais nous nous focalisons sur le jéjunum et l'iléum. Leur localisation anatomique définit leur présentation clinique avec des vomissements plus ou moins précoces.

L'atrésie se présente donc comme une obstruction de la lumière intestinale qui s'interrompt en un segment court et atrétique bordé de part et d'autre par un intestin d'amont généralement dilaté et un intestin d'aval grêle.

L'atrésie jéjuno iléale est une malformation congénitale du tube digestif qui se définit par une interruption de sa continuité. Son incidence se situe entre 1/1500 et 1/5000

naissances [54]. L'atrésie est incompatible avec la vie et nécessite une prise en charge chirurgicale néonatale. Elle consiste en un rétablissement de la continuité par anastomose termino-terminale. Les suites opératoires sont grevées par des troubles fonctionnels digestifs lors de la reprise de l'alimentation nécessitant une longue hospitalisation. Une morbidité élevée conduisant parfois au décès de ces patients est malheureusement parfois à déplorer. L'interruption anténatale de la continuité digestive est probablement à l'origine de ces troubles partiellement réversibles lors de la remise en continuité digestive par la chirurgie néonatale.

2. Origine des malformations et classification

a) Ethiopathogénie

Même si la cause de cette malformation n'est pas explicitement connue, plusieurs théories ont été avancées. Dans le cas de l'atrésie jéuno-iléale, il semblerait qu'un incident vasculaire intra-utérin (aux alentours de 12 semaines de DE) soit en cause sur le territoire de l'artère mésentérique supérieure. Lorsque ce phénomène ischémique est très proximal sur le territoire vasculaire, il en résulte un intestin très court comme dans l'*Apple Peel Syndrome* (voir forme IIIb de la classification au chapitre suivant).

Certains agents toxiques pour le développement vasculaire tels des vasoconstricteurs (tartrate d'ergotamine, cocaïne, éphédrine, nicotine, ergotamine, caféine et pseudoéphédrine) ont été mis en cause [2]. Des hypothèses alternatives avec des mécanismes malformatifs moins satisfaisants, tels que l'invagination intestinale *in utero* [55], la perforation intestinale, le volvulus segmentaire, la thromboembolie, la thrombophilie et l'inflammation intra-utérine ont été avancés. Le terrain génétique ou les anomalies chromosomiques ne semblent ici pas en cause à la différence de l'atrésie duodénale. Ainsi, malgré des lacunes de compréhension quant au mécanisme précis de cette affection, l'hypothèse la plus probable serait donc soit une ischémie durant le second trimestre de grossesse. Les formes syndromiques sont plus rares et concernent quasi exclusivement les atrésies étagées (cf. chapitre suivant).

b) Classification

La sténose en tant que simple rétrécissement segmentaire ne fait pas partie des stades de la classification (Figure 15).

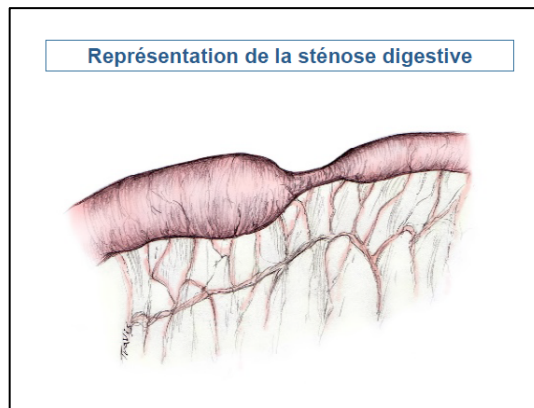


Figure 15 : Représentation schématique de la sténose intestinale.

La sténose digestive est caractérisée par un rétrécissement et non une interruption de la lumière digestive. La sténose congénitale pourrait néanmoins répondre à la même étiologie que l'atrésie. Source : Medscape 2017 [56]

La Classification la plus commune est celle de *Grosfeld et al* [57]. Il s'agissait de la classification de *Louw et al* modifiée [58]. Elle rapporte 5 types d'atrésie jéjuno-iléale [59] :

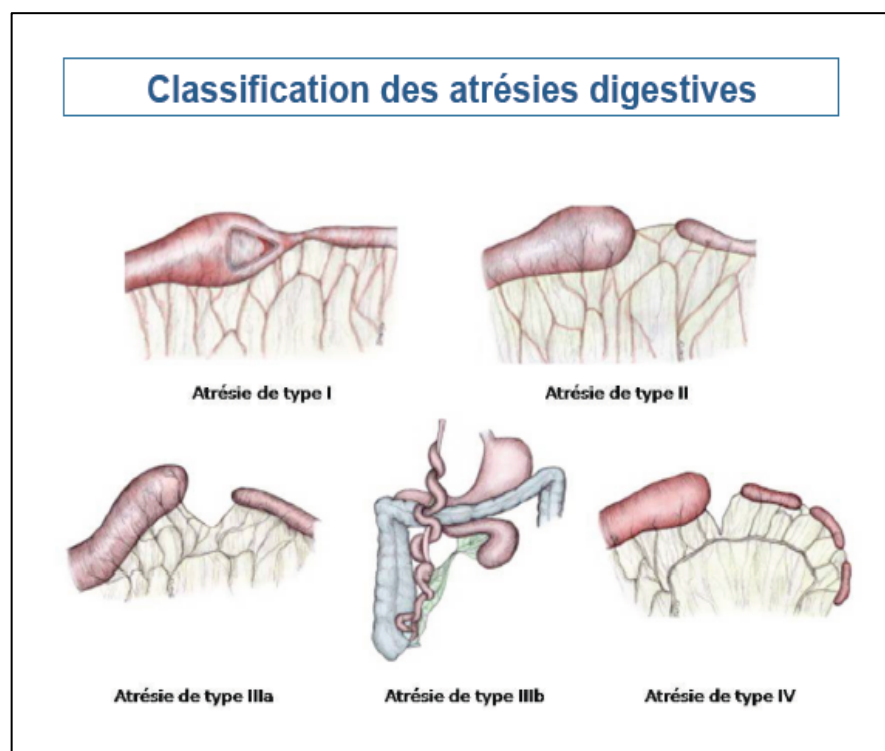


Figure 16 : Classification des atrésies jéjuno-iléales selon *Grosfeld* [57]

Représentation schématique des 5 types de sténose jéjuno-iléale. Source : Medscape 2017 [56]

Type I : membraneux

C'est une atrésie muqueuse ou septale avec un mur intestinal sain. Une cloison membraneuse sans signe visible de l'extérieur obstrue la lumière intestinale.

Elle se caractérise par (Figure 16) :

- Une continuité intestinale (entre le segment dilaté et le segment étroit)
- Un méésentère intact
- Un segment intermédiaire conique dû à la pression exercée sur les murs intestinaux.
- Une longueur intestinale normale

Type II : Extrémités borgnes reliées par un cordon fibreux

C'est une atrésie complète présentant comme solution de continuité un cordon fibreux entre les parties proximales et distales.

Elle présente (Figure 16) :

- Une discontinuité intestinale
- Un méésentère souvent intact mais présentant parfois une forme de « V » au niveau atrétique
- Une longueur intestinale normale

Type IIIa : Extrémités borgnes disjointes

C'est l'atrésie la plus fréquente. Elle reflète une anomalie de résorption intra-utérine de l'intestin fœtal dû à une ischémie. On note l'absence de cordon fibreux et de segment intermédiaire.

On retrouve (Figure 16) :

- Une interruption de la continuité intestinale
- Une absence de méésentère, créant ainsi un écart en « V »
- Une longueur intestinale réduite.

Type IIIb : Atrésie en pelure de pomme ou arbre de Noël ou Apple Peel Syndrome

Elle reprend les principales caractéristiques du type IIIa mais l'écart méésentérique est plus étendu (Figure 16). On retrouve ainsi:

- Un segment d'amont situé près de l'angle de Treitz
- Une absence de l'artère méésentérique supérieure en distalité
- Un segment d'aval collabé et mal vascularisé, organisé en hélice autour d'une artère marginale engendrant des atrésies de type I ou II
- Une longueur intestinale réduite

Type IV : Atrésie multiple, en série

C'est la succession simultanée d'atrésie de type I, II ou III formant une suite d'obstacles en série dans la lumière digestive (Figure 16).

Ce type est probablement à singulariser des précédents par son déterminisme. Des mutations génétiques ont pu être identifiées chez les patients atteints qui présentent de manière associée un déficit immunitaire et parfois une inflammation digestive [60, 61].

3. Prise en charge thérapeutique

a) Diagnostic

L'atrésie étant une anomalie congénitale, le challenge est son diagnostic pendant la période anténatale, c'est à dire durant le suivi obstétrical. Les principaux signes évoquant une atrésie intestinale chez le fœtus sont des signes indirects secondaires au syndrome occlusif fœtal. Depuis l'avènement de l'échographie fœtale il y'a plus de 30 ans [62], ce syndrome occlusif est diagnostiqué dès le deuxième trimestre. Sont visibles l'hyperéchogénicité, la dilatation des anses intestinales et l'excès de liquide amniotique conduisant à un poly hydramnios. L'atrésie intestinale reste le premier diagnostic évoqué devant un syndrome occlusif fœtal.

Cependant, les limites sont doubles : tout d'abord le manque de spécificité échographique lorsque une dilatation iléale est diagnostiquée [63]. Aujourd'hui encore, il est difficile en période anténatale de trancher avec les diagnostics différentiels tels les atrésies coliques, les malformations anorectales et la mucoviscidose. Sur les points d'appel décrits ci-dessus, est réalisée en complément une IRM fœtale dès 26 semaines d'aménorrhée. Sont alors visibles des anses dilatées, présentant un hypersignal. Ces examens ne permettent que très rarement de préciser le niveau colique ou intestinal de l'atrésie.

La naissance est orientée vers une maternité comportant une réanimation et chirurgie pédiatriques. Après l'accouchement, lors de l'examen du nouveau-né, l'examen initial peut être normal. A divers degrés, sont constatés une distension abdominale signant le syndrome occlusif puis la survenue de vomissements en cas d'alimentation. L'absence de méconium après 24 à 48 heures de vie est pathognomonique de ce syndrome occlusif. Celui-ci est confirmé par la radiographie de l'abdomen sans préparation qui retrouve des niveaux hydro-aériques et l'échographie.

b) Chirurgie

Le traitement est une prise en charge chirurgicale dans les premiers jours de vie par laparotomie exploratrice. Le geste consiste en une exérèse complète ou partielle de la région atrétique avec une résection-anastomose entre les deux segments d'amont et d'aval. Des artifices chirurgicaux par remodelage des segments sont parfois nécessaires en raison des grandes différences de calibre entre amont et aval.

c) Complications

Il existe deux situations pourvoyeuses de morbidité dans l'atrésie digestive : l'insuffisance de longueur de l'intestin grêle et la présence de troubles fonctionnels (dysmotricité, troubles d'absorption et de perméabilité) sur un intestin de longueur normale, le cumul de ces deux situations étant possible. Le jéjuno-iléon est un organe vital dont la

vascularisation est terminale, permettant l'absorption des nutriments, vitamines et oligoéléments. Plus la longueur d'intestin est réduite (malformation de type IIIb par exemple), moins l'absorption sera efficace et plus les carences seront précoces. En découlent donc stéatorrhées, anémies macrocytaires, troubles du transit et du développement staturo-pondéral par malnutrition. Dans la période néonatale, il s'agit principalement de l'absence de prise de poids.

La survie post chirurgicale s'est considérablement améliorée ces dernières décennies principalement grâce aux travaux conjoints des équipes d'anesthésie, de chirurgie et de réanimation. Cette survie reste avant tout liée à la longueur d'intestin présente à la naissance [64]. Les complications liées au geste chirurgical lui même sont variables d'une équipe à l'autre mais en général peu fréquentes (principalement la fuite anastomotique et l'occlusion mécanique avec une fréquence de moins de 10%). Dans une série récente [65] d'atrésie digestive dont 40 atrésies jéuno iléales, les complications étaient de 30% dont 12% de fuites anastomotiques, 12 % de syndrome occlusif et 6% d'infection de site opératoire.

Le problème crucial au décours de la cure chirurgicale des atrésies intestinales est la rapidité du retour à une fonction intestinale normale, définie par l'autonomie digestive complète ; certains enfants mettent en effet plusieurs semaines voire plusieurs mois à recouvrer une nutrition entérale complète [1, 54, 66]. Avant la fin de cette période, ils sont dépendants des apports caloriques par voie intraveineuse, avec les complications intrinsèques qu'elle comporte. L'étude la plus récente rapporte des résultats encourageants même pour des enfants avec une longueur d'intestin courte, probablement au bénéfice d'un programme de « rééducation digestive » [67]. Sur une population de 118 patients présentant une atrésie intestinale, 5% sont décédés avant leur sortie de l'hôpital. Vingt d'entre eux (17%) sont sortis avec une nutrition parentérale. Leur longueur d'intestin grêle était mesurée en moyenne à 22cm. Parmi ces 20 patients, 2 sont décédés, 4 ont été transplantés et 14 ont été sevrés.

D'autant plus lorsque la longueur d'intestin est normale, ce retard d'autonomisation digestive n'est pas bien compris. Même actuellement le pronostic est compliqué malgré les progrès du diagnostic prénatal [68].

La principale limite vient du fait que les facteurs pronostics sont mal établis. Les seuls rapportés à ce jour sont : (1) le poids de naissance; (2) la prématurité [69], (3) le niveau de l'obstruction digestive [70], (4) l'importance de la dilatation [71, 72] et (5) la conservation de la valvule iléo-caecale [73]). Ils ne permettent pas de déterminer le degré des lésions du grêle à la naissance et de préjuger de son caractère fonctionnel. Les espoirs apportés par le dosage dans le liquide amniotique des enzymes digestives [74] n'ont pu être vérifiés. Seule l'évolution postopératoire lors des tentatives itératives de réalimentation orale permet de constater la présence ou non de complications fonctionnelles.

Le traitement adopté pour ces complications est le plus souvent symptomatique : nutrition parentérale. Plus rarement, une réintervention chirurgicale est décidée et aboutit à une dérivation digestive. Ce traitement est responsable d'une morbidité qui est intimement

associée aux complications de la nutrition parentérale (retentissement sur la fonction hépatique [59] et sur la fonction intestinale) et à la chirurgie (création d'adhérences et de brides et complications des entérostomies [75]).

Par ailleurs, lors des tentatives d'alimentations entérales, le pronostic est grevé par les translocations bactériennes responsables de la mortalité élevée en post-opératoire [76]. Outre les atrésies intestinales, ce type de problème peut être rencontré dans les occlusions néonatales chroniques telles que certains laparoschisis, dans la maladie de Hirschsprung étendue voire dans certaines malformations anorectales hautes.

4. Atrésie intestinale et recherche

a) Etudes menées chez les nouveau-nés humains

Depuis 1999, neuf séries focalisées sur l'atteinte du SNE dans les atrésies jéjuno-iléales du nouveau-né ont été publiées. Les résultats sont résumés dans le tableau 1 en annexe. Elles concernent des nouveau-nés avec un terme de naissance compris entre 34 et 40 semaines d'aménorrhée, présentant des types d'atrésie II, III ou IV selon la classification de *Louw et Grosfeld* [57]. Les expertises menées sont très variées mais la principale méthode d'analyse du SNE est l'immunohistochimie.

Masumoto et al [77] étudient le SNE, les muscles et les cellules de Cajal sur une série de 8 patients. Il décrit sur le segment proximal une réduction de la densité et de taille des ganglions nerveux alors que le segment distal est proche des intestins contrôles. La musculature est hypertrophique et le nombre de cellules de Cajal est également augmenté en proximal. *Watanabe et al* [78] décrivent par une analyse purement morphologique une augmentation du diamètre en amont et un segment d'aval normal. *Khen et al* [79] comparent le profil du SNE de 22 patients porteurs d'atrésie avec 31 patients fœtus contrôle. A partir de ces derniers, ils décrivent le processus de maturation physiologique anténatal des ganglions nerveux sur les deux derniers trimestres de grossesse. La conclusion est une accélération de maturation du segment proximal et surtout une diminution de la maturation du segment distal. *Ozguner et al* [80] s'intéressent pour la première fois à l'extension spatiale de ces perturbations sur le SNE et le muscle. Les neurones sont analysés par marquage de la synaptophysine. Les anomalies observées sont l'hypertrophie musculaire avec fibrose et la diminution de la densité ganglionnaire en amont, l'hypotrophie musculaire et la diminution de taille des ganglions en aval. Ces anomalies sont maximales dans leur intensité sur une distance de 1 cm tant en proximal qu'en distal. Sur le segment proximal, elles s'étendent jusqu'à 4 cm et sur le distal jusqu'à 2 cm de l'atrésie. Avec une série de patients plus importante, *Wang et al* [81] confirment la longueur pathologique de 3 cm en aval. Pour la partie proximale, ils retrouvent une longueur pathologique de 2 voire 10 cm pour certains marqueurs, qui sont différents de celui utilisé par *Ozguner et al* [80].

Ramachandran et al [4] étudient l'architecture du SNE sur une série de 6 patients en faisant appel à la technique « *Whole Mount* ». Il est décrit ainsi une perte de cette architecture normale par le marquage de l'acétylcholine estérase et une architecture normale lorsque NADPH est marqué. Un patient présentant une atrésie de type IV est également analysé : il existe une perte architecturale avec absence de neurones. Sur une série identique, *Gfroerer et al* [82] retrouve des modifications de marquage des neurones, cellules gliales et cellule de Cajal uniquement sur le segment d'amont. Enfin, l'étude la plus récente s'est intéressée à l'inflammation tissulaire par le biais de l'expression génique de diverses molécules: cytokines, interleukines, NO synthase et interféron gamma [83]. Il était retrouvé une inflammation plus importante sur les segments d'amont. Dans cette même étude, l'expertise a été réalisée sur 8 patients, il n'a pas été retrouvé de différence entre les segments pathologiques et les intestins témoins.

Les résultats de ces études sont plutôt disparates. Ils n'apportent malheureusement pas de réponse claire sur la vraie implication du SNE dans la genèse des troubles observés chez ces patients.

b) Modèles expérimentaux de l'atrésie

(i) Différents modèles animaux

Afin de tenter de comprendre la physiopathologie des atrésies, plusieurs modèles expérimentaux ont été élaborés. Il existe principalement 4 types d'animaux : le poulet, la souris, le rat et le mouton. Le principe reste le même : induire une obstruction digestive fœtale et recueillir le matériel digestif afin de l'expertiser et de le comparer à un intestin normal. Le tableau 2 présenté en annexe récapitule les différents modèles animaux publiés depuis les années 2000.

Le modèle le plus utilisé dans les dernières années est celui du rat [84]. Le principe consiste à réaliser une obstruction intestinale par ligature chirurgicale aux alentours du 18^{ème} jour de gestation [84] (Figure 17). L'intestin est recueilli par sacrifice en fin de gestation soit au 21^{ème} jour. Il est utilisé de manière courante en raison de sa bonne faisabilité technique et de sa reproductibilité chez un mammifère qui reste proche de l'homme. Il a déjà été mis au point et exploité par plusieurs équipes et ce depuis plusieurs années [79, 84].

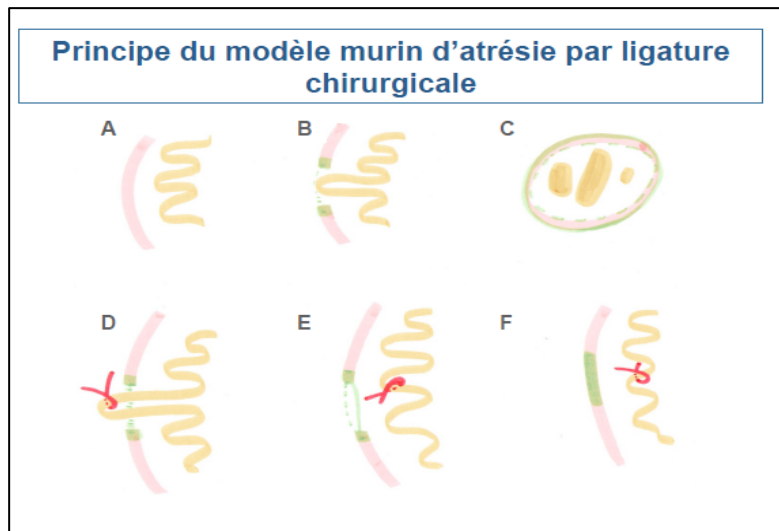


Figure 17 : Modèle murin d'atrésie jéuno iléale

Au 18^{ème} jour de gestation chez le rat ou la souris (A), confection d'une bourse péritonéale sur le fœtus (B) précédant la laparotomie et l'extériorisation des anses jéunales (C). Ligature chirurgicale mécanique d'une anse digestive (D) avant de la réintégrer dans l'abdomen et de resserrer la bourse (E). Un syndrome occlusif se constitue ainsi jusqu'à la délivrance (F) alors que la paroi abdominale cicatrise.

D'un point de vue du développement, la fin de la migration des crêtes neurales au niveau de l'anus a lieu au 14^{ème} jour chez le rat. L'ensemble des précurseurs neuronaux et gliaux du SNE est donc en place au moment de la ligature. Celle-ci survient donc dans une phase de maturation du SNE alors que l'activité électrique a déjà débuté le 11^{ème} jour. La phase de maturation, elle, se poursuit jusqu'au sevrage. Tous ces phénomènes sont résumés dans la figure 18. Cet aspect a pu être étudié chez les rats normaux [85] mais ne peut être étudié chez les fœtus ligaturés qui ne sont pas viables.

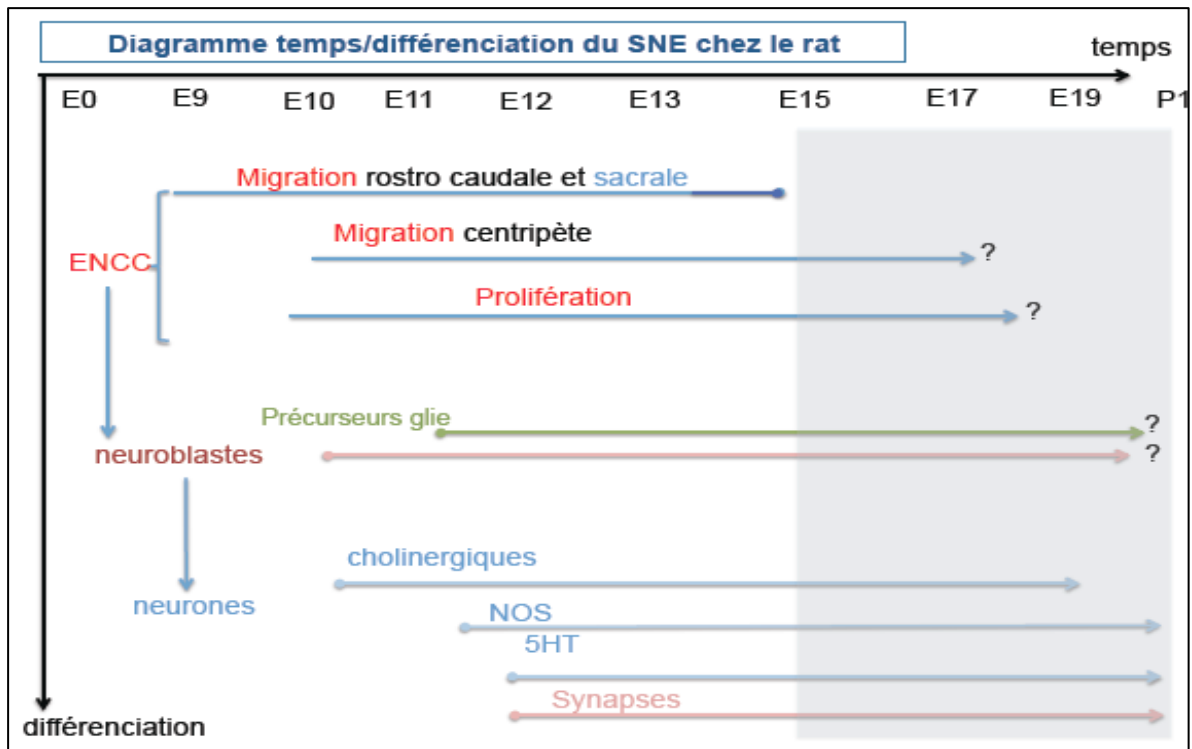


Figure 18 : Différentes étapes de différenciation des cellules issues du SNE.

Légende : la zone grisée correspond à notre étude. Abréviation : ENCC : cellules nerveuses intestinales indifférenciées issues des crêtes neurales; NOS : NO synthase; 5-HT = sérotonine.

Dans un modèle d'obstruction chronique réalisé chez des rats adultes [86], il a été prouvé que l'obstruction créée après la naissance n'avait que peu de retentissement sur le système nerveux digestif. Il est donc avancé l'hypothèse que pour avoir un caractère fonctionnel, l'obstruction doit survenir avant la naissance au cours du développement. Son exploitation a permis diverses découvertes sur le SNE : histologiques avec une altération des plexus, une raréfaction des cellules neuronales sur le segment d'amont [84], des altérations plus modérées des plexus en aval [87] mais également moléculaires et histochimiques. Il a été démontré également des modifications en rapport avec les phénotypes neuronaux [83] concernant autant le segment proximal que le distal avec des conséquences fonctionnelles sur la perméabilité et la mobilité digestive [83], ces données étant observées également chez l'homme.

Le modèle de la souris est très proche de celui du rat. La taille de l'intestin représente la principale limite pour la réalisation de l'obstruction digestive. Le modèle utilise donc des spécimens adultes avec création d'une occlusion partielle par clips [88].

Le modèle le plus répandu après le rat est celui du poulet avec un modèle d'obstruction soit par ligature, soit par coagulation. L'obstruction peut être réalisée à partir de 11 jours de DE [89] pour une gestation totale de 20 jours. *Masumoto et al* [77], en réalisant à 12 jours de DE la coagulation d'une anse grêle a démontré, comme pour le modèle du rat et du mouton, que l'obstacle interdit toute circulation de liquide amniotique dans le tube digestif en formation. Depuis, 7 études du SNE par ligature intestinale fœtale

sur le poulet ont été rapportées dans la littérature [89-95]. Dans une étude récente, l'obstruction a pu être réalisée de manière réversible : une boucle de polypropylène 9-0 était placée à ED11 puis retirée à ED 15 [95]. La principale limite est que le modèle aviaire peut être considéré comme anatomiquement trop éloigné du tube digestif de mammifère, avec notamment la présence d'un cloaque.

Chez le mouton, il a été créé des atrésies intestinales en moyenne vers le 90^{ème} jour de gestation (pour un terme au 145^{ème} jour) par technique chirurgicale également. Le procédé est soit une ischémie partielle mésentérique [96, 97], soit une ligature incomplète d'une anse grêle [98]. Le modèle du gros animal présente l'avantage de la réversibilité de l'occlusion. Il s'agit du seul modèle qui a permis de rétablir la continuité digestive et permettre ainsi les investigations sur le comportement de l'intestin en période néonatale [99]. Ses inconvénients sont le faible nombre de fœtus par portée et le taux élevé de fausse couche secondaire à la procédure.

(ii) Procédé de l'obstruction intestinale : ligature et autres

La technique la plus répandue de l'obstruction intestinale décrite avec ces modèles animaux est la ligature mécanique de l'intestin. Elle est réalisée le plus tôt possible durant la gestation avec la limite technique de sa réalisation précoce pour les petits animaux. Elle est ainsi décrite au 18^{ème} jour de DE sur le modèle de rat [84], 11^{ème} jour de DE chez le poulet [89] pour des gestations de 3 semaines. Chez le mouton, le geste est possible plus précocement avec une ligature rapportée au 50^{ème} jour de DE (pour une gestation de 145 jours) par l'équipe de *Pickard* [100].

La deuxième technique la plus répandue est l'ischémie mésentérique par électrocoagulation. Elle a été décrite chez le poulet [90] et chez le mouton [97], mais pas chez le rat.

La dernière technique est chimique par administration d'adriamycine [101]. Il en résulte un modèle d'atrésie de type IV, soit des atrésies digestives étagées multiples.

(iii) Contribution des modèles animaux

Les études publiées dans le domaine de l'atrésie chez l'animal se sont attachées pour la plupart à des études morphologiques (microscopie optique et électronique) qui permettaient de rendre compte des modifications ciblées alternativement sur le SNE, le muscle, les cellules de Cajal ou plus rarement l'épithélium et les cellules endocrines (Tableau 2 en annexe). Plus récemment, certaines se sont attachées à l'expression génique de quelques composants du SNE, d'autres ont intégré la composante fonctionnelle à cette expertise.

Depuis 2001, dix travaux publiés intéressants sont recensés sur l'atrésie jéuno-iléale. Une étude sur la souris adulte [88] a étudié la couche musculaire, les cellules de Cajal et

l'activité électrique. L'intestin était prélevé 1 à 14 jours après une obstruction partielle ou totale par clips de polyéthylène. La couche musculaire était épaissie et les cellules de Cajal étaient diminuées en nombre, en amont et en aval de l'obstacle. Les ondes électriques étaient diminuées en amont de l'obstacle uniquement.

Chez le fœtus de rat [84, 87], les études se sont d'abord focalisées sur l'aspect morphologique du SNE avec un immunomarquage de la synaptophysine. Elles s'accordent sur un segment proximal présentant une densification des ganglions, très proche de l'intestin contrôle et un intestin distal présentant plusieurs aspects d'un retard de maturation : ganglions plus étirés, moins denses que dans les contrôles. Une troisième étude plus récente sur le même modèle [83] apporte un éclairage supplémentaire : il est rapporté une redistribution des types neuronaux entre les segments (neurones cholinergiques augmentés en amont et diminués en aval), il n'existe pas de différence d'expression génique (RT-PCRq) des marqueurs d'inflammation et la contractibilité musculaire est diminuée en aval.

Chez le poulet, la réalisation de l'obstacle plus précoce que chez le rat permet d'étudier l'évolution morphologique de l'intestin ligaturé. Après une ligature au 12^{ème} jour de DE, *Baglaj et al* [90] décrit une hypertrophie musculaire au 15^{ème} jour, qui involue au 17^{ème} pour finalement réapparaître de manière atténuée au 19^{ème} jour. Il n'existe pas de modification sur le segment d'aval. Les conclusions concernant l'aspect, la maturation des ganglions nerveux sur les segments proximal et distal sont divergentes mais la conclusion globale est la présence de modifications des plexus musculaires et sous muqueux sur les deux segments [89, 91-93], et ce quelle que soit la date de la ligature. La principale différence en comparaison au modèle murin est la diminution voire l'absence ganglionnaire sur le segment proximal qui est plutôt le siège d'une surexpression. *Parisi Salvi et al* [92] associent à son expertise microscopique du SNE celle des cellules endocrines qui lui semble singulière en comparaison à celles des contrôles. Il pose ainsi l'hypothèse d'un lien entre le SNE et système endocrine (SE).

Toutes ces études sont unanimes quant à l'épaississement musculaire, la dilatation intestinale proximale et aux perturbations du SNE que partagent les deux segments. Elles le sont moins pour donner une explication satisfaisante du lien qui existe avec les dysfonctions qui en résultent. Ainsi, l'utilisation de techniques morphologiques seules (microscopies optique et électronique) n'est pas discriminative pour apprécier les modifications fonctionnelles qui nous interrogent. Des techniques complémentaires doivent être utilisées soit fonctionnelles avec l'enregistrement des contractions des fibres musculaires lisses, soit plus globales avec l'expression génique.

c) Implication du SNE dans les dysfonctionnements intestinaux

L'hypothèse d'une origine nerveuse pour expliquer ces troubles de la motilité a été posée; en effet le système nerveux est un véritable chef d'orchestre. Tout d'abord, il

coordonne les contractions musculaires. Un défaut de commande par le SNE conduirait à une stagnation des matières intestinales dans la lumière favorisant la translocation bactérienne. Les SNE dirige aussi les sécrétions intestinales et l'absorption de nutriments. Une défaillance dans le système d'absorption/sécrétion faciliterait également un passage trans-épithélial des pathogènes. Il ne peut être exclu cependant que les autres composantes de la paroi digestive puissent être impliqués dans ces dysfonctionnements. Pour répondre à ces questions, un certain nombre d'études a été réalisé chez l'homme. Un travail [79] avait comparé les pièces opératoires chez des nouveaux nés opérés d'atrésie avec des intestins fœtaux normaux à différents stades de développement embryonnaire. L'étude se focalisait sur le SNE : elle a conclu à un retard global de maturation de l'intestin d'aval et une avance de maturation de l'intestin d'amont. Une deuxième étude [81] a elle conclu à une perturbation des marqueurs du SNE, remontant jusqu'à 15 cm sur la partie d'amont et très limitée sur la partie d'aval. Il n'existe pas à notre connaissance d'étude permettant de statuer sur le caractère réversible ou non de ces lésions, ceci pour des raisons techniques chez l'animal et éthiques chez l'homme. Parmi ces possibles atteintes, des anomalies du développement du système nerveux entérique (SNE) ont été suspectées comme étant à l'origine de ces troubles fonctionnels graves. Son organisation serait altérée sur le segment digestif d'aval mais aussi sur celui d'amont [66]. Ces anomalies du SNE, s'exprimant par des anomalies de sécrétion de neuromédiateurs ou par des morts cellulaires, pourraient être directement responsables de la dysfonction intestinale [1, 87]. Actuellement, il n'existe aucune certitude concernant la physiopathologie des altérations du SNE participant aux troubles de motilité ou de sécrétions digestives observées après traitement chirurgical des atrésies congénitales [79].

C. Les différentes approches pour l'étude de l'expression des gènes des cellules du système digestif

Comme nous l'avons vu plus haut, les études réalisées sur l'atrésie digestive ont proposé des investigations que l'on peut qualifier de très ciblées. Notre but était de proposer une investigation plus large, concernant l'ensemble des tissus de l'intestin dans l'atrésie congénitale. Pour permettre ce type d'exploration, plusieurs méthodes ont été envisagées. En fonction du niveau moléculaire ciblé, peuvent être réalisées des études de protéomique, des études avec immunomarquage ou des études de transcriptomique.

1. L'analyse de protéomique

Elle consisterait à analyser l'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon digestif et dans les segments par des électrophorèses bi-dimensionnelles. A ce jour, aucune analyse protéomique n'a, à notre connaissance, été réalisée pour étudier l'atrésie digestive congénitale ou l'obstruction néonatale. Ceci s'explique sans doute par la complexité de l'analyse des images obtenues. Cependant, cette technique a été rapportée récemment pour caractériser des troubles occlusifs fonctionnels, acquis le plus souvent, chez le patient adulte [102]. Des pistes ont aussi été explorées pour caractériser le profil protéomique de la pseudo-obstruction intestinale chronique [103]. Avec cette technique, des protéines d'intérêt ont été individualisées dans le sérum des patients ayant une obstruction intestinale pour déterminer le degré de souffrance muqueuse et ainsi préciser les candidats à la chirurgie [104]. Le principal inconvénient de cette technique est son manque de spécificité et le fait qu'elle ne donne aucune information sur l'activation de l'expression génique sous jacente. De plus sa réalisation technique et son interprétation sont souvent complexes et sujettes à débat. De plus, dans une démarche de recherche, ses résultats demandent le plus souvent une confirmation par des techniques complémentaires telles que le Western Blot ou l'immunomarquage.

2. L'analyse par western-blot

Cette technique, qui vise à faire migrer des protéines dans un hydrogel (polyacrylamide le plus souvent) puis à les transférer sur des feuilles de nylon puis à les révéler grâce à des anticorps spécifiques de ces protéines, est très intéressante lorsqu'on se focalise sur l'étude quantitative d'un nombre réduit de protéines. En effet, il faut pouvoir disposer d'anticorps spécifiques qui fonctionnent bien pour le but recherché mais il faut souvent optimiser les hybridations pour avoir des images de bonne qualité. Le coût et le

temps passé sont souvent énormes et ceci requiert souvent de savoir sur quelle protéine porter son attention. Dans le cas que nous présentons dans cet ouvrage, il nous paraissait plus judicieux de "ratisser large" dans un premier temps et de nous focaliser dans un 2^e temps.

3. L'analyse par immunomarquage

L'étude immunohistochimique de l'expression protéique (et donc génique) est très intéressante car elle permet de corrélérer une localisation cellulaire et/ou tissulaire avec les variations quantitatives observées. De plus, cette technique permet de vérifier et de localiser des variations d'expression observées par des techniques plus larges (transcriptomique par exemple, cf. ci-après). Mais, comme évoqué plus haut, les études histochimiques requièrent un anticorps pour chaque protéine et une optimisation d'utilisation de celui-ci. Cette technique ne peut donc s'appliquer qu'à des protéines dont on connaît ou pressent l'importance. Dans ce cas, l'immunomarquage précise la singularité d'expression de ces gènes étudiés en déterminant leur localisation dans le tissu. Dans l'étude que nous allons présenter, l'immunomarquage a été avant tout une étape confirmative permettant d'étayer les résultats de l'étude transcriptomique (comme la RT-qPCR) mais également de donner une illustration morphologique des variations d'expression alors que dans la plupart des études publiées, même récentes, il s'agit de l'unique étude expérimentale [77, 79, 82, 84, 87, 92].

4. L'analyse par transcriptomique par microarray

L'étude transcriptomique par microarray étudie un très grand nombre pour ne pas dire l'ensemble des transcrits, c'est à dire des ARN messagers présents dans le tissu à un instant donné. En tant que technique globale, elle doit être considérée comme une bonne technique de screening mais nécessitant, en contre partie, des techniques complémentaires pour étayer les résultats. Cette approche nous a paru la plus pertinente dans le contexte de développement embryonnaire. En effet, le développement intestinal est sous le contrôle étroit de l'expression de plusieurs gènes connus ou à découvrir, et de fortes variations de ceux-ci pourraient être observées dans le cadre de la différenciation ou dans le cadre de la pathologie. La technique de transcriptomique a également l'avantage de permettre l'étude de microARN (miARN) qui sont des régulateurs de la traduction des autres ARN messagers. Ces microARN ont été étudiés à une seule occasion dans l'atrésie intestinale congénitale. Il a ainsi été précisé l'implication de miR-211 dans la régulation de la différenciation des ganglions nerveux entériques sur le modèle d'atrésie chez le rat [105]. L'analyse transcriptomique rend compte par un résultat semi-quantitatif des ARN messagers de

l'ensemble du génome. Sa limite est le manque d'information sur la traduction de ces ARN messagers en protéines et, a fortiori, en protéines fonctionnelles localisées à leur place physiologique. Nous verrons donc dans la suite de notre étude que nous avons décidé de procéder en 2 étapes : 1) étude transcriptomique par microarray, puis 2) confirmation des résultats avec des données quantitatives par RT-PCRq puis vérification de l'expression protéique in situ par des immunomarquages tissulaires, spécifiques de certaines protéines.

D. Problématique et objectifs de travail de cette thèse

L'hypothèse de départ était que la maturation du SNE embryonnaire ne s'effectue pas correctement du fait de l'absence de circulation de facteurs trophiques normalement présents dans le liquide amniotique donc dans la lumière digestive fœtale. De plus, ce SNE pourrait pâtir dans son développement du fait de modifications de pression exercées par ce liquide amniotique selon une théorie plus mécaniciste et qui s'appliquerait dès le développement embryonnaire. Cette conception expliquerait la différence de maturation entre l'intestin d'amont et celui d'aval. Si ces hypothèses s'avéraient exactes, il pourrait être très utile d'accélérer la maturation de l'ensemble des tissus intestinaux concernés par des facteurs mécaniques avant le traitement chirurgical et, pour le cas du SNE, il pourrait être réalisé l'apport de facteurs trophiques localement durant la période post-opératoire. Cependant, comme nous l'avons vu plus haut, la physiopathologie des anomalies de fonctionnement du tube digestif en amont et en aval de l'atrésie n'était et n'est toujours pas bien comprise. Tous les travaux précédents sur le thème de l'atrésie intestinale indiquent des modifications du SNE. Mais est-ce le seul responsable des anomalies ?

D'autres questions restent en suspens concernant :

- le mécanisme causal

Ces troubles sont-ils liés à des anomalies du développement dont le déterminisme est de même nature que celui responsable de l'obstacle ou bien sont-ils secondaires à l'obstacle et donc potentiellement réversibles ?

- le substrat anatomique

Quel que soit le type de processus, la question concerne l'extension dans le temps et dans l'espace de ces anomalies. Quelle est l'extension potentielle des anomalies en amont ou aval de l'atrésie ? Limitée ou étendue ? Les segments proximal et distal partagent-ils la même implication dans la genèse de ces troubles ? Quelle est la spécificité de chacun ?

- le substrat tissulaire

Quelle est la part relative de chacun des tissus et/ou des types cellulaires de l'intestin dans la survenue de ces troubles ?

En effet, les autres tissus ont été moins bien étudiés tant dans les modèles animaux que en pathologie humaine. Le SNE, qui a été au centre des recherches depuis plusieurs années a-t-il vraiment le rôle central ? C'est dans un souci d'exhaustivité qu'il a été décidé d'utiliser l'approche transcriptomique pour l'étude des tissus de l'intestin dans l'atrésie digestive. L'objectif de notre travail étant de mieux comprendre ces phénomènes atrétiques, il a été utilisé une approche globale de l'expression des gènes par transcriptomique permettant d'étudier les modifications des ARNm de l'ensemble des tissus du tube digestif. Dans l'hypothèse d'un caractère irréversible de ces anomalies mais limité à quelques centimètres, il pourrait en résulter par exemple une modification de la prise en charge chirurgicale telle une résection plus ou moins étendue de la zone pathologique identifiée. Dans le cas d'un caractère réversible, l'identification de cibles thérapeutiques pourrait accélérer la récupération par l'administration de substances chimiques ou immunologiques.

C'est pour répondre à ces différentes interrogations que nous avons élaboré, avec le Dr Bourthoumieu, le Pr Fourcade et le Pr Sturtz, la séquence de recherche suivante :

1. Utilisation du modèle d'interruption ou d'atrésie intestinale chez le rat pour générer du matériel d'étude
2. Etude de l'expression génique :
 - extraction des ARNm de différentes parties intestinales de ces rats et vérification de l'extraction
 - étude transcriptomique en collaboration avec la plateforme génomique de l'Institut Cochin-INSERM U1016 (Sébastien Jacques)
 - analyse des résultats bruts d'expression génique et classification par type cellulaire et tissulaire en réalisant des clusters de gènes
3. Confirmation des variations de l'expression génique de certains gènes par RT-qPCR (PCR quantitative après une transcription reverse)
4. Etudes morphologiques :
 - morphométrie des différents segments intestinaux par microscopie optique
 - confirmation et précision morphologique de ces résultats par des immunomarquages et colorations spéciales
 - étude ultra-structurale de certains types cellulaires intestinaux par microscopie électronique

Nous allons donc maintenant montrer les résultats que nous avons obtenus au cours de ces 4 années de thèse.

DEUXIEME PARTIE:

ETUDE EXPERIMENTALE

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Dans cette partie, il est décrit la méthodologie sur un modèle murin d'obstruction digestive ainsi que les investigations sur les prélèvements intestinaux du modèle et sur des prélèvements de nouveau-nés humains.

A. MATERIEL et METHODES

1. Projet

Le projet est de définir par plusieurs techniques les déterminants génétiques de l'atrésie puis ses caractéristiques sur le modèle animal de rat décrit plus bas. Il a été choisi une étude préliminaire transcriptomique comme première approche. Il s'agit de déterminer le profil d'expression génique sur les tissus digestifs en amont et en aval de l'atrésie. Cette étude est globale car elle explore l'ensemble des tissus digestifs, élargissant au passage le champ d'investigation au muscle, épithélium, système endocrine en plus du système nerveux entérique déjà largement exploré. Afin d'être la plus complète possible, des fœtus témoins seront également expertisés sur la dernière partie de la gestation (E15-E17-E19-E21). Cette première approche aura donc deux socles : un premier à visée développementale sur des fœtus témoins durant la période anténatale et un deuxième à visée pathologique sur des embryons de rats dont l'intestin est ligaturé.

Au vu des résultats de cette première partie, des analyses complémentaires seront réalisées pour confirmer l'expression génique par RT-PCRq et évaluer les conséquences morphologiques par microscopie optique (colorations standard et immunohistochimie) et microscopie électronique. Trois tissus vont retenir particulièrement notre attention : le système nerveux entérique, le système neuroendocrine diffus et la composante épithéliale.

2. Modèle d'atrésie

a) Justification du modèle

Nous nous proposons d'utiliser le modèle expérimental du rat, sans doute le mieux éprouvé et le plus répandu actuellement. Plusieurs raisons expliquent ce choix : (1) le rat est un mammifère comme l'Homme, (2) la durée de la gestation est relativement courte (21 jours), (3) le nombre moyen de petits par portée varie de 5 à 15, permettant d'avoir des embryons contrôles et des embryons ligaturés au même stade de maturation et (4) la faisabilité est bonne en particulier avec les rates de type Wistar qui est l'espèce sur laquelle

a été faite la mise au point du modèle [84] et ensuite la plupart des investigations. La limite du rat est la taille des embryons qui rend très difficile une ligature avant le 17^{ème} jour de gestation, terme correspondant au 3^{ème} trimestre de grossesse chez l'Homme qui peut paraître tardif pour une atrésie digestive. A ce titre, des études complémentaires sur le gros animal pourraient être informatives.

b) Expérimentation animale

(i) Ethique

Ce protocole d'expérimentation a été soumis pour avis puis validé successivement par le comité local puis national d'Ethique (Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale). Il a été réalisé sous le numéro d'autorisation portant la référence 05180.04. Toutes les expérimentations ont été réalisées selon les règles de protection et du bien-être animal.

(ii) Protocole préanesthésique

Les rates gestantes ont été fournies par le laboratoire JANVIER LABS. Dès leur réception, elles ont été hébergées à l'animalerie de l'Université plusieurs jours avant le début de l'expérimentation (5 jours minimum). Elles sont ensuite transportées en salle de laboratoire (unité EA6309) quelques heures avant le début des expérimentations puis déposées dans leur cage individuelle pour l'acclimatation.

(iii) Protocole anesthésique

Au moment de la première étape du protocole opératoire, leur terme se situe entre E15 et E21 (E15=15^{ème} jour de développement embryonnaire ; pour une gestation de 21 jours au total). Le protocole d'anesthésie débute par l'introduction de la rate dans une cage en plexiglas reliée au système de gaz anesthésiques (Isoflurane ; Abbott, UK). La sédation de l'animal est obtenue dans la cage puis l'animal en est retiré pour la pesée avant un relais sédatif par masque facial. Les rates gestantes pèsent entre 300 et 400 g. La surveillance peropératoire continue se fait par l'observation des mouvements de l'animal et de sa fréquence respiratoire (40 à 50 cycles par minute).

La surveillance postopératoire s'effectue pendant deux heures en salle de manipulations. Après reprise de l'activité et d'un comportement alimentaire, elles sont surveillées à la fréquence de trois fois par jour dans le laboratoire d'animalerie.

L'administration d'antibiotiques est prévue (injection IM d'Amoxicilline 20 mg/Kg/jour pendant 3 jours) ainsi que l'antalgie par du paracétamol dans l'eau de boisson (1mg/mL). Le sacrifice est prévu de manière anticipée en cas de signes de péritonite malgré une prise en charge efficace.

(iv) Protocole opératoire

L'animal est installé en décubitus dorsal pour l'anesthésie locale. Ces expérimentations sont réalisées en conditions « propres » mais non stériles. Il n'est pas réalisé d'antibioprophylaxie systématique. La région abdominale est lavée et désinfectée par une solution iodée. Une courte laparotomie médiane inférieure est réalisée après injections sous cutanées et intramusculaires d'anesthésie locale (1 mL de xylocaïne 1%). Les cornes utérines sont ensuite extériorisées de l'abdomen puis l'anesthésie locale est réalisée sur chaque fœtus 3 minutes avant la procédure les concernant. Cette anesthésie est réalisée par injection amniotique de quelques microlitres de xylocaïne.

La procédure est réalisée sous le microscope OPM1-Carl Zeiss avec des instruments microchirurgicaux. La ligature intestinale est réalisée au 18^{ème} jour de DE. Les fœtus ayant une bonne exposition de la fosse iliaque droite sont sélectionnés. Les fœtus ne présentant pas la bonne configuration, environ la moitié d'entre eux, ont été utilisés comme témoins. Les membres supérieurs et inférieurs des fœtus sont fixés à la paroi utérine par des points séparés de polypropylène 8/0. Une bourse est réalisée sur l'utérus avec un surjet de polypropylène 8/0. Au centre de cette bourse, l'utérus est incisé. Les berges de l'utérus sont amarrées à la paroi abdominale fœtale avec 3 points séparés de polypropylène 8/0, permettant de centrer la fosse iliaque droite. Une micro-incision est réalisée en fosse iliaque droite en dessous du foie. Une seule anse digestive grêle doit être extraite grâce à l'instillation de quelques microlitres de sérum physiologique dans la cavité péritonéale. La ligature intestinale est réalisée avec un simple nœud de polypropylène 10/0. L'anse est ensuite réintégrée et la cavité abdominale est suturée par un point de polypropylène 9/0. La cavité utérine est fermée en resserrant la bourse après instillation de quelques microlitres de sérum physiologique. Les membres supérieurs et inférieurs sont libérés de leur fixation, les cornes utérines sont réintégrées avant la fermeture de la paroi en deux plans par un surjet de polypropylène 4/0.

(v) Recueil des échantillons

Les embryons utilisés pour étudier la cinétique de développement ont été recueillis à différents stades de développement notés E15, E17, E19 et E21. Les embryons ligaturés *in*

utero et les embryons témoins de la même portée ont été prélevés 3 jours après la ligature, soit au 21^{ème} jour *juste* avant la naissance (E21). En effet l'atrésie digestive n'étant pas compatible avec la vie et les rates ayant une tendance au cannibalisme, le recueil des prélèvements nécessite une extraction avant la naissance naturelle.

Cette étape consiste à prélever l'intestin des fœtus de rat par césarienne. Celle-ci est réalisée selon les mêmes conditions que pour l'étape précédente. Les fœtus sont anesthésiés puis extériorisés de la cavité utérine. Une laparotomie large permet de distinguer les échecs ou les succès de la ligature. La procédure est un succès lorsque le fœtus est vivant (couleur et trophicité l'attestent), lorsque la paroi abdominale est intacte (absence de laparoschisis) et lorsqu'il existe une différence de calibre et de couleur des anses digestives dont la limite peut être clairement définie comme le fil de ligature retrouvé (Figure 19).

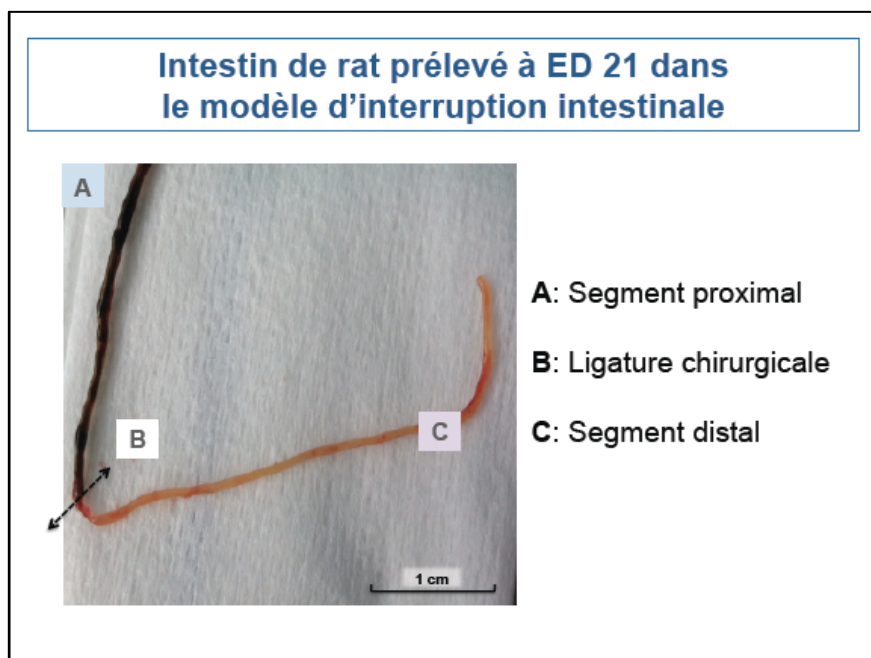


Figure 19 : Photo macroscopique du prélèvement intestinal à ED21

- A : Segment proximal dilaté par les sels biliaires
- B : Ligature chirurgicale
- C : Segment distal grêle

Chaque fœtus est séparé de son placenta puis pesé et mesuré. La longueur totale de l'intestin est mesurée. La distance entre le duodénum et la ligature est mesurée pour confirmer que la ligature concerne l'intestin grêle. Pour les fœtus ligaturés avec succès, sont prélevés les 2 centimètres en amont et les 2 centimètres en aval de cette limite (Figure 20). Chacun de ces segments sera divisé en 2 segments de 1 cm. Le prélèvement concerne également les fœtus utilisés pour la cinétique. Deux centimètres d'intestin sont prélevés à 10 cm en aval de l'angle duodéno-jéjunal. Les fœtus et la rate sont euthanasiés en fin de

procédure par injection intra cardiaque de T61 (laboratoires MSD, solution contenant Embutramide, Mébézonium et Tétracaïne).

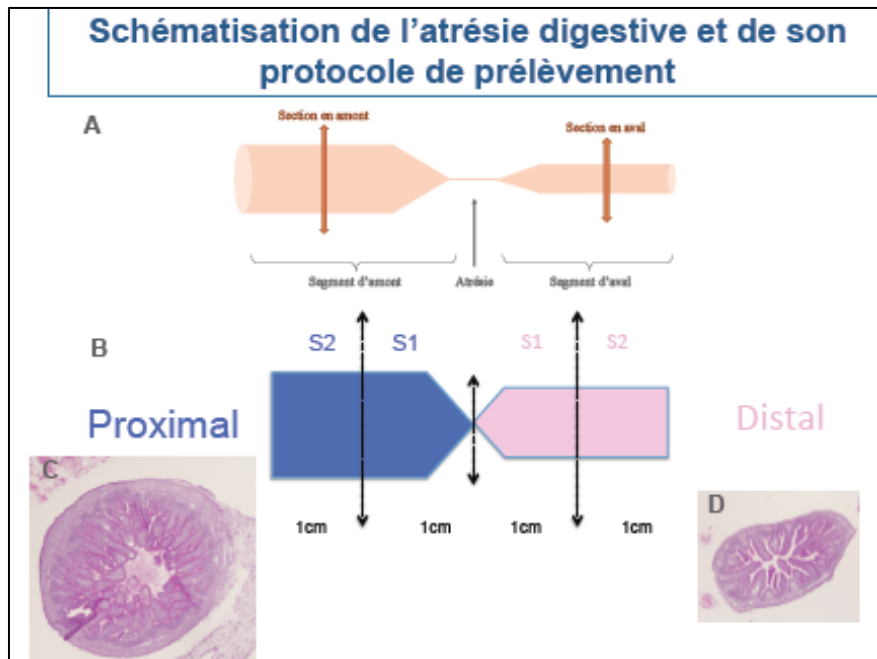


Figure 20 : Schématisation de l'atrésie et protocole de prélèvement

- A** : Segment proximal ou d'amont et segment distal ou d'aval.
B : Prélèvement de deux portions successives de 1 cm (S1 et S2) depuis la ligne d'atrésie respectivement sur chacun des segments.
C : Segment proximal en coupe histologique avec un grossissement X4
D : Segment distal en coupe histologique avec un grossissement X4

Des intestins ont été prélevés au 15^{ème}, 17^{ème}, 19^{ème} et 21^{ème} jour de DE afin de réaliser une cinétique de développement. Afin d'améliorer la corrélation du terme avec les fœtus ligaturés, les fœtus témoins E21 ont été prélevés chez les mêmes rates gestantes que les fœtus ligaturés.

La mortalité fœtale étant de 70% et le nombre de fœtus par rate de 10 en moyenne, il a été sacrifié au total 30 rates sur l'ensemble des manipulations.

Nous avons réalisé au total 6 groupes d'intestins fœtaux:

- Des intestins témoins pour la cinétique à E15
- Des intestins témoins à E17
- Des intestins témoins à E19
- Des intestins témoins à E21
- Des intestins prélevés en amont à E21 : AM E21
- Des intestins en prélevés en aval à E21 : AV E21

Ces échantillons d'intestin sont destinés à :

- Soit à l'extraction d'ARN pour l'étude de l'expression génique par transcriptomique puis RT-PCRq
- Soit à la fixation tissulaire par du paraformaldéhyde ou du glutaraldéhyde pour l'étude de la morphologie respectivement par microscopie optique ou électronique

3. Etude de l'expression génique

a) Extraction de l'ARN

Les tissus ont été broyés mécaniquement dans du Qiazol (QIAGEN), un équivalent de trizol. L'extraction des acides nucléiques se fait à l'aide d'un kit d'extraction miRNeasy Mini (QIAGEN, Allemagne) selon les consignes du fournisseur utilisant le principe de l'extraction en phénol-chloroforme suivie d'une purification sur colonne de silice RNease (QIAGEN). L'ADN génomique a été éliminé par digestion par la DNase afin de ne conserver que les ARN.

Les ARN ont ensuite été dosés à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop® ND-2000/2000c (Thermo, USA).

La qualité des ARN a été évaluée sur le bioanalyseur Agilent 2100 en employant le Nano Kit RNA 6000 (Agilent). Seuls les échantillons ayant un RIN (RNA integrity Number) supérieur à 7 ont été analysés par transcriptomique et RT-PCRq.

Les ARN ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

b) Etude transcriptomique

L'étude transcriptomique a été réalisée à partir :

- des échantillons d'intestin à différents stades de développement E15 (n=3), E17 (n=3), E19 (n=3) et E21 (n=3) afin d'étudier la cinétique de développement des facteurs génétiques contrôlant la différenciation tissulaire de la paroi iléale
- des échantillons d'intestin ligaturé, en amont de la ligature AM E21 (n=3) et en aval de la ligature AV E21 (n=3) afin d'identifier des marqueurs biologiques pouvant expliquer les différences morphologiques entre les intestins d'amont et d'aval.

L'étude transcriptomique a été réalisée sur la Plateforme GENOM'IC de Cochin à Paris.

L'ADNc biotinylé a été préparé à partir de 400 ng d'ARN total selon le protocole Affymetrix du kit GeneChip WT plus. Après la fragmentation de l'ADNc, 3,6 µg ont été

hybridés à 45°C pendant 17 heures sur des puces GeneChip RatGene2.0 ST Array (Affymetrix). Les puces ont été lavées et marquées à l'aide de la station Fluidics Station 450 (Affymetrix).

Les puces ont été scannées à l'aide du scanner Affymetrix GC3000.

Les données ont été normalisées en utilisant la méthode RMA (Robust Multichip Average). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Partek Genomics Suite et le fichier DCF V19 a été utilisé pour l'annotation.

Une ANOVA a été utilisée pour comparer les différents groupes d'échantillons.

Les variations d'expression entre deux groupes d'échantillons ont été exprimées en « fold change » (Fd), un Fd est positif pour une surexpression et négatif pour une sous-expression. Il a été choisi le seuil de 1,2 en valeur absolue pour cette variation comme pertinente. Lorsque la valeur est supérieure à 1,2, il existe alors une augmentation pertinente de l'expression des gènes ; lorsqu'elle est inférieure à -1,2, il existe une diminution de cette expression.

La probabilité que cette variation ne soit pas liée au hasard est exprimée par la valeur p ou « p value ». Elle est considérée comme statistiquement significative lorsqu'elle est inférieure à 0,05. Plus la valeur absolue de la variation est importante, plus faible est la valeur de p.

Nous avons réalisé une analyse globale mais également ciblée des données de l'analyse transcriptomique. Cette analyse ciblée s'est intéressée aux gènes exprimés spécifiquement par certains tissus comme le système nerveux entérique, le système endocrine diffus, l'épithélium en s'appuyant sur les données de la littérature.

Ces gènes sont donc regroupés en famille ou « cluster » selon une logique tissulaire lorsqu'ils seront présentés dans la section résultats. Ces résultats ont nécessité la confirmation des hypothèses soulevées, notamment par des RT-PCRq ciblées et des immunomarquages.

c) Quantification par PCR en temps réel

La reverse transcription a été réalisée à l'aide du kit QuantiTec Reverse Transcription Kit (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur. Cette reverse transcription a permis d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) qui ont ensuite été contrôlés à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop® 2000/2000c (Thermo, USA). Les ADNc ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Afin de quantifier l'expression des gènes d'intérêt, les amorces nécessaires à l'amplification par PCR ont été « designées » en utilisant les logiciels informatiques suivants :

- Ensembl : le site Ensembl nous a permis de récupérer les séquences des introns et des exons des gènes d'intérêt.
- Primer Blast (ou Primer3), a permis de « designer » les séquences des amorces Forward (5'→3') et Reverse (3'→5')
- OligoCalc : probabilise la température de fusion (Melting) et la formation de dimères d'amorces ou de bouches liés au fait que les amorces peuvent s'hybrider entre elle.
- Genome Browser, par la fonction Blast, vérifie la spécificité de la séquence

Une fois les amorces « designées », elles ont été commandées chez le fournisseur SIGMA (Tableau 2).

Nom	Séquence (5' → 3')
Somatostatine (SST)-F	GACCCCAGACTCCGTCAGTTTC
Somatostatine (SST)-R	GGGTTCGAGTTGGCAGACCT
Peptide YY (PYY)-F	CGGCAGCGGTATGGGAAAAG
Peptide YY (PYY)-R	ACACCTTCTGGCCGAGACCT
Tryptophane1 (TPH1)-F	TGGGGGACCATCTTCCGAGA
Tryptophane1 (TPH1)-R	CGGATGGAAAACCTGTGCG
Calbindine2 (CALB2)-F	AGATGGGAAAATTGAGATGGCAGA
Calbindine2 (CALB2)-R	GCTGCCTGAAGCACAAAAGGAA
CholineAcétylTransferase (CHAT)-F	TTAGCTACAAAACCTGCTGGACA
CholineAcétylTransferase (CHAT)-R	CACGATGACATGCTCAGGCTC
CholéCystoKinine (CCK)-F	ATACATCCAGCAGGTCCGCAA
CholéCystoKinine (CCK)-R	AGCCCATGTAGTCCCGGTCA
Sécrétine (SCT)-F	CGGACGGGACGTTCAACAG
Sécrétine (SCT)-R	CAGAAGCCAATCCTGTAGGGC
Calbindine1 (CALB1)-F	ATATGGGCAGAGAGATGATGGGAA
Calbindine1 (CALB1)-R	CCTCGCAGGACTTCAGTTGCT
Gastrine (GAST)-F	GGTCCGCAACACTTCATAGCAGATC
Gastrine (GAST)-R	TACGGCGACCAAAGTCCATCC
AcétylCholine Estérase (ACHE)-F	CAGGTGCTGGTGGGTGTGGTG
AcétylCholine Estérase (ACHE)-R	CCAGGTCACTCGCTTGGGGT
Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransférase (HPRT)-F	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC
Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransférase (HPRT)-R	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
TATAbox Binding Protein 1(TBP)-F	TGGGATTGTACCACAGCTCCA
TATAbox Binding Protein 1(TBP)-R	CTCATGATGACTGCAGCAAACC

Tableau 2: Tableau récapitulatif des gènes et de leurs amorces.

Il s'agit des amorces utilisées pour amplification par technique de PCRq.

4. Etude morphologique

a) Microscopie photonique

(i) Préparation histologique

Les échantillons destinés à l'immunohistochimie ont été immédiatement fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 3 heures avant d'être immergés pendant 12 heures dans du sucrose à 30%. Ils ont ensuite été séparés en deux parties de 1 cm chacune (cf Figure 18) pour différencier une portion juxta atrétique (S1) et une portion plus éloignée (S2). Des repères avec des fils permettent leur orientation. Les échantillons d'aval et d'amont S1 (1 cm) et S2 (1 cm) ont été inclus en parallèle dans du Tissue-Tek puis immédiatement congelés par immersion dans du N-méthyl butane refroidi par l'azote liquide. Les blocs d'intestins ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Cette inclusion en parallèle des échantillons d'amont et d'aval permet une étude comparative morphométrique et immunohistochimique des 2 segments en fonction de leur éloignement de l'atrésie.

De fines sections d'intestins ont été réalisées à l'aide du microtome Cryostat à -25°C pour les études histologiques.

(ii) Réaction PAS

Une coloration spécifique par l'acide périodique, réactif de Schiff (PAS) a été utilisée pour mettre en évidence les mucines, révéler ainsi les cellules caliciformes dans les différentes sections en les colorant en fuschia.

Pour cela, les coupes ont été immergées dans de l'acide périodique à 0,5% pendant 10 minutes, puis rincées à l'eau distillée pendant 10 minutes. Ensuite, elles ont été placées 15 minutes en présence du réactif de Schiff, puis rincées par deux bains de lavage. Par la suite, les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline, puis rincées à l'eau courante jusqu'à ce que l'eau devienne claire.

Les coupes ont ensuite été observées avec le microscope Nikon Optic H600L (Nikon, Tokyo, Japan), puis analysées à l'aide du logiciel NIS Element (Nikon).

(iii) Immunohistochimie (IHC)

Les résultats de la transcriptomique ont permis d'orienter le choix des marqueurs d'intérêt pour mettre en évidence les modifications morphologiques liées à l'atrésie. C'est ainsi que le choix des anticorps s'est fait contre les protéines suivantes :

-pour les SNE : calrétinine, et acétyl-cholinestérase

- pour les cellules neuroendocrines : chromogranine A
- pour les cellules épithéliales : lysozyme

Les références des anticorps sont reportées dans le tableau 3.

La première incubation a été réalisée avec l'anticorps primaire dirigé contre nos protéines d'intérêt notées ci-dessus. Une seconde incubation a été réalisée avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase et dirigé contre cet anticorps primaire. La révélation a été réalisée grâce au kit avidine-biotine peroxydase (Vectastain kit, Vector Laboratoires, USA) et le substrat chromogène DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB peroxidase substrate kit; Vector Laboratoires) selon les recommandations du fournisseur. La peroxydation se manifeste par un marquage marron des tissus exprimant les protéines d'intérêt.

Tableau 3: Tableau récapitulatif des références des anticorps utilisés

Anticorps primaires	Types	Reference	Dilution	Fournisseur
Anti-AcétylCholine Estérase	Polyclonal/lapin	Ab-97299	1/200	Abcam
Anti-Chromogranine A	Polyclonal/lapin	Ab-45179	1/200	Abcam
Anti-Calrétinine	Polyclonal/lapin	Ab-702	1/100	Abcam
Anti-lysozyme	Polyclonal/lapin	ABIN-1873577	1/100	Abin

L'analyse microscopique a été réalisée avec le microscope Nikon Eclipse 50i (Nikon, Japon), la transmission vidéo utilise une caméra Nikon Digital Camera DXM 1200C et le traitement des images un logiciel associé au microscope NIS Element BR.

- Les ganglions nerveux, immunomarqués grâce aux anticorps anti-Calrétinine et anti-AchT ont été mesurés puis quantifiés en déterminant le nombre total par coupe, le nombre total dans la région sous muqueuse (plexus de Meissner), le nombre total dans la région musculaire (plexus d'Auerbach).
- Les cellules neuroendocrines, caractérisées par l'expression de la chromogranine A ont été quantifiées par coupe et par villosité.

Pour chaque groupe, les ganglions et les cellules endocrines ont été comptabilisés sur 3 échantillons par deux observateurs indépendants. Pour les résultats, nous avons déterminé les moyennes et les écarts types de chacun des groupes.

(iv) Etude morphométrique

L'analyse morphométrique a été effectuée avec un microscope Nikon Eclipse 50i (Nikon, Japon), la transmission vidéo a utilisé une caméra Nikon Digital Camera DXM 1200C et le traitement des images un logiciel associé au microscope NIS Element BR.

Les mesures ont été effectuées de manière non automatisée, à l'aide de ce même logiciel pour relever les longueurs et les aires (respectivement en μm et μm^2). La morphométrie de chaque section comprend les mesures suivantes :

- le diamètre intestinal (mesuré et calculé)
- l'épaisseur de la paroi totale,
- l'épaisseur de la muqueuse
- l'épaisseur de la musculature
- le nombre et l'épaisseur des villosités par coupe
- le nombre des cryptes.

Pour chaque groupe d'échantillons, les mesures ont été réalisées sur 3 échantillons par deux observateurs indépendants. Pour les résultats, les moyennes et les écarts types ont été calculés.

(v) Modélisation de l'absorption intestinale

Pour cela, nous nous sommes intéressés aux formes que peut prendre l'épithélium intestinal entre les différents segments de l'atrésie, en particulier la surface occupée par celui-ci. L'épithélium intestinal étant constitué majoritairement de villosités, nous avons élaboré un modèle géométrique afin d'obtenir une estimation de la surface d'absorption chez le fœtus de rat. Le but était d'établir de pouvoir comparer cette surface entre témoins E21, segments amont et d'aval. Le choix a été fait de d'appliquer un modèle sur une petite longueur. Le calcul a donc été réalisé sur une section de 1 mm d'épaisseur à partir des données mesurées en microscopie optique.

Le modèle est tout d'abord imaginé en 2 dimensions sur une coupe : le contour intestinal est dessiné comme une forme géométrique circulaire, sur laquelle se fixe un certain nombre de villosités (Figure 21). La première étape est de calculer le périmètre interne de la muqueuse, en ôtant les mesures de la musculature au diamètre externe (la sous-muqueuse étant inexistante sur les coupes). On obtient le périmètre du cercle constitué par la muqueuse intestinale. En partant du principe que les villosités sont de taille et de forme semblables, disposées à intervalles réguliers, il est possible d'établir leur diamètre.

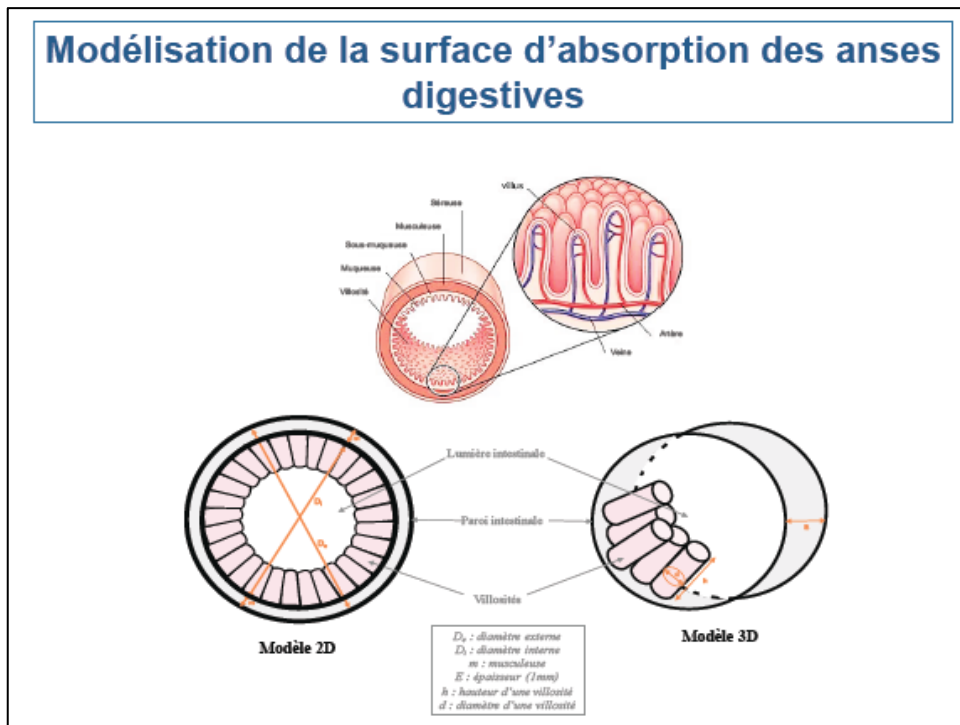


Figure 21 : Schématisation de la surface d'absorption intestinale.

Les villosités sont modélisées successivement en 2 puis en 3 dimensions afin de pouvoir calculer la surface totale.

Le modèle est ensuite exploré en 3 dimensions : l'intestin est représenté comme un cylindre de 1 mm de longueur, sur lequel se greffent les villosités également modélisées par des cylindres. Connaissant le diamètre de la base des cylindres-villosités, nous pouvons en déduire le nombre de villosités présentes sur une rangée de longueur 1 mm, puis le nombre total de villosités présentes sur ce modèle (Figure 21). Ensuite, en appliquant les formules relatives aux calculs de surface d'un cylindre, il est possible de calculer la surface intestinale sans villosités, à laquelle est ajoutée la surface des villosités, en fonction du nombre de villosités comptées.

Pour chaque groupe de prélèvements, la surface d'absorption a été calculée sur 3 échantillons. Les moyennes et les écarts types ont été déterminés pour comparer les résultats de chaque groupe.

b) Microscopie électronique

Les échantillons ont été fixés avec du glutaraldéhyde à 2,5% dans 0,05 mol/L de tampon de sodium cacodylate, puis post-fixés avec du tétr oxyde d'osmium (OsO_4) à 1%, avant d'être inclus dans de la résine époxy. Des coupes semi fines ($1\mu\text{m}$ d'épaisseur) ont été réalisées et colorées avec le bleu de toluidine. Au microscope optique, les régions d'intérêt pour des coupes ultrafines ont ensuite été sélectionnées pour la microscopie électronique.

Les coupes ultrafines ont ensuite été réalisées à l'ultramicrotome puis contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Les coupes disposées sur des grilles de cuivre ont été observées aux microscopes électroniques à transmission JEOL JEM-1011. Des photos ont été capturées à un grossissement compris entre 800 and 2,000.

5) Analyses statistiques

Les différences de résultats entre les groupes étaient considérées comme statistiquement significatifs pour des valeurs de p inférieures à 0,05 à l'aide d'un test de *Student* ou de type ANOVA.

B. RESULTATS

Nous rapportons dans un premier temps les résultats de l'analyse globale du point de vue morphométrique et expression génique. Dans un second temps, les résultats sont exposés tissu par tissu : SNE, cellules neuroendocrines et cellules épithéliales.

1) Morphométrie

Ont été obtenus 18 fœtus de rat avec un aspect d'obstruction intestinale satisfaisant, ainsi que 12 fœtus contrôles E21 pour cette partie. Leur poids de naissance était de 4.3 ± 0.5 g et leur longueur d'intestin était de 11.5 ± 2.8 cm. Le poids moyen de la portée était de 5.1 ± 0.4 g et la longueur de son intestin de 16.8 ± 2.4 cm.

L'atrésie était localisée à une distance médiane de 6 cm (rang 2-11cm) de l'angle duodéno-jéjunal. Le diamètre externe intestinal était significativement plus large sur la partie proximale du segment atteint que sur les intestins contrôle ($1,8 \pm 0,1$ -fois; $p < 0,01$), de même qu'il était plus important sur les contrôles que sur le segment pathologique en distalité de l'atrésie ($1,4 \pm 0,1$ -fold; $p < 0,05$). L'épaisseur musculaire était significativement plus importante ($p < 0.05$) sur le segment proximal que sur les intestins contrôle ($1,9 \pm 0,3$ -fold). Aucune différence statistiquement significative concernant la morphométrie n'a pu être mise en évidence entre les segments juxta atrétiques (S1) et les segments plus éloignés (S2). L'ensemble de ces résultats est reporté sur la figure 22.

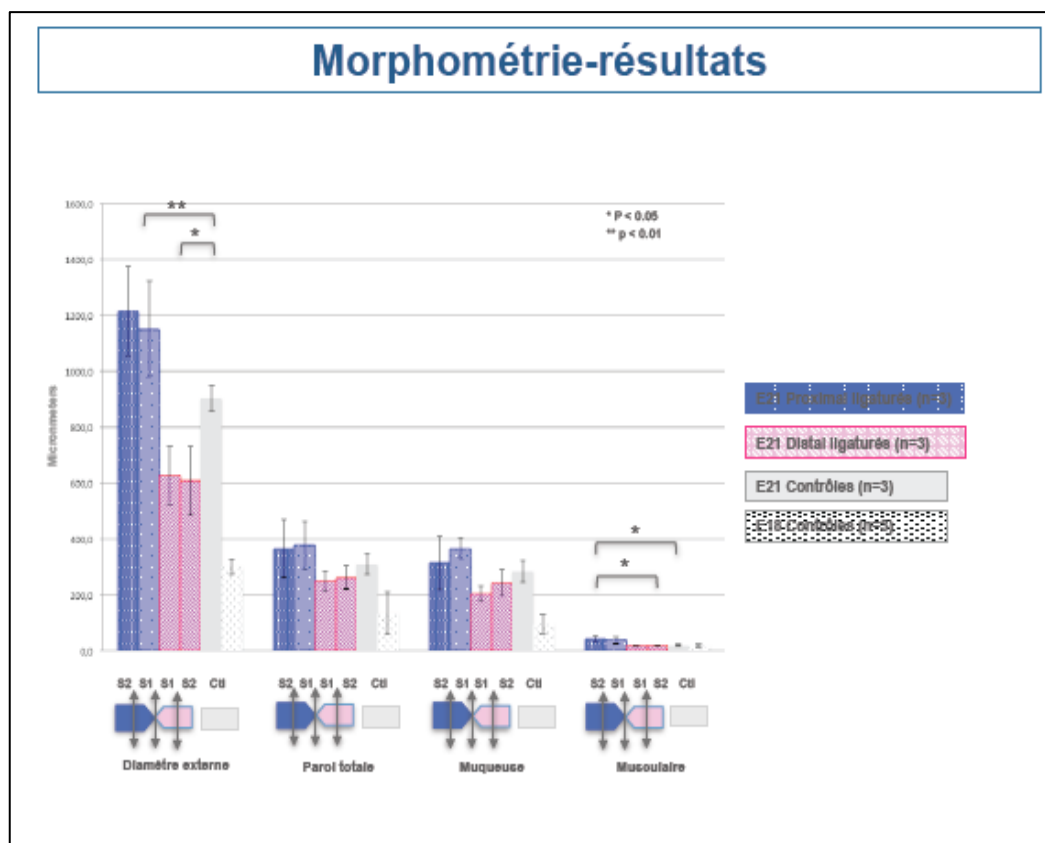


Figure 22 : Résultats morphométriques.

Diagramme présentant les résultats successifs concernant le diamètre externe, l'épaisseur de paroi, de la muqueuse et du muscle. Il existait une différence statistiquement significative entre segment d'amont et d'aval pour le diamètre externe et la musculature.

Concernant les villosités, en comparaison avec le groupe témoin, celles du segment proximal sont plus nombreuses et plus hautes, alors qu'au contraire, elles sont moins nombreuses et moins hautes dans le segment distal (*Tableau 4*).

Tableau 4: Tableau récapitulatif des mesures

SURFACE D'ABSORPTION	AMONT E21 (n=3)				AVAL E21 (n=3)				TE E21 (n=3)		
	MOY	±	SD	p value vs TE21	MOY	±	SD	p value vs TE21	MOY	±	SD
GRANDEURS MESURÉES											
Diamètre externe intestin (µm)	1245,58	±	113,03	0,008	629,13	±	88,3813	0,009	902,97	±	46,88
Epaisseur de la musculature (µm)	42,40	±	12,82	0,042	18,47	±	1,36137	0,256	20,33	±	2,02
Hauteur des villosités (µm)	299,73	±	83,51	0,564	217,47	±	35,6238	0,146	267,28	±	31,98
Nombre de villosités	37,27	±	3,91	0,003	18,13	±	0,80829	0,001	22,53	±	0,50
GRANDEURS CALCULÉES											
Diamètre interne (µm)	1160,78	±	91,82	0,007	592,20	±	86,4009	0,008	862,30	±	42,92
Périmètre interne (µm)	3646,72	±	288,46	0,007	1860,46	±	271,437	0,008	2709,00	±	134,84
Epaisseur d'une villosité (µm)	98,15	±	6,55	0,008	102,40	±	12,2572	0,075	120,19	±	4,07
Nombre de villosités sur épaisseur de 1mm	10,22	±	0,66	0,010	9,86449	±	1,23628	0,104	8,32673	±	0,28
Nombre de villosités totales sur 1mm	381,87	±	57,85	0,004	178,477	±	18,1945	0,451	187,573	±	5,09929
Surface intestin sans villosités (µm ²)	3,65E+06	±	2,88E+05	0,007	1,86E+06	±	2,71E+05	0,008	2,71E+06	±	1,35E+05
Surface d'une villosité (µm ²)	9,34E+04	±	3,15E+04	0,721	7,07E+04	±	1,79E+04	0,074	1,01E+05	±	1,25E+04
SURFACE TOTALE (µm ²)	3,86E+07	±	9,74E+06	0,044	1,43E+07	±	2,80E+06	0,031	2,17E+07	±	2,70E+06
SURFACE TOTALE (mm ²)	38,63	±	9,74	0,044	14,31	±	2,79994	0,031	21,66	±	2,70171

Partie haute : valeurs mesurées sur les échantillons. Les villosités sont plus nombreuses et plus grandes sur le segment proximal en comparaison au distal.

Partie basse : valeurs calculées à partir des mesures et du modèle mathématique. La surface d'absorption est statistiquement significativement augmentée en proximal et diminuée en distal en comparaison aux témoins E21. Les valeurs de p notées en rouge rapportent un résultat statistiquement significatif.

Concernant les surfaces d'absorption, celle en amont de l'atrésie est environ 1,8 fois plus importante significativement par rapport à la surface d'absorption normale d'un témoin. Dans le segment d'aval, la surface d'absorption est significativement diminuée d'un facteur 1,5 (Figure 23).

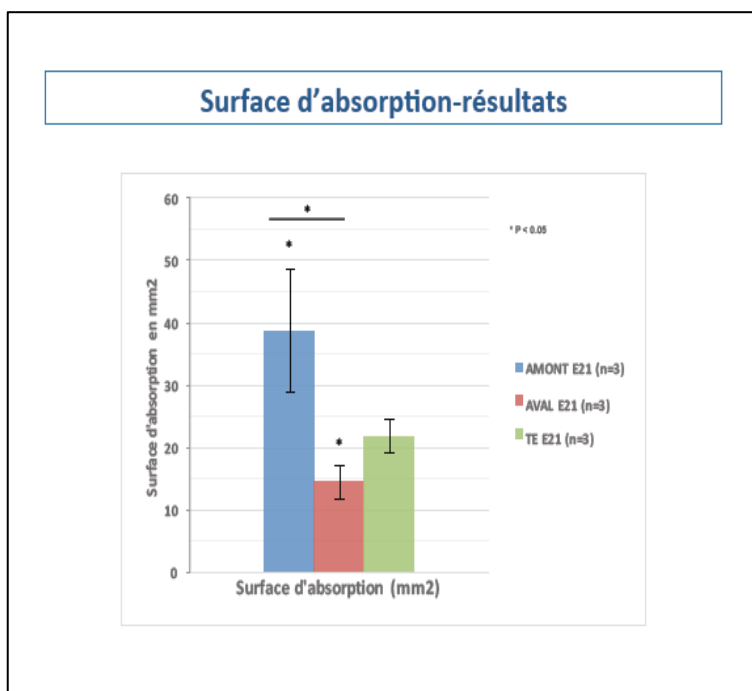


Figure 23 : Résultats de la surface d'absorption

Histogramme illustrant la différence statistiquement significative en terme de surface pour le segment d'amont et d'aval avec une augmentation en amont et une diminution en aval.

2) Résultats de l'analyse globale du transcriptome

a) Etude de la cinétique de développement chez les témoins

Les résultats rendent compte de l'évolution globale de l'expression de l'ensemble des gènes du transcriptome en fin de gestation de E15 à E21. Dans ce premier temps, il est procédé à une analyse globale. Cette analyse était réalisée pour déterminer à quel stade embryonnaire la différence d'expression génique différentielle était la plus marquée. L'ensemble des transcrits a ainsi été étudiée pour comparer les stades E15, E17, E19 et E21 (Figure 23). L'expression génique était étudiée sur des intestins de fœtus de rats témoins à différents stades de différenciation: E15 (n=3), E17 (n=3), E19 (n=3) et E21 (n=3). Chez les témoins, le nombre de gènes significativement sur ou sous exprimés était plus important entre E17 et E19 (Tableau 5). Globalement, cette expression différentielle va crescendo de E15 à E21 (Figure 24).

Tableau 5: Etude transcriptomique globale: résultats des témoins

	Contrôles E17 vs. E15	Contrôles E19 vs. E17	Contrôles E21 vs. E19
Gènes sur ou sous exprimés, $p < 0.05$	3853	6671	6032
Gènes sur exprimés, $p < 0.05$	2046	2597	2441
Gènes sous exprimés	1807	4074	3591

Etude de la variation d'expression génique sur l'ensemble des 20267 transcrits durant la fin de la gestation sur les fœtus témoins. La variation la plus importante se situe entre E17 et E19.

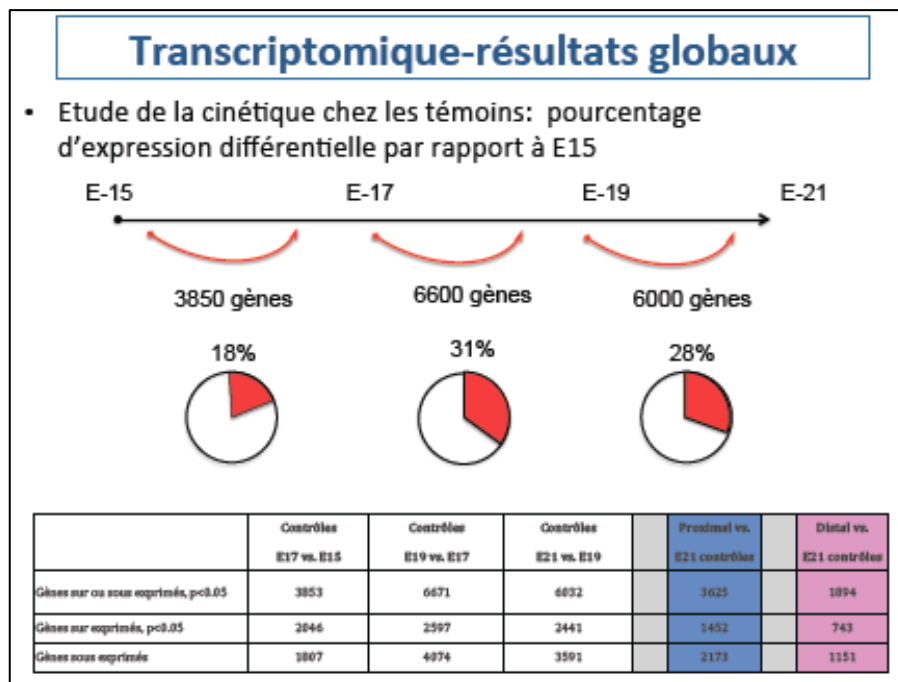


Figure 24 : Résultats de l'analyse globale transcriptomique : cinétique

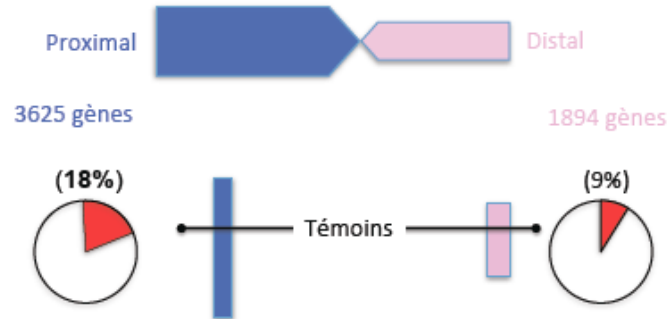
Etude de l'expression génique globale chez les contrôles. Le nombre de gènes avec une expression significativement modifiée (variation $>$ ou $<$ 1.2 champs) était calculée. L'expression génique est comparée à différents stades de développement: ED15, ED17, ED19, ED21. Il est observé une augmentation de cette modification d'expression avec un pic entre E17 et E19. Le nombre de gènes est exprimé soit en valeur absolue soit en pourcentage en référence aux 20.267 gènes étudiés.

b) Etude différentielle entre segments proximal et distal

Ensuite l'analyse s'est attachée à déterminer sur quel segment l'expression génique était la plus modifiée. L'expression génique était ainsi étudiée dans le segment proximal ($n=3$) et dans le segment distal ($n=3$) en comparaison aux témoins E21 ($n=3$). Ces résultats rendent compte de la différence d'expression génique entre l'intestin proximal et l'intestin distal. Diverses approches analytiques ont été utilisées pour les comparer. La première a été quantitative. Si l'on considère l'ensemble des gènes, en comparaison aux contrôles E21, 3625 gènes étaient significativement sur ou sous exprimés dans le segment proximal (18% des 20.267 gènes) alors que seulement la moitié (1894 gènes, 9%) étaient significativement modifiés dans le segment distal. La ligature semble avoir donc un effet supérieur sur le segment proximal en comparaison au segment distal (Figure 25).

Transcriptomique-résultats globaux

- Etude des intestins ligaturés: nombre de gènes sur ou sous exprimés (pourcentage exprimé en référence aux 21000 gènes étudiés)



	Contrôles E17 vs. E15	Contrôles E19 vs. E17	Contrôles E21 vs. E19		Proximal vs. E21 contrôles		Distal vs. E21 contrôles
Gènes sur ou sous exprimés, $p < 0.05$	3853	6671	6032		3625		1894
Gènes sur exprimés, $p < 0.05$	2046	2597	2441		1452		743
Gènes sous exprimés	1807	4074	3591		2173		1151

Figure 25 : Résultats globaux de la transcriptomique : proximal/ distal

L'expression génique était étudiée chez les contrôles et chez les rats avec atrésie. Le nombre de gènes avec une expression significativement modifiée a été déterminé pour les contrôles à différents stades de développement (ED15, ED17, ED19, ED21) et pour les rats avec atrésie. Le rapport des sur et sous-exprimés en comparaison aux témoins E21 était de 18% (3625 gènes) dans le segment proximal et de 9% (1894 gènes) dans le segment distal. La modification d'expression génique concerne donc plus le segment proximal que le segment distal. Au sein de ces modifications, environ un tiers des gènes sont sur exprimés et un tiers sont sous exprimés.

La deuxième analyse était qualitative. Il a été considéré les amplitudes de variations les plus importantes entre amont et aval. Parmi les gènes avec la plus grande amplitude, plus de la moitié ont trait au système épithélial ou endocrinien. Les autres facteurs ont un rôle dans le métabolisme cellulaire. Sur les 200 gènes avec la plus forte variation, un seul appartenait au système nerveux entérique. Le tableau 6 illustre les 50 facteurs ayant le plus grand écart entre le segment d'amont et celui d'aval. Les plus grandes variations de l'amont avec un segment d'aval normal, ou l'inverse, concernaient également les mêmes profils de gènes. Ces analyses à forte amplitude n'ont donc pas permis d'identifier le SNE comme un tissu avec une modification de son expression génique. A l'inverse, une tendance se dégage pour les systèmes épithélial et endocrinien.

Tableau 6: Etude des plus grands écarts entre segment d'amont et d'aval

Gènes présentant les plus fortes variations Amont/Aval

Symbole du gène	Nom	Fold-Change E15 à E21	valeur de p E15 à E21	F-C (AM vs. AV) Amont vs. Aval	valeur de p E15 à E21	Tissu	Fonction	Chromosome	
1	Tmprss15	transmembrane protease, serine 15	5.03842	0.0617542	8.21634	0.0432407	Endocrine	Activation enzyme	11q11
2	Gkn1	gastrin 1	-1.1226	0.0826494	7.99865	0.0218981	Endocrine	Enzyme digestive	4q34
3	Pnflprp1	pancreatic lipase-related protein 1	-2.16291	0.0279612	7.93142	0.0148893	Endocrine	Activation enzyme	1q55
4	RGD1307660	similar to hornerin	1.02918	0.502616	6.94704	0.0173768	Endocrine	Enzyme digestive	2q34
5	Cpa1	carboxypeptidase A1 (pancreatic)	-5.94811	0.0162026	6.93403	0.018127	Endocrine	Enzyme digestive	4q22
6	Ctrb1	chymotrypsinogen B1	-1.60643	0.137778	6.82969	0.0193863	Endocrine	Act. enzyme	19q12
7	Gkn2	gastrin 2	-1.28793	0.00577199	6.71228	0.0165646	Endocrine	Enzyme digestive	4q34
8	Pnflprp2	pancreatic lipase-related protein 2	-1.01832	0.588533	6.25644	0.0142882	Endocrine	Activation enzyme	1q55
9	Krt5	keratin 5	-1.53548	0.0144061	6.13796	0.0125723	Epithelium	Kératinisation	-
10	Krt1	keratin 1, type II	-1.17946	0.0854707	6.07076	0.0181434	Epithelium	Kératinisation	7a36
11	Cym	chymosin	-1.36658	0.000299769	6.03444	0.0158615	Endocrine	Enzyme digestive	2q34
12	Cpb1	carboxypeptidase B1 (tissue)	1.00575	0.922331	6.02323	0.0174291	Endocrine	Enzyme digestive	2q24
13	LOC691352	similar to Robo-1	6.88466	0.0193088	5.93761	0.0762266	Viscères	?	10q22
14	Cnfn	cornifelin	-1.17662	0.0108099	5.93756	0.0158941	Epithelium	Kératinisation	1q21
15	Defa5	defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	1.08674	0.331435	5.95959	0.0115973	Epithelium	Défense	16q12.5
16	Serpinb3a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor	-1.02884	0.518944	5.96805	0.0243935	Endocrine	Activation enzyme	13p13
17	Atp4b	ATPase, H+/K+ exchanging, beta polypeptide	-1.18124	0.0316965	5.432	0.0163224	Epithelium	Barrière	16q12.5
18	RGD1310935	similar to Dermal papilla derived protein 7	2.51944	0.000275956	5.4276	0.0191295	Viscères	?	11q12
19	Sfta3	stefin A3	1.16436	0.218622	5.41874	0.00683397	Epithelium	Défense	11q22
20	Prss3	protease, serine, 3	-1.19529	0.0161751	5.39698	0.0249844	Endocrine	Activation enzyme	4q22
21	Reg3g	regenerating islet-derived 3 gamma	2.13292	0.000434905	5.37934	0.00274919	Epithelium	Défense	4q33-q34
22	Spr4	small proline-rich protein 4	-1.14441	0.00710664	5.44576	0.0164404	Epithelium	Kératinisation	2q34
23	Cpa2	carboxypeptidase A2 (pancreatic)	-3.36829	0.0545243	5.30645	0.0248676	Endocrine	Enzyme digestive	4q22
24	Cel	carboxyl ester lipase	-1.55385	0.0120897	5.29468	0.0232138	Endocrine	Enzyme digestive	3p12
25	Muc6	mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming	-1.15828	0.00970887	5.27852	0.00187197	Epithelium	Barrière	1q41
26	Cip5	collipase, pancreatic	-1.07251	0.344243	5.24869	0.0190202	Endocrine	Enzyme digestive	20p12
27	RGD1311933	similar to RIKEN cDNA 2310057J18	7.26909	0.0505316	5.13309	0.176708	?	?	1p11
28	RGD1311224	similar to fatty acid desaturase 2; linoleoyl-CoA desaturase	-1.17475	0.0016172	5.05229	0.022979	Endocrine	Enzyme	3q24
29	LOC10255145	keratin, type II cytoskeletal 5-like	-1.74057	0.00705255	4.96203	0.0138248	Epithelium	Kératinisation	-
30	Atp4a	ATPase, H+/K+ exchanging, alpha polypeptide	-1.17707	0.0981392	4.94458	0.0223778	Estomac	Métabolisme	1q21
31	Serpinb12	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 12	-1.15293	0.223585	4.80067	0.0128098	Endocrine/sang	Act. Enz/ coag	13p13
32	Vsig1	V-set and immunoglobulin domain containing 1	-1.48521	0.127318	4.78252	0.00963343	Epithelium	Barrière	-
33	Aloxi2b	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	-1.2687	0.00975912	4.67547	0.0114215	Epithelium	Barrière	10q24
34	Dcfb4	defensin beta 4	-1.06229	0.474099	4.32772	0.0237657	Epithelium	Défense	16q12.5
35	Spr1a	small proline-rich protein 1A	-1.33657	0.00772997	4.22705	0.0185916	?	Métabolisme	2q34
36	Otop3	otopetrin 3	1.51864	0.20046	4.03965	0.0091435	Epithelium	Enzyme	10q32.3
37	Krt10	keratin 10, type I	-1.24709	0.000524944	4.03747	0.0257577	Epithelium	Barrière	10q32.1
38	Rptn	repetin	-1.27875	0.0353021	4.02958	0.0189789	Epithelium	Kératinisation	2q34
39	Aqp3	aquaporin 3	4.49896	0.0028985	3.93628	0.0231008	Endocrine	Canal aqueux	5q22
40	Tff1	trefoil factor 1	-1.43572	6.5249e-005	3.93533	0.0160557	Epithelium	Barrière	20p12
41	Cela3b	chymotrypsin-like elastase family, member 3B	-1.04796	0.397998	3.85741	0.0152739	Endocrine	Enzyme digestive	5q36
42	Serpinb10	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	-1.06573	0.212986	3.83777	0.0118789	Ubiquitaire	Hématopoïèse	13p13
43	Krt13	keratin 13, type I	-1.2039	0.0438993	3.78321	0.0140337	Epithelium	Barrière	10q32.1
44	Prss1	protease, serine, 1 (trypsin 1)	-1.0075	0.918356	3.77991	0.028167	Endocrine	Activation enzyme	4q22
45	Dpcr1	diffuse panbronchiolitis critical region 1	-1.20751	0.0465128	3.70001	0.0304735	Intestin	?	20p12
46	Slc18l8	slc18l8	1.46398	0.407307	3.65851	0.0285761	Epithelium	Barrière	8q24
47	Trex2	three prime repair exonuclease 2	-1.25333	0.0216693	3.63951	0.0153966	Ubiquitaire	Métabolisme ADN	-
48	Duoxa2	dual oxidase maturation factor 2	1.53459	0.00176597	3.63863	0.00587369	Ubiquitaire	Métabolisme	3q35
49	Adam28	ADAM metallopeptidase domain 28	1.15005	0.0323076	3.62297	0.0258834	Ubiquitaire	Interaction cellulaire	15p11
50	Krt4	keratin 4, type II	-1.05759	0.64378	3.6057	0.0369936	Epithelium	Barrière	7q36

Sur-exprimé, fold change >1.2

Sur-exprimé, fold change >3

Sous-exprimé, fold change <-2

Sous-exprimé, fold change <-1.2

Sur-exprimé, fold change >1.2

Sur-exprimé, fold change >3

Sous-exprimé, fold change <-2

Sous-exprimé, fold change <-1.2

Sur les 50 premiers gènes, la plupart concernent le système épithélial et endocrinien avec des fonctions de barrière et d'enzyme digestive.

3) Etude du SNE

a) Expression génique

(i) Transcriptome

Les mêmes gènes d'intérêt du SNE ont été sélectionnés pour l'étude cinétique et pour l'étude différentielle entre segments proximal et distal. Un résumé des principaux gènes d'intérêt pour les marqueurs du SNE est présenté dans la figure 26. Les résultats de l'étude transcriptomique sont présentés dans le Tableau 7. D'un point de vue cinétique, comme il a été décrit précédemment, une diminution globale des marqueurs est notée pour la composante neuronale entre E15 et E21. Il n'existe une décroissance cinétique pour la composante gliale, à savoir la vimentine et la protéine S100.

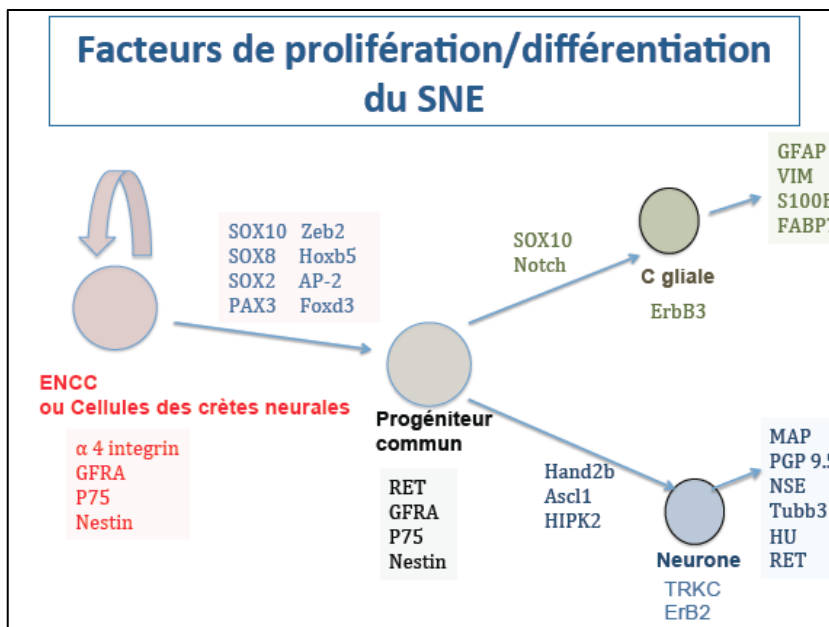


Figure 26 : Principaux marqueurs des cellules du SNE

Illustration des marqueurs des cellules de la lignée neuronale et gliale en fonction de leur niveau de différenciation depuis les cellules neurales issues des crêtes neurales jusqu'aux cellules différenciées.

Pour les intestins ligaturés comparés aux témoins E21, on note une diminution de l'expression génique sur le segment proximal, parfois significative (exemple avec le gène Nefm). Il n'existe pas de variation sur le segment distal. L'expression génique du SNE est donc représentative de l'expression génique générale avec une modification plus marquée sur le segment proximal. Le segment distal est très semblable à l'intestin des témoins.

Tableau 7: Etude transcriptomique ciblée sur le SNE

Analyse transcriptomique ciblée sur le système nerveux entérique							
Gènes		Cinétique témoins		Proximal		Distal	
Symbole	Nom	E21 vs. E15 Fold-change	E21 vs. E15 p-value	PROX vs. CTL Fold-Change	PROX vs. CTL p-value	DIST vs. CTL Fold-Change	DIST vs. CTL p-value
SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE							
Cellules Gliales							
Glaap	glial fibrillary acidic protein	1,10182	2,00E-01	1,22491	7,08E-02	1,03948	7,01E-01
Vim	vimentin	-1,76439	9,96E-06	-1,01549	6,86E-01	-1,00068	9,93E-01
S100	S100 protein	-1,73543	7,90E-07	-1,13788	2,32E-01	-1,05903	2,49E-01
Fabp7	fatty acid binding protein 7	-1,07101	3,16E-01	1,00749	8,75E-01	-1,02972	5,41E-01
Neurones							
Nefh	neurofilament, heavy polypeptide	-1,14882	1,31E-01	-1,03205	6,99E-01	-1,04826	5,66E-01
Nefl	neurofilament, light polypeptide	-1,28787	7,78E-02	-1,42091	1,13E-01	-1,03715	8,58E-01
Nefm	neurofilament, medium polypeptide	-1,16369	3,20E-01	-1,93974	1,12E-02	-1,15999	4,83E-01
Ita	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	-2,85736	1,24E-05	-1,3426	4,75E-02	1,01318	9,20E-01
Prph	peripherin	-1,13653	3,17E-01	-1,15644	2,97E-01	1,10358	4,71E-01
Tubb3	tubulin, beta 3 class III	-1,96385	3,68E-03	-1,09351	4,53E-01	1,04325	7,18E-01
Uchl1/PGP9.5	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	-3,02242	9,19E-07	-1,12631	2,14E-01	1,00723	9,37E-01
Elav4/HUD	ELAV like neuron-specific RNA binding protein 4	-1,51704	1,47E-02	-1,40518	1,11E-02	1,07608	4,99E-01
Elav1/HU	ELAV like RNA binding protein 1	-1,52941	1,57E-07	-1,01071	7,98E-01	-1,05372	2,30E-01
Sous-exprimé, fold change < -1,3 Sur-exprimé, fold change > 1,3							

Etude de la variation d'expression génique concernant le SNE durant la fin de la gestation sur les fœtus témoins et sur les fœtus ligaturés. Il existe une majoration de la sous expression génique dans le segment proximal.

La figure 27 illustre les résultats sous la forme d'une courbe de l'expression génique de PGP9.5 (ou Uchl1) à E17, E19, E21 et en amont et aval normalisée par rapport à E15. A noter qu'il n'existe aucune différence pour la composante gliale quel que soit le segment étudié.

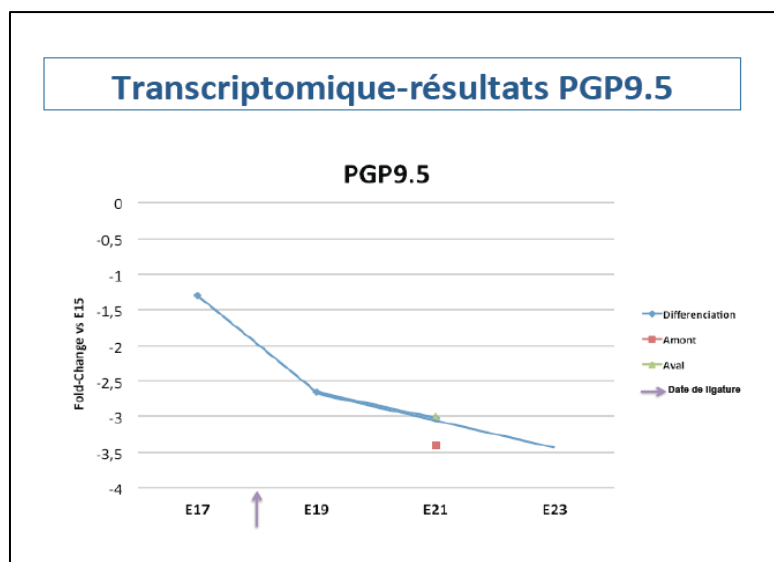


Figure 27 : Diagramme illustrant le résultat transcriptomique de PGP9.5

La normalisation est réalisée par rapport à E15 pour les intestins témoins E17, E19 et E21 et les intestins ligaturés. Il est noté une diminution progressive de l'expression génique entre E15 et E21. Le segment distal est comparable aux témoins E21 alors que le segment proximal est le siège d'une diminution en comparaison aux témoins E21. Le tracé bleu compris entre E21 et E23 indique la projection théorique de PGP9.5 si la tendance se poursuivait de manière identique.

Puis il a été considéré les facteurs impliqués dans la prolifération, la migration et la différenciation des dérivés des crêtes neurales. Il apparaît de manière globale une diminution progressive de l'expression de leur gène entre E15 et E21 (tableau 8). Le comportement semble être globalement superposable pour les facteurs de prolifération, pour les marqueurs de la migration et de la différenciation. Cette diminution a tendance à s'accroître entre E19 et E21.

Tableau 8: Etude transcriptomique cinétique des crêtes neurales.

Analyse transcriptomique cinétique ciblée sur les ENCC						
Gènes		Cinétique témoins				p
FACTEURS DE PROLIFERATION, MIGRATION ET SURVIE DES ENCC		VARIATIONS				valeur de p
Symbole	Nom du gène	ED15-ED17	ED17-ED19	ED19-ED21	ED15-ED21	ED15-ED21
FACTEURS DE PROLIFERATION						
Foxd3	forkhead box D3	-1,04347	-1,03750	-1,25333	-1,35695	2,46E-02
Sox10	SRF (sex determining region Y)-box 10	-1,21124	-1,42077	-1,12962	-1,95491	5,80E-08
Sox8	SRF (sex determining region Y)-box 8	-1,06799	-1,25402	-1,15153	-1,54222	1,13E-04
Sox2	SRF (sex determining region Y)-box 2	-1,23396	-1,42127	-1,14996	-2,01678	1,31E-06
Pax3	Paired box 3	-1,21057	-1,01372	1,07027	-1,14661	9,02E-02
AP-2 family	Adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit	-1,11334	-1,10598	-1,10069	-1,35531	2,22E-03
Zeb2	Zinc finger E-box binding homeobox 2	1,20856	-1,5245	-1,13496	-1,43166	6,26E-03
Hlx1	H2.0-like homeobox	1,07414	-1,72852	-1,16227	-1,07033	7,90E-05
Hoxb5	Homeo box B5	1,05948	-2,279	-1,21281	-1,1818	7,79E-05
Sall4	Spalt-like transcription factor 4	-1,78105	-1,14711	-1,16902	-2,38839	6,13E-06
Phox2b	Paired-like Homeobox 2b	1,19573	-2,43866	-1,37583	-2,00597	2,73E-05
RECEPTEURS						
RET	RET proto-oncogene	-1,31138	-1,67963	-1,19484	-2,63179	7,67E-05
GFRA1	GNF Family Receptor Alpha-1	-1,38137	-2,63817	-1,18754	-4,32775	9,59E-10
GFRA2	GNF Family Receptor Alpha-2	-2,5505	-1,77958	-1,01489	-4,6064	1,33E-04
Notch	Notch	1,12062	-1,30003	-1,21515	-1,40969	7,14E-05
LINGR / p75	Low-Affinity Nerve Growth Factor R	-1,24659	-1,13214	-1,21841	-1,71957	7,47E-05
MIGRATION SACREE						
EDNRB	Endothelin Receptor Type B	1,03396	-1,5613	-1,13225	-1,70973	1,37E-05
NRP1	Neuropilin-1	-1,14355	-1,91246	-1,08415	-2,37102	3,35E-05
MIGRATION CENTRIPETE						
DCC / CRCL1	Deleted in Colorectal Carcinoma	-1,67303	-2,80627	-1,0457	-4,9095	1,02E-07
UNC5A	Netrin receptor UNC5A	1,03463	-1,04732	-1,10017	-1,11367	1,41E-01
UNC5B	Netrin receptor UNC5B	-1,08675	-1,18484	-1,22637	-1,57911	7,57E-04
FACTEURS DE DIFFERENCIATION NEURONALE						
Hand2b		-1,56677	-1,44978	-1,22946	-2,7927	8,77E-03
Ascl1 / Mash1		1,01034	-1,95624	-1,24579	-2,41212	8,99E-05
HRP2		-1,48396	-1,22324	1,15258	-1,57493	2,27E-06

Légende:

ENCC: cellules nerveuses Indifférenciées dérivées des crêtes neurales

- Sous-exprimé, fold change < -1,2
- Sous-exprimé, fold change < -2
- Sur-exprimé, fold change > 1,2

Etude ciblée sur les marqueurs de prolifération et de migration des cellules nerveuses indifférenciées issues des crêtes neurales (ENCC)

Pour améliorer la facilité de lecture du transcriptome, les valeurs supérieures à 1,2 sont marquées en rouge et celles inférieures à -1,2 sont marquées en bleu. L'étude des facteurs de différenciation neuronale et gliale, ainsi que les facteurs de migration de ces cellules montrent des résultats plus hétéroclites. L'expression de ces facteurs est augmentée de E15 à E17 pour la lignée neuronale puis diminue de E17 à E21, en fin de gestation, pour les deux lignées neuronale et gliale (tableau 9).

Tableau 9: Etude transcriptomique cinétique ciblée sur les marqueurs des cellules nerveuses

Analyse transcriptomique cinétique ciblée sur les marqueurs des cellules nerveuses matures						
Gènes		Cinétique témoins				p
FACTEURS CELLULES NERVEUSES		VALEURS				VALEUR de p
Symbole du gène	Nom du gène	ED15-ED17	ED17-ED19	ED19-ED21	ED15-ED21	ED15-ED21
MARQUEURS DE LA LIGNEE NEURONALE						
NEFL	Neurofilament low subunit	1,20968	-1,35488	-1,14985	-1,28787	7,78E-02
NEFM	Neurofilament medium subunit	1,54355	-1,32883	-1,35173	-1,16369	3,20E-01
NEFH	Neurofilament high weight subunit	1,0223	-1,17351	-1,00079	-1,14882	1,31E-01
INA / NEFS	Internexin	-1,09782	-2,07352	-1,25524	-2,85736	1,24E-05
MAPs	microtubule-associated proteins	-1,39743	-1,37593	1,02735	-1,87158	4,75E-04
MAP5	microtubule-associated proteins = tau	1,15868	-1,14619	1,03396	1,04522	6,47E-01
DCX	doublecortin	1,11336	-1,95354	-1,10896	-1,94581	5,93E-05
Peripherin	Pheripherin/ intermediate filament	1,36046	-1,42476	-1,08524	-1,13653	3,17E-01
TUBB3 (TUB1)	Tubulin beta-3 chain	1,37786	-2,17649	-1,24325	-1,96385	3,68E-03
ELAVL4 (HUD; PNEM)	ELAV-like protein 4	1,23238	-1,75594	-1,06471	-1,51704	1,47E-02
ELAVL3 (HU)	ELAV-like protein 3	1,11822	-1,50214	-1,28105	-1,72087	4,58E-04
TTBK1	Tau tubulin kinase	1,05113	-1,03385	-1,22073	-1,20066	3,86E-02
TTBK2	Tau tubulin kinase	-1,19963	-1,54885	1,1438	-1,62446	7,91E-05
PGP / Uchl1	protein gene product 9.5	-1,29381	-2,04872	-1,14026	-3,02242	9,19E-07
MARQUEURS DE LA LIGNEE GLIALE						
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein	1,01376	-1,03537	-1,07882	-1,10182	2,00E-01
VIM	Vimentin	-1,03383	-1,39396	-1,22432	-1,76439	9,96E-06
S100B	S-100 protein	-1,08215	-1,04098	1,1244	-1,00186	9,82E-01
FABP7 (B-FABP)	Brain-Derived Fatty Acid Binding Protein	-1,02414	-1,0106	-1,0348	-1,07101	3,16E-01
Légende: Sur-exprimé, fold change >1,2 Sous-exprimé, fold change <-1,2 Sur-exprimé, fold change >2 Sous-exprimé, fold change <-2						

Le tableau 9 expose la cinétique des marqueurs des deux lignées cellulaires du système nerveux entérique. Concernant les neurones, on note une augmentation globale entre E15 et E17 (couleur rose) puis une diminution jusqu'à E21 (couleur bleue). Concernant les cellules gliales, on note une diminution le plus souvent non significative de l'expression génique de E15 à E21.

Tableau 10: Etude transcriptomique des cellules nerveuses.

Analyse transcriptomique cinétique ciblée sur les cellules nerveuses						
Gènes		Cinétique témoins				p
FACTEURS		VARIATIONS				VALEUR de p
DIFFÉRENCIATION DES NEURONES ET CELLULES GLIALES		ED15-ED17	ED17-ED19	ED19-ED21	ED15-ED21	ED15-ED21
Symbole	Nom du gène					
RECEPTEURS DE DIFFÉRENCIATION NEURONALE						
TRKC / NTRK3	Tropomyosin receptor kinase C	1,16064	-1,0711	1,2701	1,37627	0,0060508
ErbB2/ HER2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2	1,15613	1,51795	1,25102	2,19546	7,21E-07
MET		1,75999	1,06565	-1,247	1,50403	0,0899229
RECEPTEURS DE DIFFÉRENCIATION GLIALE						
ErbB3	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3	1,63573	1,36654	1,61558	3,61129	2,74E-07
LIGANDS DE DIFFÉRENCIATION NEURONALE						
NT3	Neurotrophin-3	-1,2632	-1,22118	1,02123	-1,51053	2,65E-04
Shh	Sonic hedgehog	-1,33126	-2,22758	-1,50067	-4,45024	7,00E-06
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	1,27075	-1,11277	1,50342	1,71685	2,02E-03
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	1,30941	-1,29856	-1,50033	-1,48789	1,84E-02
NOG	Noggin	1,21591	-1,38624	1,06884	-1,06666	3,99E-01
NRG1	Neuregulin 1	1,34497	-1,25225	-1,86867	-1,73985	1,27E-04
NRG2	Neuregulin 2	-1,13639	-1,45733	-1,13229	-1,87518	1,31E-05
NGF	Nerve Growth factor	1,37676	-1,45904	-1,15461	-1,22361	5,25E-02
SLI	Slit	-1,36805	-1,6597	-1,06465	-2,41744	1,79E-04
LIGANDS DE MIGRATION NEURONALE						
Migration crano caudale						
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor	-1,54411	-1,22687	-1,26499	-2,39645	1,76E-05
NRTN	Neurturin	-1,0101	-1,12478	-1,1461	-1,30212	1,97E-02
Ihh	Indian hedgehog	1,8958	1,74549	1,02041	3,37669	5,63E-08
Migration centripète						
DCC 1	Deleted in Colorectal Cancer (netrin)	1,14232	-1,55723	1,01832	-1,33869	1,14E-01
DCC 2	Deleted in Colorectal Cancer (netrin)	-1,24454	-1,89678	-1,76862	-4,17505	6,90E-07
DCC 4	Deleted in Colorectal Cancer (netrin)	-1,38612	-1,82032	-1,15652	-2,91809	4,50E-08

Légende:

 Sur-exprimé, fold change >1,2
 Sous-exprimé, fold change <-1,2

 Sur-exprimé, fold change >2
 Sous-exprimé, fold change <-2

Etude cinétique ciblée sur les marqueurs de différenciation des cellules nerveuses

Tableau 11: Etude transcriptomique cinétique ciblée sur les marqueurs des sous types de neurones

Analyse transcriptomique cinétique ciblée sur les sous types neuronaux						
Gènes		Cinétique témoins				p
FACTEURS		VARIATIONS				VALEUR DE p
SOUS TYPES NEURONAUX		ED15-ED17	ED17-ED19	ED19-ED21	ED15-ED21	ED15-ED21
Symbole	Nom du gène					
Cholinergiques						
CHAT	Choline acetyltransferase	1,26433	-1,2079	-1,18137	-1,12865	1,08E-01
AChE	Acetylcholinesterase	1,15674	-1,18099	1,56026	1,52822	2,14E-03
Adrenergiques						
DDC	DOPA decarboxylase	1,06141	2,18654	-2,07254	1,1198	3,19E-01
TH	Tyrosine hydroxylase	-2,13417	-1,57358	-1,13334	-3,80609	3,19E-07
DBH / DBM	dopamine beta-hydroxylase	-2,05392	-2,22931	-1,10187	-5,04525	1,25E-06
PNMT	Phenylethanolamine N-methyltransferase	1,00095	-1,08218	-1,00106	-1,08231	1,26E-01
COMT	Catechol-O-methyltransferase	1,34016	2,56469	-1,38667	2,47866	1,08E-04
MARQUEURS SYNAPTIQUES						
SYP	Synaptophysin	1,33612	-1,27104	1,05591	1,10997	2,68E-02
VAMP2	Vesicle associated membrane proteins	-1,20417	-1,03894	1,02234	-1,22372	1,57E-02
VAMP3	Vesicle associated membrane proteins	1,02688	1,16304	1,01653	1,21405	2,42E-02
VAMP5	Vesicle associated membrane proteins	-1,06853	-1,23199	1,0543	-1,24862	4,97E-02
VAMP7	Vesicle associated membrane proteins	1,36512	1,42747	1,17459	2,23889	9,13E-08
VAMP8	Vesicle associated membrane proteins	1,19674	1,51323	1,85666	3,3623	5,77E-07
STX1	Syntaxins	-1,15946	-1,44645	1,06062	-1,58123	3,01E-05
STX2	Syntaxins	-1,01386	-1,56118	-1,12229	-1,77639	1,01E-05
STX3	Syntaxins	1,2673	3,16873	1,82325	7,32168	2,39E-09
SNAP25	aptosomal-associated protein 25	1,13628	-1,14723	1,33028	1,31758	7,66E-02
a-syn	alpha-synuclein	-1,15957	1,01461	-1,09437	-1,25071	1,51E-02
NRXN1	Neurexin 1	1,11354	-1,35984	-1,68318	-2,05547	2,03E-03
NRXN2	Neurexin 2	-1,26111	-1,33936	1,07976	-1,56432	2,73E-02
NRXN3	Neurexin 3	-1,24272	-1,71212	-1,35958	-2,89276	6,45E-06
NLGN	Neurologin	-1,05711	-1,46881	-1,18358	-1,83774	2,41E-05

Légende:

 Sur-exprimé, fold change >1,2
 Sous-exprimé, fold change <-1,2

 Sur-exprimé, fold change >2
 Sous-exprimé, fold change <-2

Le tableau 11 illustre la cinétique d'expression génique des sous types neuronaux. L'on observe des évolutions très disparates en fonction des sous types neuronaux. Il est à souligner que très peu de marqueurs ont une cinétique plate. Le tableau cinétique 12 montre un profil très différent en comparaison avec celui des cellules neuroendocrines dont l'expression de leurs gènes augmente régulièrement de E15 à E21.

Tableau 12: Etude transcriptomique cinétique ciblée sur les marqueurs des cellules endocrines

Analyse transcriptomique cinétique ciblée sur les sous types neuronaux

Gènes		Cinétique témoins			p	
FACTEURS		VARIATIONS				VALEUR DE
SOUS TYPES NEURONAUX		ED15-ED17	ED17-ED19	ED19-ED21	ED15-ED21	ED15-ED21
Symbole	Nom du gène					
CELLULES NEUROENDOCRINES						
CALB2	Calretinin	-1,06381	1,92495	1,3793	2,49582	1,79E-04
CALB1	Calbindin	1,12012	1,06483	1,01814	1,21436	2,66E-01
TAC3 TAC1	tachykinin	1,05432	1,22651	1,35989	1,75852	6,68E-05
VIP	vasoactive intestinal peptide	1,30173	1,42621	1,71199	3,17837	2,44E-07
NOS	nitric oxyde synthase	-1,07158	1,33993	1,31234	1,39603	1,17E-03
SST / SMST	Somatostatin	1,21822	2,10417	1,08275	2,77573	3,64E-03
CGRP	Calcitonin gene related peptide	1,29591	1,25882	1,02233	1,66774	1,25E-04
CCK	Cholecystokinin	-1,09703	1,22723	-1,02525	1,09113	5,25E-01
TPH2	Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) - 5HT	1,54508	1,29236	1,73103	3,45652	1,93E-05

Légende:

Sur-exprimé, fold change >1,2

Sur-exprimé, fold change >2

(ii) RT-PCRq

En comparaison aux témoins E21, les marqueurs du SNE sont globalement diminués dans les deux segments proximal et distal. Ainsi, la calbindine 1 est significativement sous-exprimée dans le segment proximal ($p < 0,0001$). L'acétylcholine estérase est diminuée dans les deux segments mais de manière non significative ($p > 0,05$). Une exception existe pour la calrétinine qui est significativement augmentée ($p < 0,05$) dans le segment d'aval. Ces résultats sont illustrés dans la figure 28. Ces analyses ont été normalisées par deux gènes de référence, HPRT et TBP, qui ont donné des résultats similaires et donc corrélés l'un à l'autre, ce qui est en faveur de la validité des résultats.

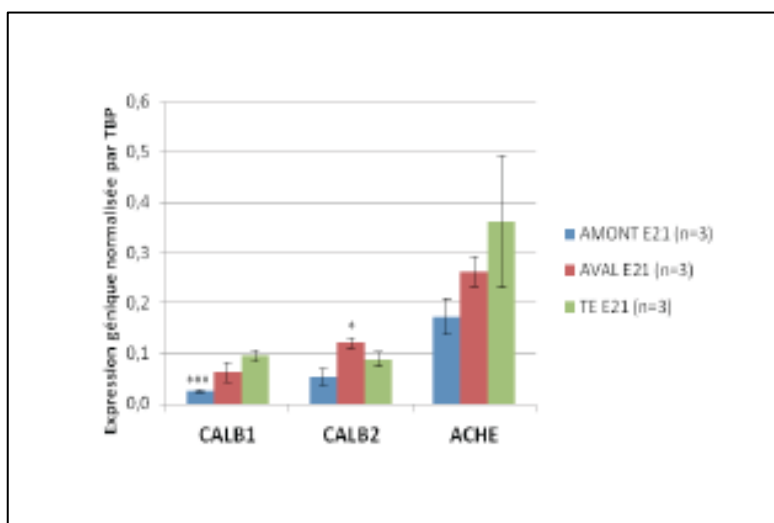


Figure 28 : Résultats d'expression génique des marqueurs du SNE en RT-PCRq. Illustration de la diminution des marqueurs relatifs au SNE en amont de la ligature.

b) Histopathologie

Nous décrivons ici l'analyse par immunohistochimie et par microscopie électronique.

(i) Immunohistochimie

Les marqueurs retenus ont été la calrétinine et l'acétylcholinetransférase. Ceux-ci ont permis d'étudier respectivement le plexus myentérique et sous muqueux. La localisation précise des ganglions du plexus myentérique a bien été observée entre les deux couches musculaires. La maturation et l'évolution du SNE ont été notées chez les fœtus témoins de E18 et E21 (Figure 29). On note une disposition continue de ce plexus jusqu'au terme E18, date à partir de laquelle se scindent des unités ganglionnaires. L'aspect mature de ces ganglions chez les témoins E21 se définit par des unités arrondies, régulières et bien distinctes.

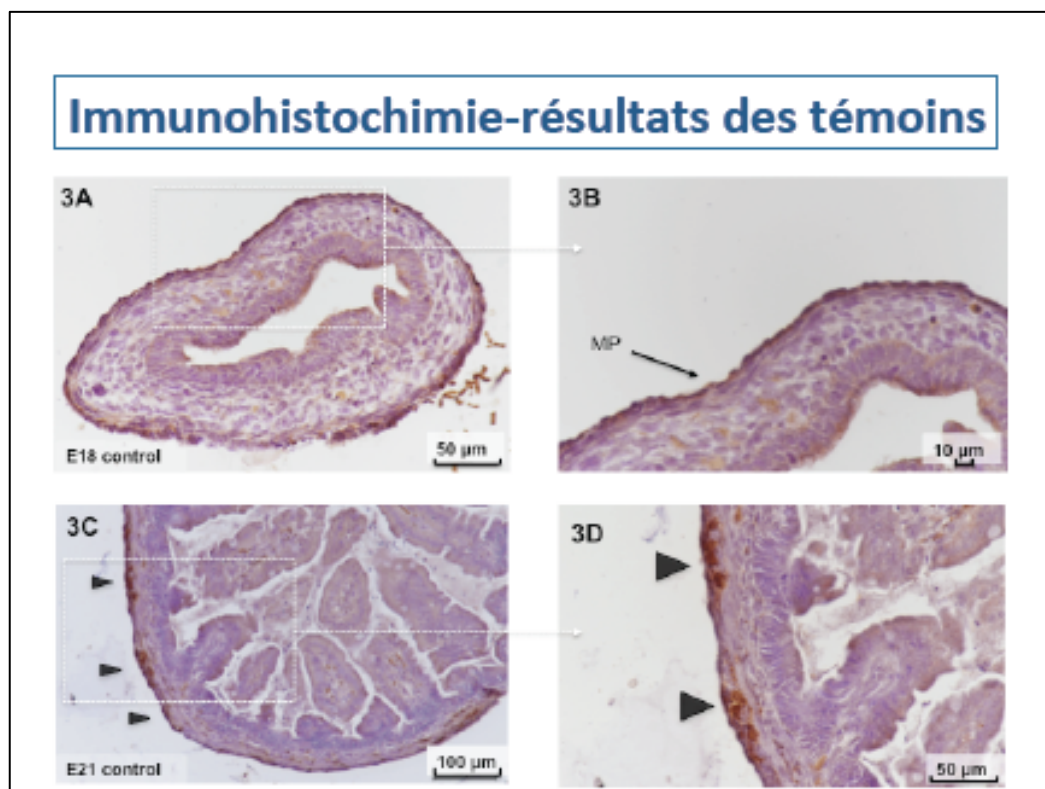


Figure 29 : Résultats IHC des marqueurs du SNE sur des rats témoins

Immunohistochimie réalisée sur des fœtus contrôles E18 avec des anticorps anti-calrétinine (A et B), des contrôles E21 (C et D), sur des segments proximaux (E et F) et distaux (G et H) (Grossissement respectif X20 and X40). Les flèches noires indiquent le plexus myentérique situé entre la couche circulaire et longitudinale de la couche musculaire.

Pour les intestins ligaturés, il existe une différence entre les segments proximal et distal (Figure 30). En proximal, le nombre de ganglions est plus important que chez les témoins E 21, en particulier lorsque l'on s'éloigne de la ligature (Au delà de 1 cm, figure 31) où cette différence est statistiquement significative ($p < 0.01$). L'aspect morphologique est identique aux témoins. Dans la partie distale et sur les segments juxta atrétiques, le nombre de ganglions est diminué. Cette différence est statistiquement significative ($p < 0.05$) sur le segment le plus en aval (S2 ou D2). Concernant la morphologie de ces ganglions, leur aspect apparaît intermédiaire entre celui des témoins E18 et E21.

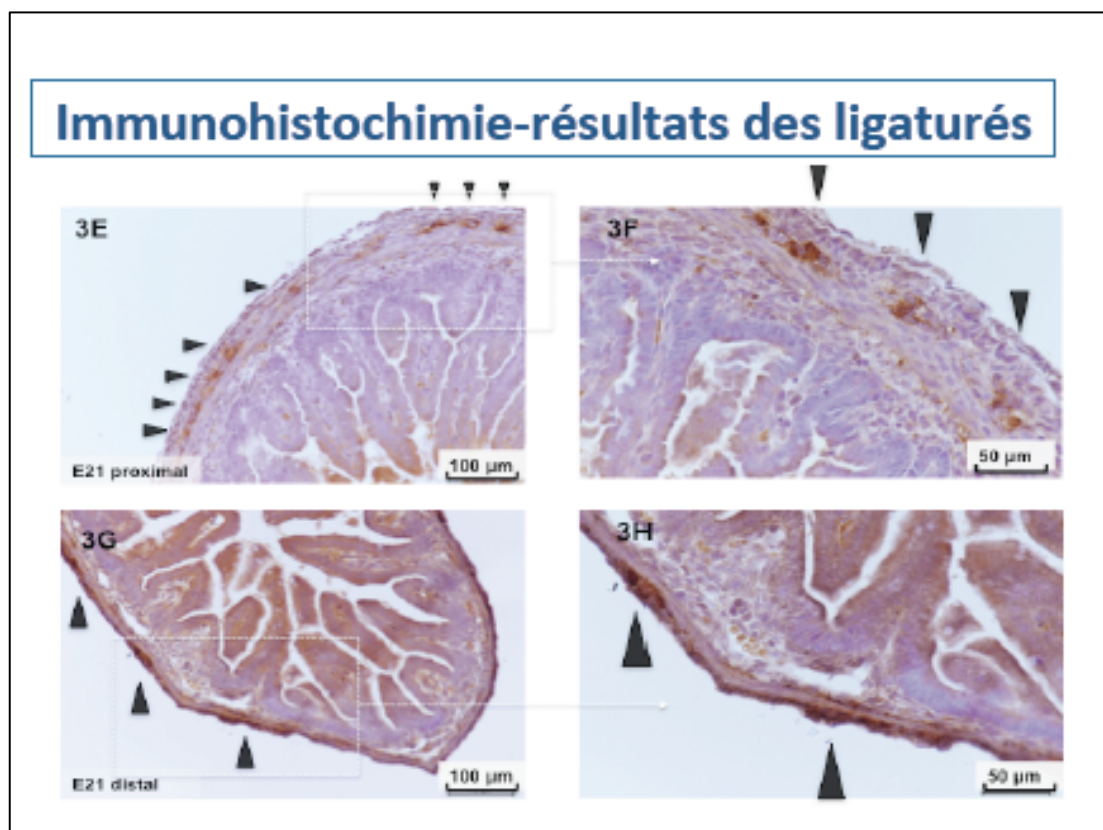


Figure 30 : Résultats IHC des marqueurs du SNE sur des rats ligaturés

Immunohistochimie réalisée sur des fœtus ligaturés avec des anticorps anti-calrétinine au niveau des segments proximaux (E et F) et distaux (G et H) (Grossissement respectif X20 and X40). Les flèches indiquent le marquage de ganglions nerveux larges et ronds dans le segment proximal (F) en comparaison à des ganglions plus allongés dans le segment distal ou dans les intestins contrôle (H).

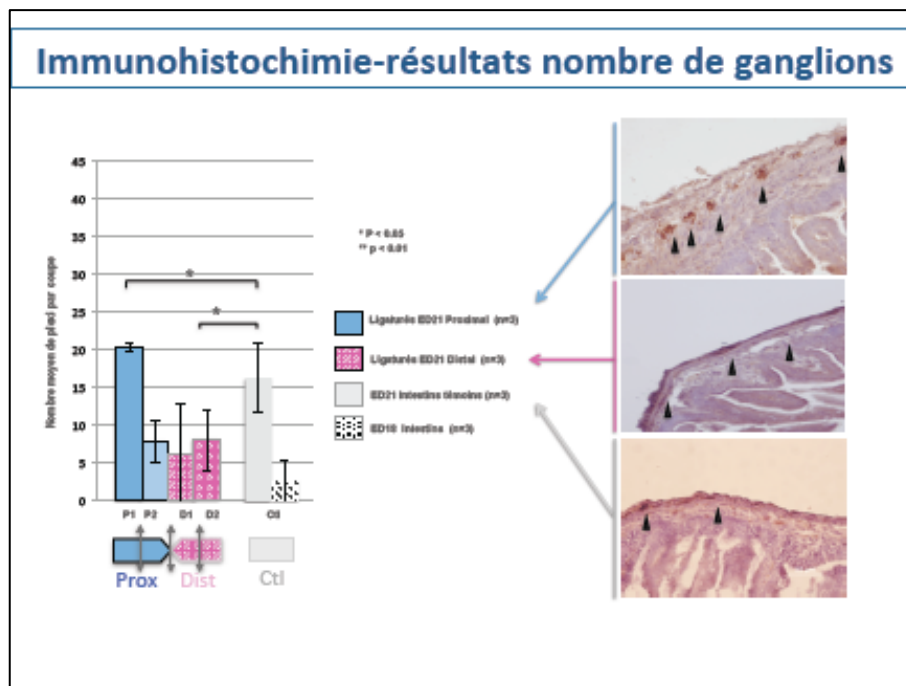


Figure 31 : Etude quantitative des ganglions nerveux du SNE

Etude quantitative du nombre de ganglions nerveux en amont et en aval de la ligature. Chaque segment en amont (P1 et P2) et en aval (D1 et D2) mesure 1cm de long. En amont, le nombre de ganglions est statistiquement significativement plus élevé à distance de l'atrésie (P1) en comparaison aux témoins. En aval, ce nombre est également statistiquement diminué.

(ii) Microscopie électronique

Le but ici était l'analyse ultrastructurale de la musculature et du système nerveux entérique. Le plexus nerveux myentérique, situé entre les deux couches de la musculature, est constitué de cellules gliales, de corps cellulaires neuronaux et de fibres nerveuses du système nerveux périphérique. La majorité des neurones appartiennent au système nerveux autonome. Il a été facile d'identifier les fibres amyéliniques mais les corps cellulaires des neurones, ainsi que les cellules gliales ont été plus difficiles à caractériser.

Chez les contrôles E21, la microscopie électronique retrouvait ces fibres non myélinisées localisées entre les deux couches avec des mitochondries au sein des axones (Figure 31). Dans le segment proximal, le nombre de ces fibres était diminué et le nombre de cellules par ganglion était augmenté en comparaison aux témoins (Figure 32). Dans le segment distal, le nombre de fibres amyéliniques était diminué en comparaison aux témoins (Figure 32).

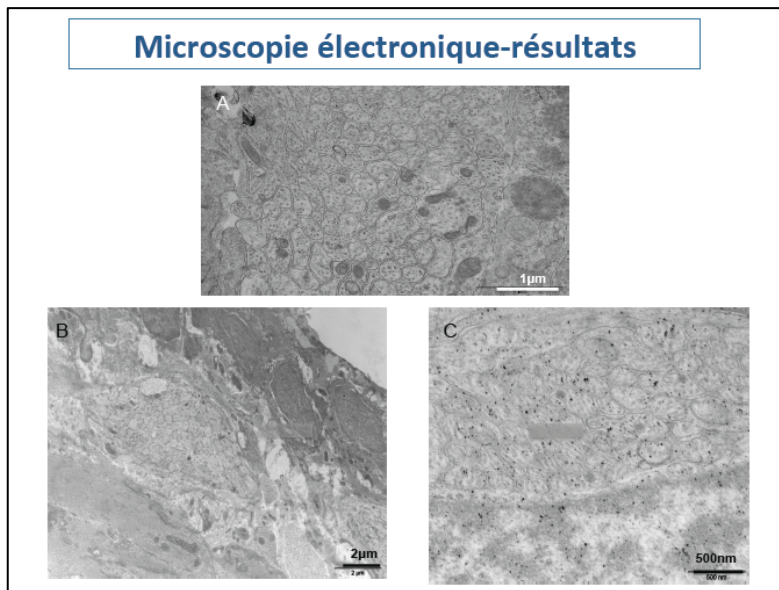


Figure 32 : Clichés de microscopie électronique

Photos de microscopie électronique des fibres amyéliniques des contrôles E21 (A) du segment proximal des intestins ligaturés (B). Une réduction du nombre des fibres amyéliniques est observée dans le segment distal (C).

Concernant les intestins témoins E21 (*Figure 33*), les fibres amyéliniques sont régulières et regroupées en « cluster » situées entre les couches musculaires. Au sein des axones, des microtubules et des mitochondries sont observables. Les mitochondries sont assez denses aux électrons (*Figure 33*).

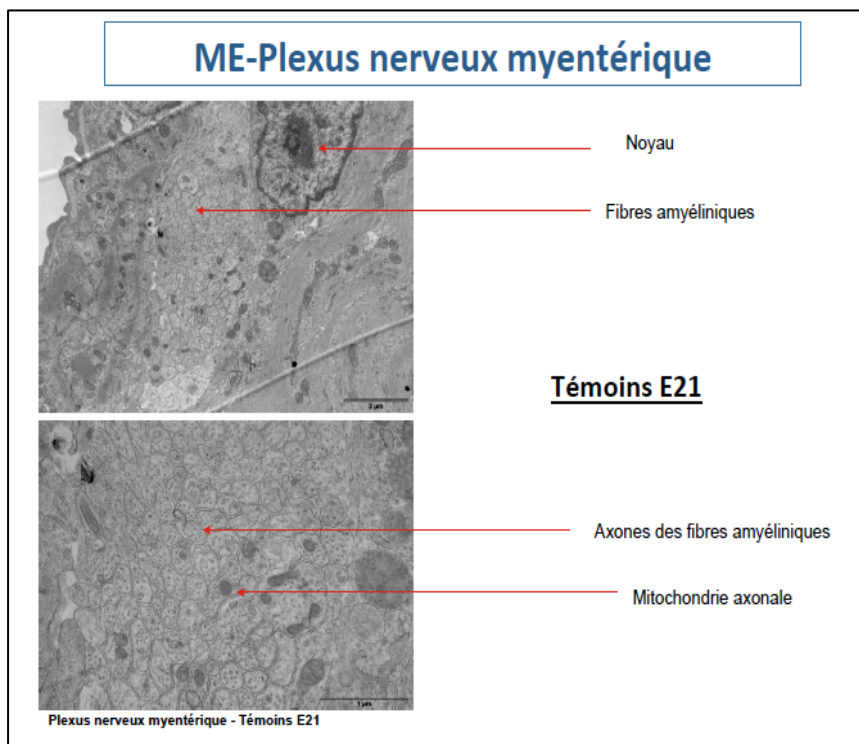


Figure 33 : Clichés de microscopie électronique sur fœtus témoins E21

Ultrastructure du système nerveux myentérique des intestins de fœtus témoins E21

Concernant les intestins d'amont (*Figure 34*), les fibres amyéliniques sont regroupées et faciles à trouver. Le diamètre des fibres semble plus hétérogène. Au sein des axones, se trouvent des microtubules et des mitochondries denses (*Figure 34*). Le nombre de cellules par ganglion semble augmenté en comparaison aux témoins.

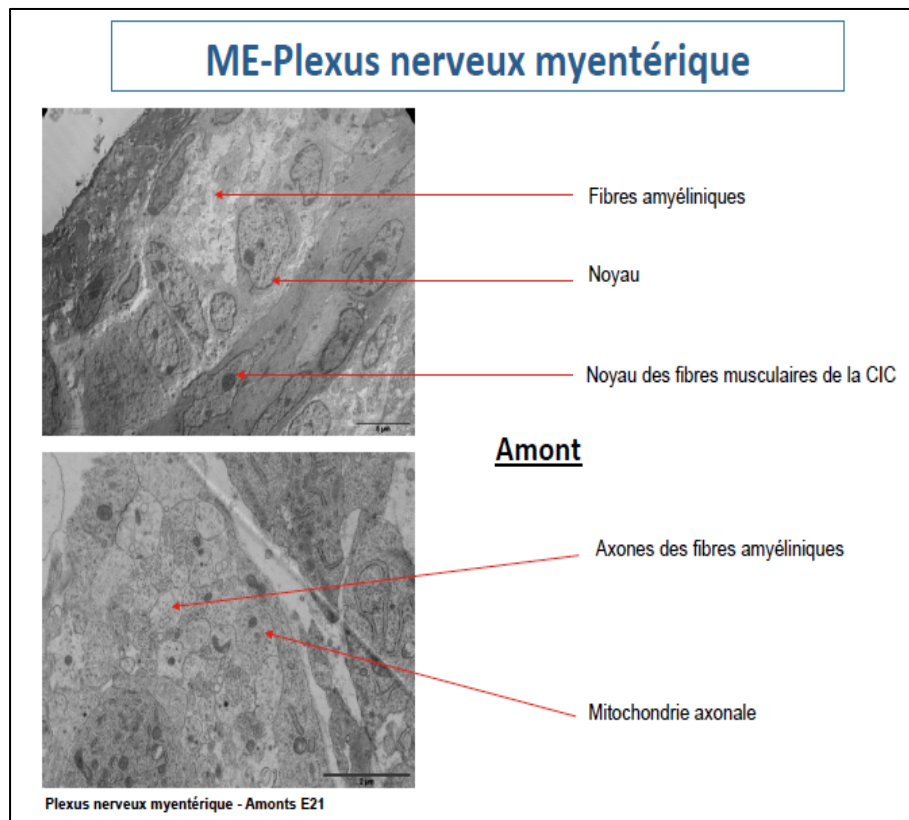


Figure 34 : Clichés de microscopie électronique sur les intestins d'amont
Ultrastructure en microscopie électronique du système nerveux myentérique des intestins d'amont

Concernant les intestins d'aval (*Figure 35*), les « clusters » de fibres amyéliniques sont plus rares et les fibres moins nombreuses. Les axones comportent des microtubules mais les mitochondries sont plus rares.

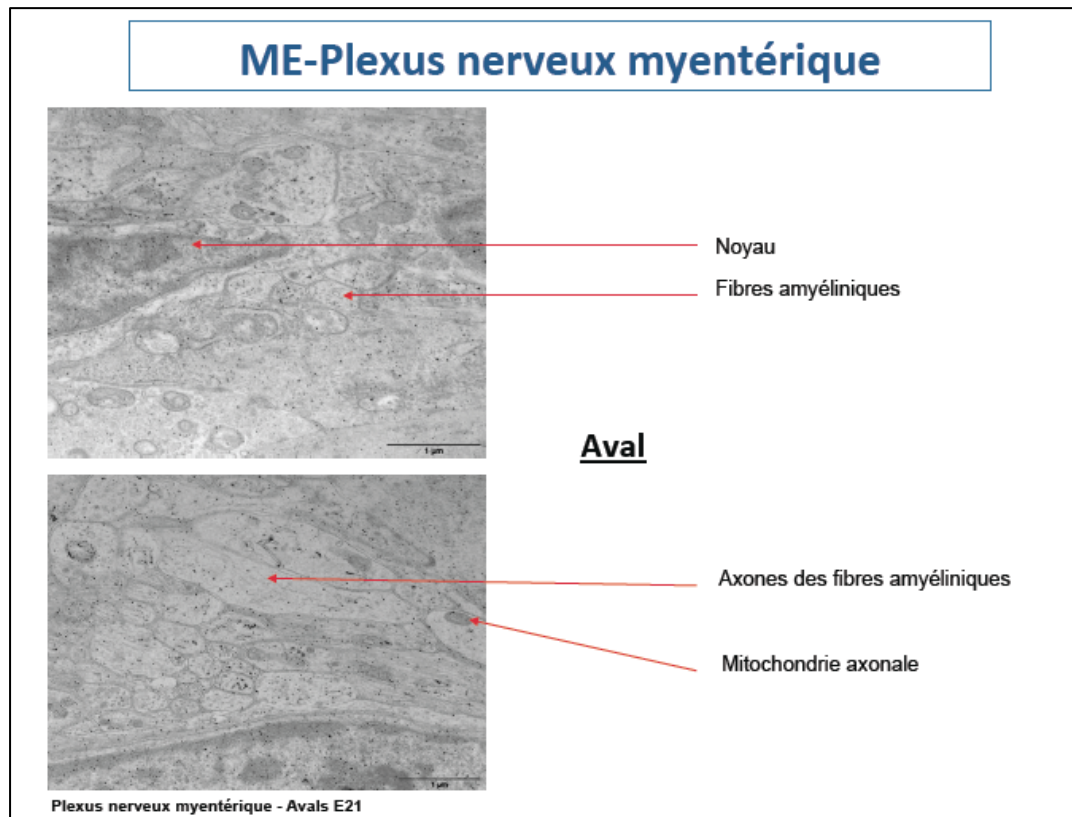


Figure 35 : Clichés de microscopie électronique sur les intestins d’aval
 Ultrastructure en microscopie électronique du système nerveux myentérique des intestins d’aval

De ces résultats morphologiques pour le SNE, il ressort donc un aspect ultra structural anormal pour le segment proximal et pour le segment distal en comparaison avec l’intestin des témoins.

4) Etude des cellules neuroendocrines

Les résultats relatifs à ces cellules étaient tout à fait inattendus. Leur sujet a été porté à notre attention du fait de l'approche globale par transcriptomique.

a) Expression génique

(i) Transcriptome

Les mêmes gènes d'intérêt du système endocrine (SE) ont été sélectionnés pour l'étude cinétique et pour l'étude différentielle entre segments proximal et distal. Les résultats sont présentés dans un tableau commun avec les marqueurs du SNE (tableau 13). Du point de vue cinétique, comme il a été évoqué dans un chapitre ultérieur, une augmentation globale des marqueurs du SE est notée entre E15 et E21.

Tableau 13: Etude transcriptomique ciblée sur les marqueurs du SE et du SNE

Analyse transcriptomique ciblée sur le SNE et le SE							
Gènes		Cinétique témoins		Proximal		Distal	
Symbole	Nom	E21 vs. E15 Fold-change	E21 vs. E15 p-value	PROX vs. CLT Fold-Change	PROX vs. CLT p-value	DIST vs. CTL Fold-Change	DIST vs. CTL p-value
SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE							
Cellules Gliales							
Cfap	glial fibrillary acidic protein	1,10182	2,00E-01	1,22491	7,08E-02	1,03948	7,01E-01
Vim	vimentin	-1,76439	9,96E-06	-1,01549	6,86E-01	-1,00068	9,93E-01
S100	S100 protein	-1,73543	7,90E-07	-1,13788	2,32E-01	-1,05903	2,49E-01
Fabp7	fatty acid binding protein 7	-1,07101	3,16E-01	1,00749	8,75E-01	-1,02972	5,41E-01
Neurones							
Nefn	neurofilament, heavy polypeptide	-1,14882	1,31E-01	-1,03205	6,99E-01	-1,04826	5,66E-01
Nefl	neurofilament, light polypeptide	-1,28787	7,78E-02	-1,42091	1,13E-01	-1,03715	8,58E-01
Nefm	neurofilament, medium polypeptide	-1,16369	3,20E-01	-1,93974	1,12E-02	-1,15999	4,83E-01
Ina	Internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	-2,85736	1,24E-05	-1,3426	4,75E-02	1,01318	9,20E-01
Prph	peripherin	-1,13653	3,17E-01	-1,15644	2,97E-01	1,10358	4,71E-01
Tubb3	tubulin, beta 3 class III	-1,96385	3,68E-03	-1,09351	4,53E-01	1,04325	7,18E-01
Uchl1/PGP9.5	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	-3,02242	9,19E-07	-1,12631	2,14E-01	1,00723	9,37E-01
Elavl4/HUD	ELAV like neuron-specific RNA binding protein 4	-1,51704	1,47E-02	-1,40518	1,11E-02	1,07608	4,99E-01
Elavl1/HU	ELAV like RNA binding protein 1	-1,52941	1,57E-07	-1,01071	7,98E-01	-1,05372	2,30E-01
SYSTEME ENTERO-ENDOCRINE							
Chga	chromogranin A	2,83339	6,72E-05	1,25727	1,71E-01	-1,05472	7,35E-01
Chgb	chromogranin B	6,38206	3,46E-04	1,46672	1,89E-01	-1,19689	5,19E-01
Tph1	tryptophan hydroxylase 1	3,45652	1,93E-05	2,02184	1,22E-02	-1,05944	7,98E-01
Tph2	tryptophan hydroxylase 2	1,03773	5,65E-01	1,08805	2,80E-01	1,08041	3,19E-01
Sst	somatostatin	2,77573	3,64E-03	1,70864	1,16E-01	1,03539	9,12E-01
Cck	cholecystokinin	1,09113	5,25E-01	1,62984	1,41E-02	-1,06393	7,02E-01
Vip	vasoactive intestinal peptide	3,17837	2,44E-07	-1,00192	9,91E-01	1,02064	9,00E-01
Gip	gastrin releasing peptide	-1,11184	8,35E-02	1,02021	7,74E-01	-1,06103	4,04E-01
Gip	gastric inhibitory polypeptide	1,55806	2,31E-01	1,43702	4,54E-01	-1,40495	4,81E-01
Sct	secretin	4,47428	7,23E-05	2,28226	1,71E-02	1,55845	1,46E-01

 Sur-exprimé, fold change >1,3
 Sous-exprimé, fold change <-1,3

Etude de la variation d'expression génique concernant le SE durant la fin de la gestation sur les fœtus témoins et sur les fœtus ligaturés. Il existe une majoration de la sur expression génique dans le segment proximal. Il existe très peu de variation dans le segment distal.

Concernant les intestins ligaturés comparés aux témoins E21, on note une augmentation de l'expression génique sur le segment proximal. Il n'existe pas de variation sur le segment distal. L'expression génique du SE est aussi représentative de l'expression génique générale avec une modification plus marquée sur le segment proximal. Le segment distal est très semblable à l'intestin des témoins. Une illustration de ces données est proposée en présentant pour exemple la somatostatine à E17, E19 et E21 normalisée par rapport à E15 sous la forme d'une courbe (Figure 36).

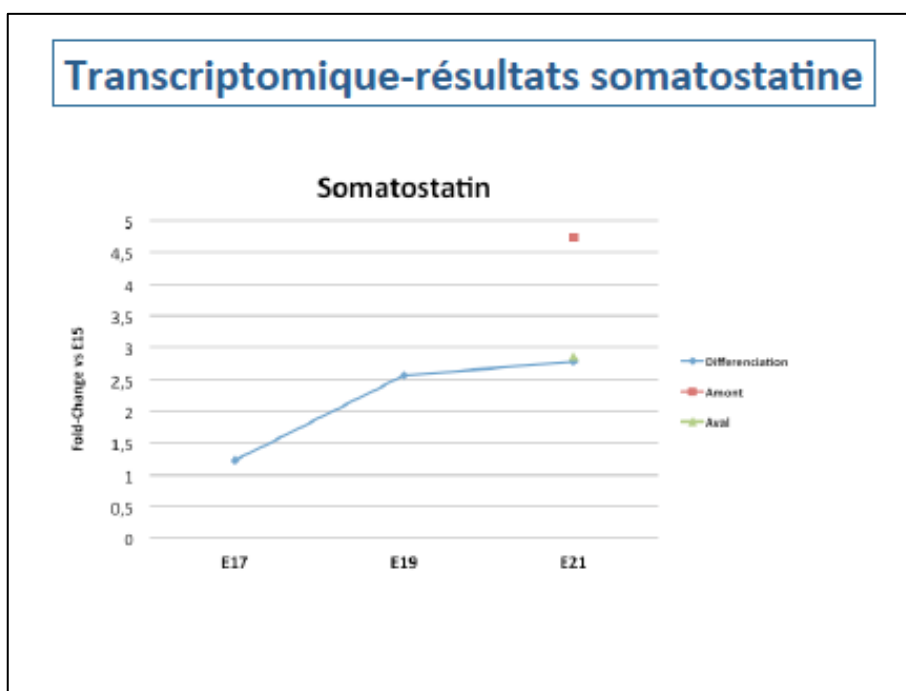


Figure 36 : Expression génique par transcriptomique de la somatostatine.

La somatostatine a été choisie à titre d'exemple pour sa bonne représentativité du SE. Elle illustre en effet une augmentation de l'expression génique de E15 à E21 chez l'intestin témoin.

L'expression en amont est également augmentée à E21 en comparaison au témoin.

Nous nous sommes également intéressés aux variations des récepteurs du SE comme illustré dans le tableau 14. Dans ce dernier, sont rapportés quelques récepteurs dont ceux de la somatostatine et la sérotonine ainsi que des mécanorécepteurs. La cinétique chez les témoins est plutôt stable voire dégressive entre E15 et E21, ce qui diffère des marqueurs enzymatiques du SE. L'exception est le transporteur de la sérotonine qui a une cinétique positive et une diminution (faible et équivalente) dans chacun des segments ligaturés. A

noter une cinétique négative du barorécepteur Piezo 2 associée à une diminution marquée en amont et en aval.

Tableau 14: Etude transcriptomique ciblée sur les récepteurs du SE

Etude de la variation d'expression génique concernant les récepteurs du SE durant la fin de la gestation sur les fœtus témoins et sur les fœtus ligaturés. Il existe peu de variation chez les témoins pour la cinétique mais également pour les ligaturés. Les principales variations concernent le récepteur Piezo 2.

Analyse transcriptomique des récepteurs du SE									
Gènes		Cinétique témoins		Proximal		Distal			
Symbole	Nom	E21 vs. E15 Fold-change	E21 vs. E15 p-value		PROX vs. CLT Fold-Change	PROX vs. CLT p-value		DIST vs. CTL Fold-Change	DIST vs. CTL p-value
RECEPTEURS DU SYSTEME ENTERO-ENDOCRINE									
Récepteurs de la sécrétine et de la somatostatine									
Sctr	secretin receptor	-2.57222	3.77E-05		1.09429	0.592		-1.00079	0.996
Sstr1	somatostatin receptor 1	1.11046	0.141		1.14214	1.45E-02		1.14358	1.38E-02
Sstr2	somatostatin receptor 2	-1.12945	0.099		1.09553	0.693		1.12168	0.623
Sstr3	somatostatin receptor 3	-1.24946	1.77E-02		1.16616	4.23E-02		1.20079	1.94E-02
Sstr4	somatostatin receptor 4	-1.05737	0.435		-1.10218	0.260		-1.02782	0.744
Sstr5	somatostatin receptor 5	-1.31943	5.78E-03		1.08289	0.263		1.02436	0.728
Récepteurs de la sérotonine									
Htr1a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	-1.13182	0.154		1.03453	0.794		1.07059	0.603
Htr1b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	-1.62487	4.74E-05		1.13456	0.325		-1.05037	0.696
Htr1d	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D	-1.02419	0.715		1.09668	0.221		-1.01535	0.834
Htr1f	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F	-1.13725	0.209		1.07941	0.339		-1.03453	0.666
Htr2a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	1.10758	0.357		1.10738	0.555		1.08842	0.623
Htr2b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	-1.01098	0.911		1.13134	0.620		1.24283	0.388
Htr2c	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C	-1.09212	0.272		1.09845	0.345		1.12975	0.226
Htr3a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A	1.08772	0.336		-1.00565	0.944		1.01523	0.851
Htr3b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3B	-1.1829	0.070		-1.12141	0.485		-1.03157	0.848
Htr4	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4	1.19417	3.54E-02		-1.13365	0.245		-1.01135	0.914
Htr5a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A	-1.14547	3.54E-02		1.18894	0.147		1.03623	0.754
Htr5b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B	-1.36711	3.09E-03		1.01061	0.907		1.01021	0.911
Htr6	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6	-1.32053	3.33E-03		1.16877	0.315		1.16072	0.336
Htr7	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	-1.71903	1.03E-03		1.48968	0.271		1.15356	0.685
Recepteur de sérotonine									
Slc6a4	SERT ou Serotonin Transporter	5.57802	2.57E-09		-1.23491	3.12E-02		-1.24642	4.37E-02
Mécano récepteurs									
Piezo 1	piezo-type mechanosensitive ion channel component 1	1.62051	1.26E-04		1.09988	0.435		1.16056	0.204469
Piezo 2	piezo-type mechanosensitive ion channel component 2	-1.95417	4.99E-05		-1.87206	6.79E-04		-1.53613	6.32E-03

 Sur-exprimé, fold change >1,3
 Sous-exprimé, fold change <-1,3

(ii) RT-PCRq

En comparaison aux témoins E21, les marqueurs du SE sont globalement augmentés dans les deux segments proximal et distal. Ainsi, la somatostatine est significativement sur-exprimée dans le segment proximal ($p < 0,0001$) ainsi que la cholécystokinine ($p < 0,05$) et la sécrétine ($p < 0,005$). Dans le segment distal, il existe également une sur-expression mais qui reste inférieure au segment proximal. Ces résultats sont illustrés dans la Figure 37.

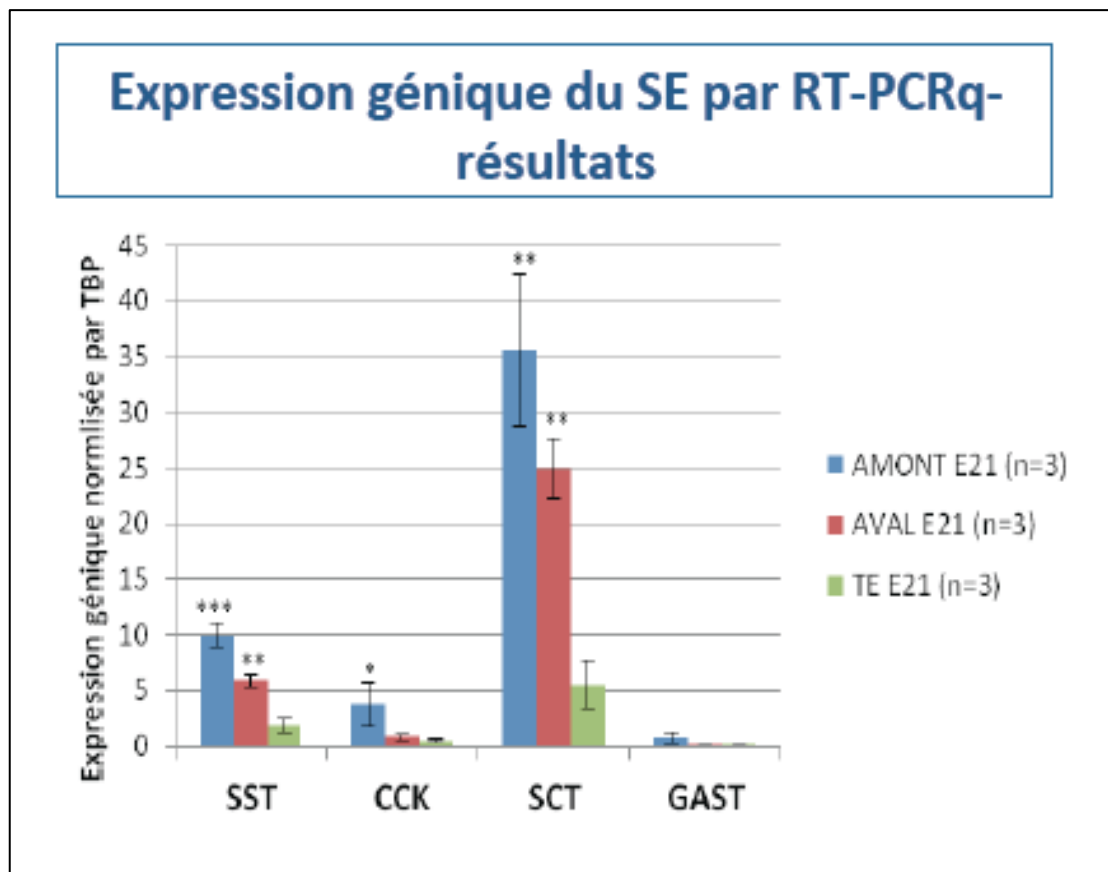


Figure 37 : Résultats d'expression génique des marqueurs du SE en RT-PCRq

b) Histopathologie

(i) Immunohistochimie

Le marqueur retenu a été la chromogranine A. Du point de vue cinétique, les cellules endocrines étaient présentes à E21. Il n'existait pas de marquage identifiable à E18. Elles apparaissent entre E18 et E21.

Dans le segment proximal, il existait une augmentation statistiquement significative du nombre de cellules endocrines en comparaison aux témoins ($p < 0,05$) et au segment d'aval ($p < 0,01$). Cette augmentation significative concernait exclusivement le segment proximal à distance de la ligature. Ces résultats sont illustrés dans la Figure 38.

De ces résultats morphologiques pour le SE, il ressort à nouveau que c'est le segment proximal qui présente le plus de différence avec l'intestin des témoins.

Immunohistochimie-résultats nombre de cellules neuroendocrines

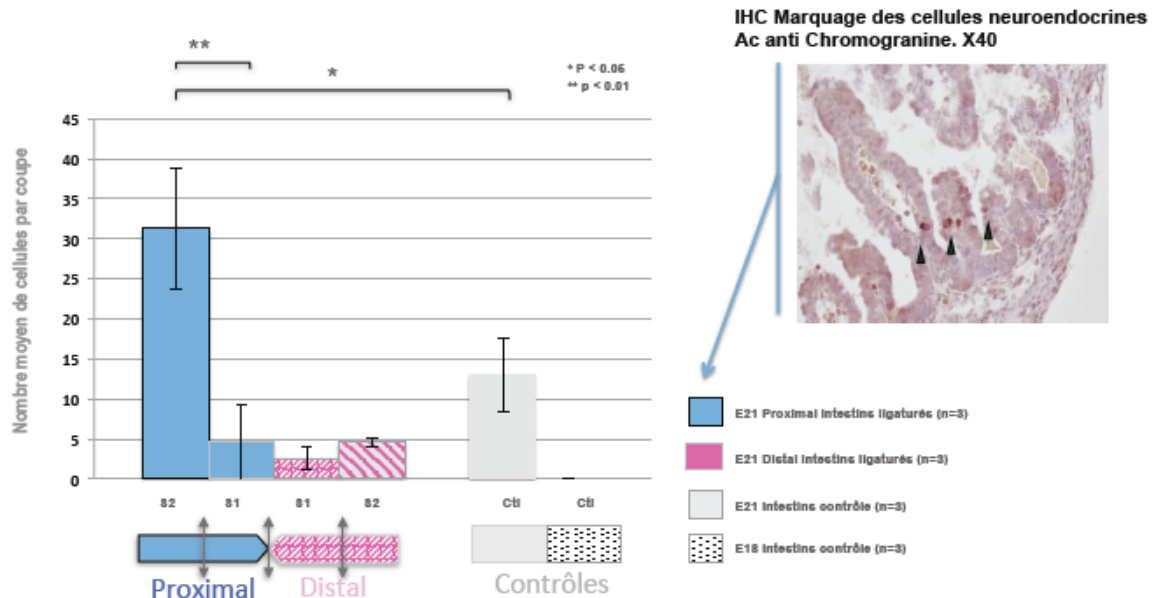


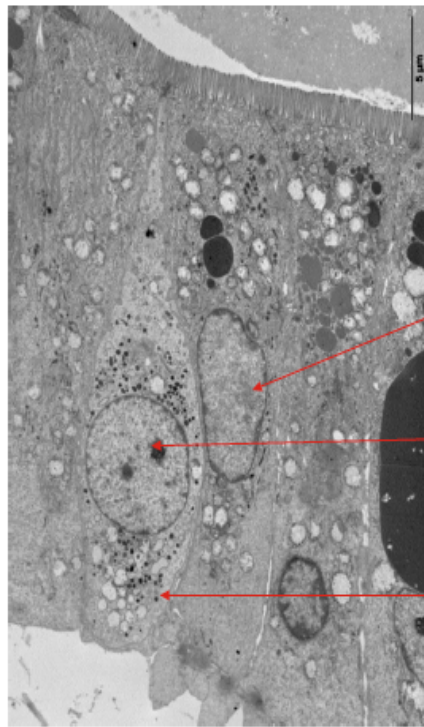
Figure 38 : Résultats d'expression génique des marqueurs du SE en RT-PCRq

Il existe une augmentation significative du nombre de cellules neuroendocrines dans le segment proximal, en particulier dans le segment le plus éloigné de l'atrésie

(ii) Microscopie électronique

Les cellules endocrines sont des cellules épithéliales peu abondantes et difficiles à mettre en évidence. Nous avons trouvé une seule cellule neuroendocrine au niveau d'un intestin témoin E21 (Figure 39). Cette cellule présente des granulations denses basales et un pôle apical fermé.

ME. les cellules neuroendocrines



Noyau d'un entérocyte

Noyau d'une cellule neuroendocrine

Granulations denses

Figure 39 : Résultats d'expression génique des marqueurs

Ultrastructure en microscopie électronique d'une cellule endocrine épithéliale Des granulations denses sont visibles au pôle basal et dans la région supra-nucléaire de la cellule

5) Etude de l'épithélium intestinal

a) Expression génique

(i) Les enzymes digestives

L'analyse transcriptomique des enzymes digestives sécrétées par les entérocytes est récapitulée dans le tableau 14. En ce qui concerne les différents stades du développement chez les témoins, l'expression génique de ces enzymes augmente de manière importante en fin de gestation. Chez les intestins ligaturés, aucune variation n'est significative en amont et en aval de l'atrésie mis à part pour l'entérokinase (TMPRSS15), enzyme digestive clé, qui montre des variations importantes. Les valeurs surlignées en gras ont été secondairement contrôlées en RT-PCRq.

Tableau 15: Expression génique des enzymes digestives par transcriptomique

Analyse transcriptomique ciblée sur l'épithélium						
Gènes	Cinétique témoins		Proximal		Distal	
TRANSCRIPTOME	E21 vs E15		AM vs TE		AV vs TE	
	Fold-Change	p-value	Fold-Change	p-value	Fold-Change	p-value
Tmprss15	5,03842	6,18E-02	2,98557	4,06E-01	-4,73574	2,48E-01
Lct	81,6316	7,54E-08	1,55149	2,75E-01	1,21098	6,23E-01
Mgam	24,1951	1,17E-05	-1,0449	6,31E-01	1,1023	3,00E-01
Si	3,5712	7,27E-03	-1,46115	3,89E-01	-1,41982	4,24E-01
Xpnpep1	2,23317	3,94E-04	1,24235	2,78E-01	1,00346	9,86E-01
Xpnpep2	24,5466	2,64E-08	-1,02396	9,25E-01	-1,3642	2,38E-01
Alpi	43,9133	1,80E-09	1,20294	2,09E-01	1,12033	4,25E-01

Abbréviations: Tmprss15 : entérokinase ; Lct : lactase ; Mgam : maltase-glucoamylase ; Si : Sucrase-isomaltase ; Xpnpep1 : X-prolyl aminopeptidase 1 ; Xpnpep2 : X-prolyl aminopeptidase 2 ; Alpi : alkaline phosphatase (intestinal)

■ Sur-exprimé, fold change >2
■ Sous-exprimé, fold change <-2

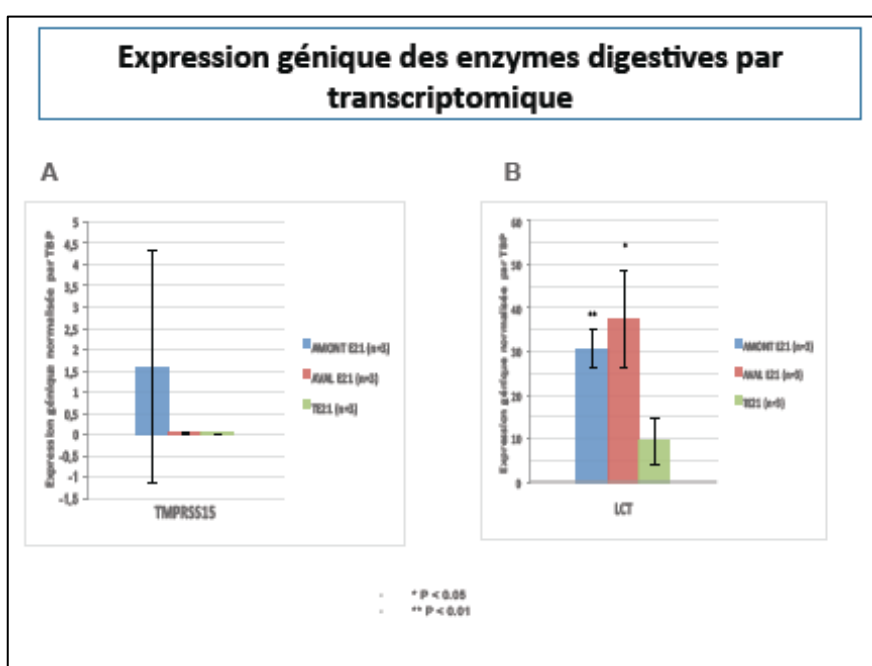


Figure 40: Résultats d'expression génique des enzymes digestives en RT-PCRq
Comparaison de l'expression génique pour l'entérokinase (TMPRSS15) (A) et la lactase (LCT) (B) dans les segments d'amont, d'aval et chez les témoins.

Les variations d'expression génique ont ainsi été contrôlées par PCR quantitative pour l'entérokinase (Figure 40A), mais également pour la lactase (Figure 40B). L'expression de l'entérokinase (TMPRSS15) est très faible dans les trois groupes, mais elle est supérieure dans le segment d'amont ($p < 0,05$), confirmant ainsi les résultats du transcriptome. Il existe

une grande variation de l'expression (écarts-types importants), du fait de cette faible expression. Pour la lactase, on note une surexpression significative dans les deux portions de l'atrésie confirmant les résultats de la transcriptomique bien que non significative pour l'étude transcriptomique.

(ii) Les constituants de la barrière intestinale

La première ligne de défense de l'intestin comporte une couche de mucus composée du facteur trefoil 3 (TFF3) et de mucines sécrétées essentiellement par les cellules caliciformes. Les résultats de l'analyse transcriptomique de ces marqueurs sont récapitulés dans le tableau 15. L'expression génique des mucines sécrétées augmente en amont mais pas en aval. Concernant les témoins, seule la mucine 2 augmente au cours du développement. Les mucines transmembranaires varient différemment au cours du développement : certaines augmentent (mucines 3, 13, 1), et d'autres diminuent (4, 16). Le TFF augmente également au cours du développement. Concernant les intestins avec ligature, toutes augmentent en amont comme en aval sauf la mucine 16 qui diminue de manière significative. Le facteur TFF3 augmente significativement en amont et en aval.

Tableau 16: Expression génique des constituants de la barrière

Analyse transcriptomique ciblée sur la barrière digestive						
Gènes	Cinétique témoins		Proximal		Distal	
TRANSCRIPTOME	E21 vs E15		AM vs TE		AV vs TE	
	Fold-Change	p-value	Fold-Change	p-value	Fold-Change	p-value
MUCINES SÉCRÉTÉES						
Muc2	73,7308	8,06E-11	1,23249	1,74E-01	1,18323	2,65E-01
Muc6	-1,15828	9,71E-03	1,69317	1,60E-02	-1,12875	5,04E-01
Muc5b	1,0718	7,17E-01	6,91135	9,40E-03	1,26351	6,92E-01
MUCINES TRANSMEMBRANAIRES						
Muc3	42,554	6,44E-13	1,27174	8,20E-03	1,30934	4,46E-03
Muc13	25,2818	3,33E-06	1,19171	6,95E-02	1,17074	9,65E-02
Muc1	1,3622	1,38E-01	1,43332	7,25E-02	1,7068	1,53E-02
Muc16	-4,845	3,20E-05	-2,06834	3,28E-02	1,34393	3,25E-01
Muc4	-1,3705	8,61E-02	1,93947	5,28E-03	1,1132	5,56E-01
FACTEUR TREFOIL						
Tff3	17,3174	1,08E-10	1,6496	3,33E-03	1,3789	2,94E-02
Abréviations: Muc : mucine ; Tff3 : facteur Trefoil 3 Sur-exprimé, fold change >2 Sous-exprimé, fold change <-2 Sous-exprimé, fold change <-1.2						

L'expression de 3 marqueurs a été étudiée par PCRq : Muc16, Muc5b et Tff3 (Figure 41) et ces résultats confirment la transcriptomique. La mucine 5b est bien surexprimée en amont de l'atrésie alors que l'expression de la mucine 16 est diminuée. En aval, ces deux marqueurs présentent une augmentation de l'expression par rapport aux témoins. Quant à

l'expression du TFF3, elle est significativement très forte dans les deux segments de l'atrésie, en comparaison avec les témoins, mais l'augmentation n'est pas significative entre les portions de l'atrésie.

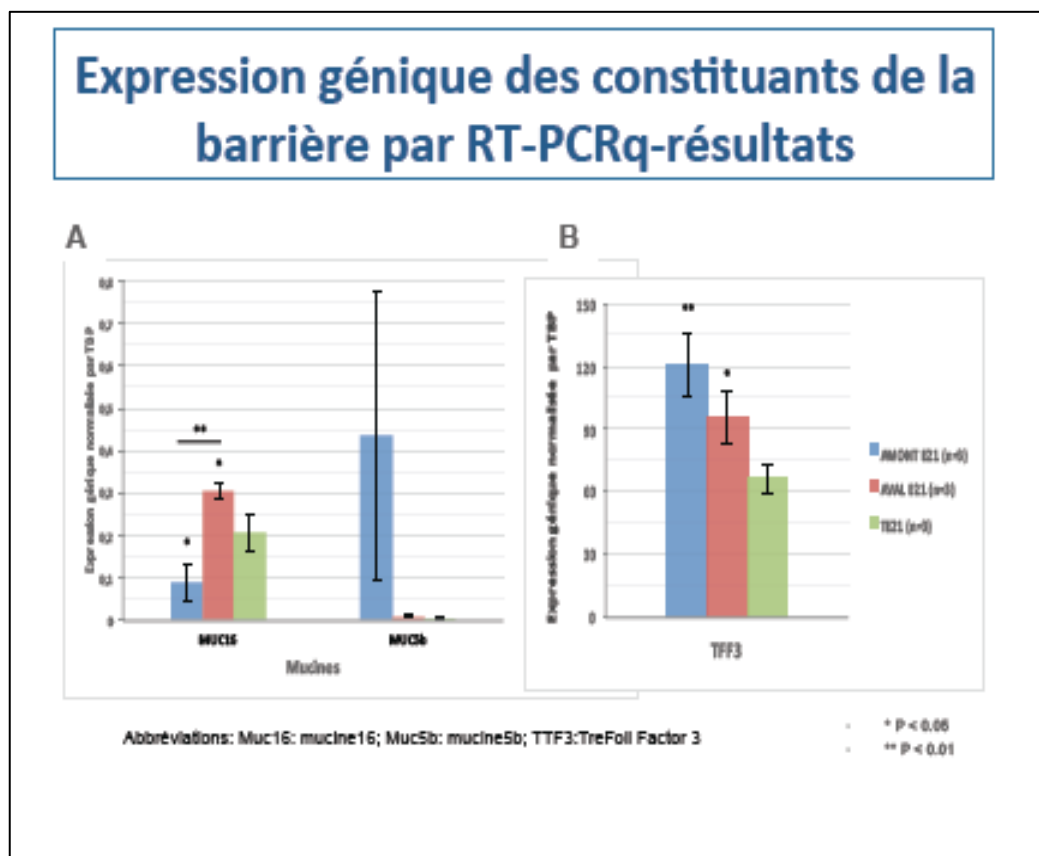


Figure 41 : Résultats par RT-PCRq des constituants de la barrière
Comparaison de l'expression génique des mucines (A) et du Facteur Trefoil 3 (B) dans les segments d'amont, d'aval et chez les témoins.

(iii) Les agents antimicrobiens

Les résultats par transcriptomique de l'expression génique des agents antimicrobiens sont récapitulés dans les tableaux 16 et 17. L'analyse transcriptomique et l'analyse par RT-PCRq mettent en évidence des variations identiques concernant l'expression du lysozyme 2 (LYZ2) (Figure 42A) et du récepteur « Toll-like » 8 (TLR8) (Figure 42C). Chez les témoins, elles sont surexprimées à la fin du développement embryonnaire de manière significative et elles le sont de manière significative dans les deux segments de l'atrésie, en comparaison avec les témoins. Leur expression est augmentée dans le segment proximal en comparaison au distal, de façon significative pour LYZ2 et non significative pour TLR8.

Tableau 17: Expression génique des agents antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth

Analyse transcriptomique ciblée sur les agents antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth						
Gènes	Cinétique témoins		Proximal		Distal	
TRANSCRIPTOME	E21 vs E15		AM vs TE		AV vs TE	
	Fold-Change	p-value	Fold-Change	p-value	Fold-Change	p-value
Lyz2	5,33944	1,81E-05	2,2289	2,58E-03	2,30984	2,00E-03
Defa5	1,08674	3,31E-01	1,31354	3,68E-02	1,07744	5,13E-01
Defa6	-1,1121	5,18E-01	2,19259	6,58E-02	2,07859	8,24E-02
Defa8	3,2468	2,94E-02	1,81173	3,69E-01	2,50154	1,80E-01
Defa9	1,29175	3,13E-01	1,75531	1,58E-01	1,76038	1,56E-01
Defa10	-1,36964	1,45E-01	1,41223	4,14E-02	1,0673	6,59E-01

Abbreviations: Lyz2 : lysozyme 2 ; Defa : défensine

Sur-exprimé, fold change >1.2
Sur-exprimé, fold change >2
Sous-exprimé, fold change <-2
Sous-exprimé, fold change <-1.2

Tableau 18: Expression génique des agents antimicrobiens sécrétés par les cellules M

Analyse transcriptomique ciblée sur les agents antimicrobiens sécrétés par les cellules M						
Gènes	Cinétique témoins		Proximal		Distal	
TRANSCRIPTOME	E21 vs E15		AM vs TE		AV vs TE	
	Fold-Change	p-value	Fold-Change	p-value	Fold-Change	p-value
Tlr1	2,50266	1,07E-04	1,88139	5,43E-03	1,50191	4,12E-02
Tlr3	2,29603	7,58E-04	-1,07519	6,29E-01	-1,00591	9,68E-01
Tlr5	3,15406	1,10E-02	-1,59888	3,62E-01	1,28236	6,22E-01
Tlr7	1,77122	6,70E-04	1,5264	3,13E-02	1,41271	6,59E-02
Tlr8	2,46724	6,30E-06	1,6842	9,93E-04	1,54864	2,86E-03
Tlr11	2,37027	4,30E-03	1,21472	4,94E-01	-1,1068	7,18E-01
Tlr13	1,40406	2,71E-02	1,12117	3,95E-01	1,12545	3,80E-01

Abbreviations: Tlr: Toll Like Receptor

Sur-exprimé, fold change >1.2
Sur-exprimé, fold change >2
Sous-exprimé, fold change <-1.2

Les résultats de la RT-PCRq concernant les défensines (Figure 42B) ne confirment pas l'augmentation mise en évidence par transcriptomique dans les deux segments de l'atrésie. Cependant ces résultats sont probablement peu interprétables étant donné qu'il a été difficile de « designer » un couple d'amorces spécifique de chacune de défensines, un seul

couple d'amorces a donc été conçu pour l'ensemble des défensines à partir des régions homologues.

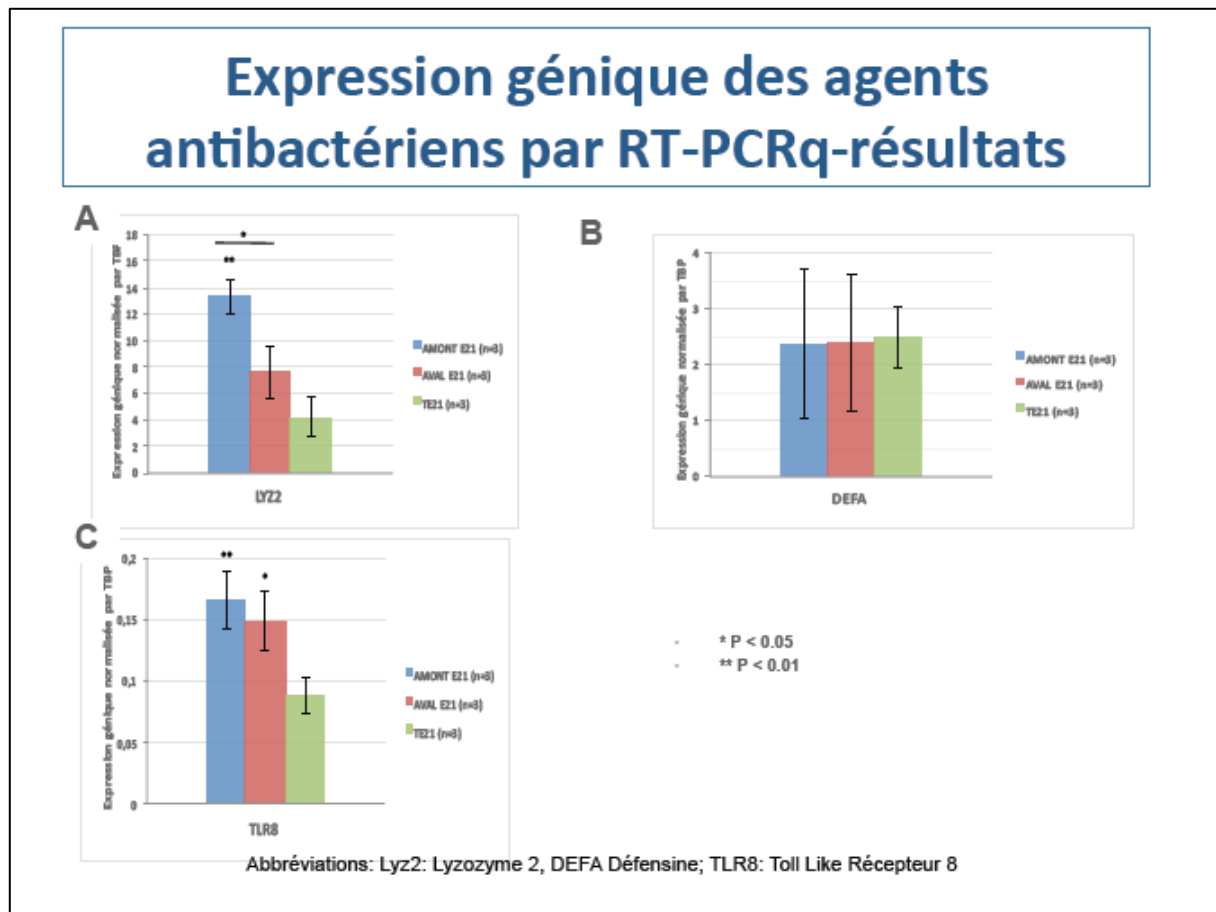


Figure 42: Résultats par RT-PCRq des agents antibactériens
 Comparaison de l'expression génique du lysozyme 2 (A), de la défensine A (B) et du Toll Like Receptor 8 (C) dans les segments d'amont, d'aval et chez les témoins.

b) Histopathologie

Les cellules caliciformes sont des cellules glandulaires qui sécrètent du mucus formant un film protecteur à la surface de l'épithélium. La numération des cellules caliciformes marquées par le PAS montre que les intestins des témoins E18 en sont dépourvus. Le nombre de cellules caliciformes augmente de manière significative en amont de l'atrésie alors qu'il est légèrement diminué (non significatif) en aval de l'atrésie en comparaison aux témoins E21 (*Figure 43*).

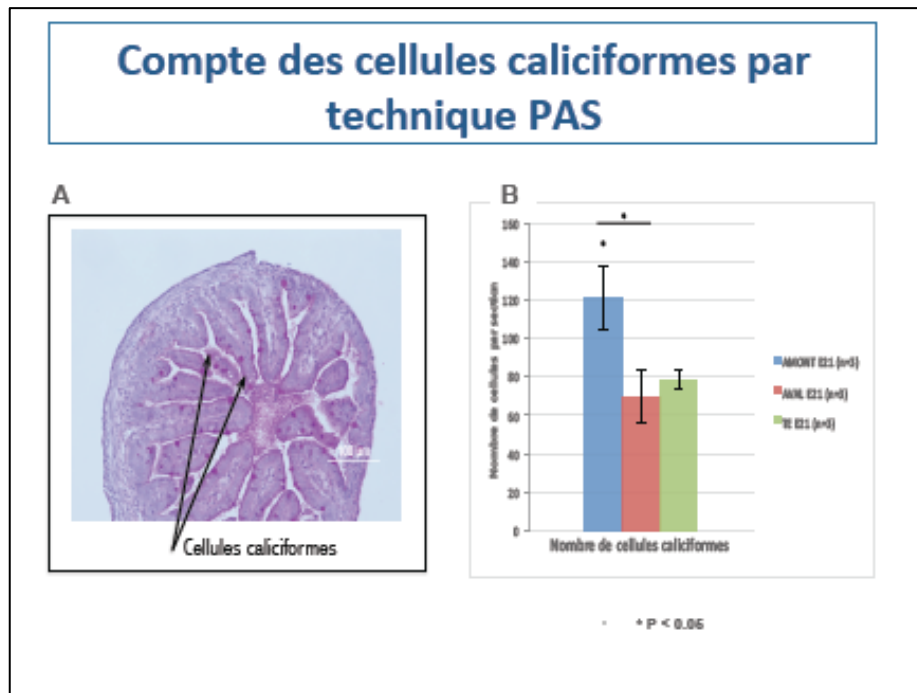


Figure 43 : Numération des cellules caliciformes par coloration PAS

Identification des cellules caliciformes par la réaction à l'acide périodique, réactif de Schiff (PAS) par un mécanisme d'oxydation des polysaccharides contenus dans ces cellules. Exemple avec une image de coloration d'intestin d'amont (A) Nombre de cellules caliciformes par section pour les segments d'amont, aval et les témoins E21.

c) Microscopie électronique

(i) Les entérocytes

Les entérocytes sont les cellules absorbantes de l'intestin. Ils présentent des replis membranaires apicaux formant les microvillosités. Ces microvillosités semblent apparaître tardivement au cours du développement des fœtus de rat. En effet, au niveau des intestins témoins à E18, nous observons quelques microvillosités éparses, courtes et de hauteur variable (0,1 à 0,5 μm) à la surface des entérocytes (*Figure 44*). Les systèmes de jonction entre les entérocytes semblent déjà être en place à ce stade, ainsi que les mitochondries (*Figure 44*).

ME. Cellules épithéliales-entérocytes

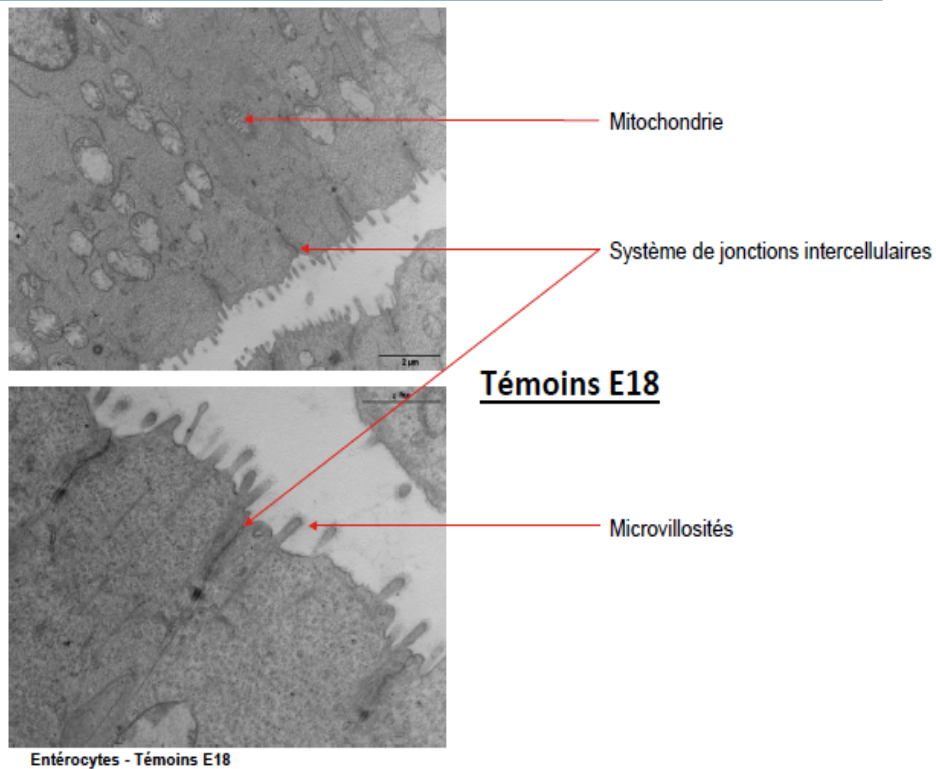


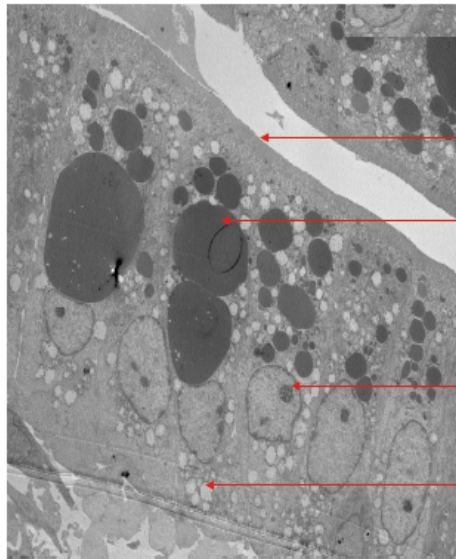
Figure 44: Microscopie électronique sur des entérocytes à E18

Ultrastructure en microscopie électronique des entérocytes à E18. Mise en évidence de microvillosités plutôt éparpillées avec des systèmes de jonction et des mitochondries

Pour les fœtus témoins prélevés à E21, les entérocytes ont un aspect prismatique. Le noyau est situé au tiers basal et leur cytoplasme comporte des mitochondries et de nombreuses vacuoles d'absorption denses aux électrons et de taille variable (*Figure 45*). Ces dernières sont absentes à E18 (*Figure 44*). Le pôle apical est pourvu de nombreuses microvillosités de hauteur identique (environ 2 μm) formant le plateau strié caractéristique des entérocytes (*Figure 46*). Les systèmes de jonction sont également présents (*Figure 46*).

ME. Cellules épithéliales-entérocytes

Témoins E21



Microvillosités – Plateau strié

Vacuoles d'absorption

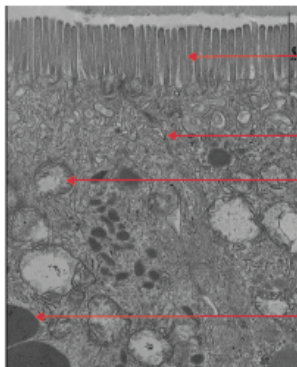
Noyau

Mitochondrie

Entérocytes - Témoins E21

Figure 45: Microscopie électronique sur des entérocytes à E21
Mise en évidence de nombreuses microvillosités et de vacuoles denses

ME. Cellules épithéliales-entérocytes



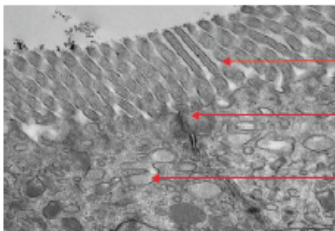
Microvillosités – Plateau strié

Membranes plasmiques intercellulaires

Mitochondrie

Vacuoles d'absorption

Témoins E21



Microvillosités – Plateau strié

Système de jonction intercellulaire

Vésicules

Entérocytes - Témoins E21

Figure 46: Microscopie électronique sur des entérocytes à E21
Grossissement sur les microvillosités de taille homogène et sur les vacuoles denses

Pour les intestins ligaturés à E18 *in utero* et prélevés à E21, nous avons observé les segments d'amont et d'aval afin de les comparer aux intestins témoins E21. Concernant le segment d'amont (Figure 47), le cytoplasme des entérocytes comporte des mitochondries et quelques vacuoles d'absorption, moins nombreuses et de taille réduite en comparaison aux témoins. Les microvillosités sont nombreuses au niveau du pôle apical et forment un plateau strié, cependant leur hauteur est diminuée de moitié (environ 1 μm) par rapport aux intestins témoins à E21.

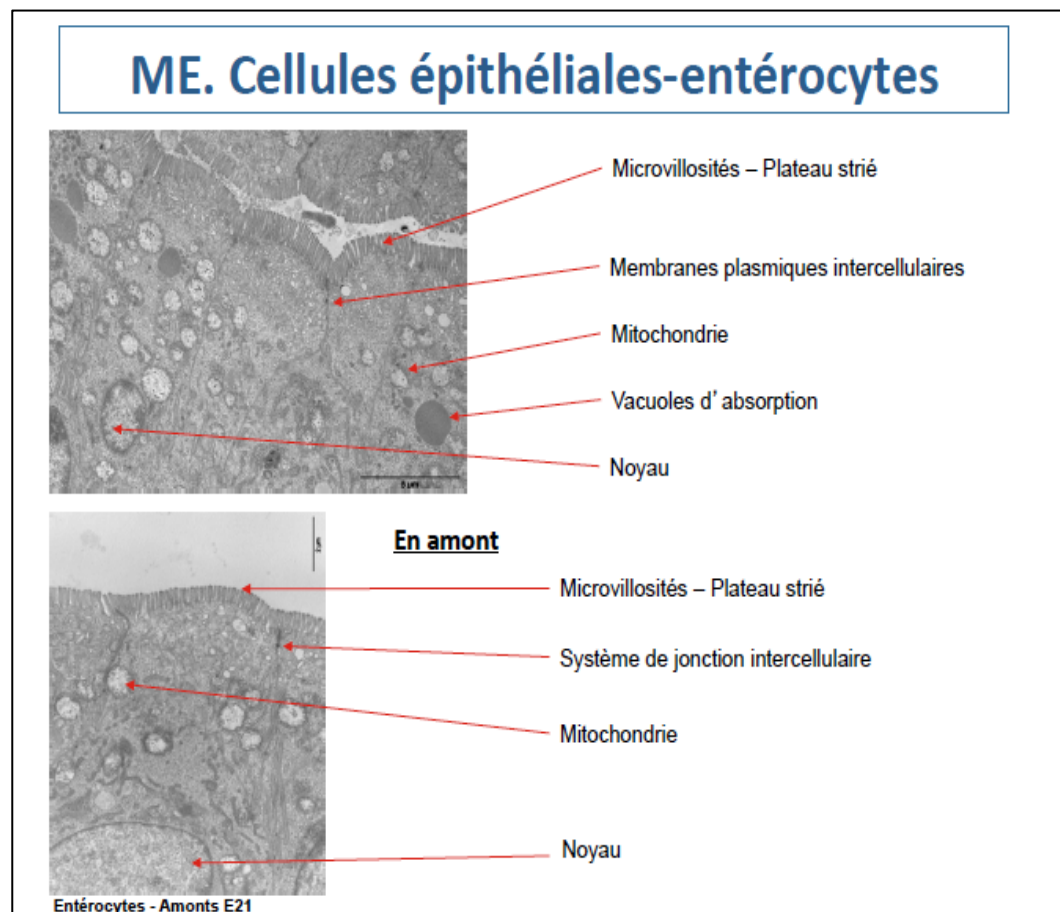


Figure 47: Ultrastructure en microscopie électronique des entérocytes en amont
En comparaison aux témoins, les microvillosités de taille diminuée

Le segment d'aval (Figure 48) présente deux types d'entérocyte : (1) des entérocytes à cytoplasme sombre riche en mitochondries et comportant un noyau ovoïde situé au tiers basal et (2) des entérocytes à cytoplasme clair moins riche en mitochondries et comportant un noyau basal de plus grande taille que celui des entérocytes à cytoplasme sombre. Ces deux types d'entérocytes sont dépourvus des vacuoles d'absorption mais présentent des microvillosités de hauteur réduite (environ 1 μm) formant un plateau strié. Les entérocytes clairs semblent plus immatures que les entérocytes sombres.

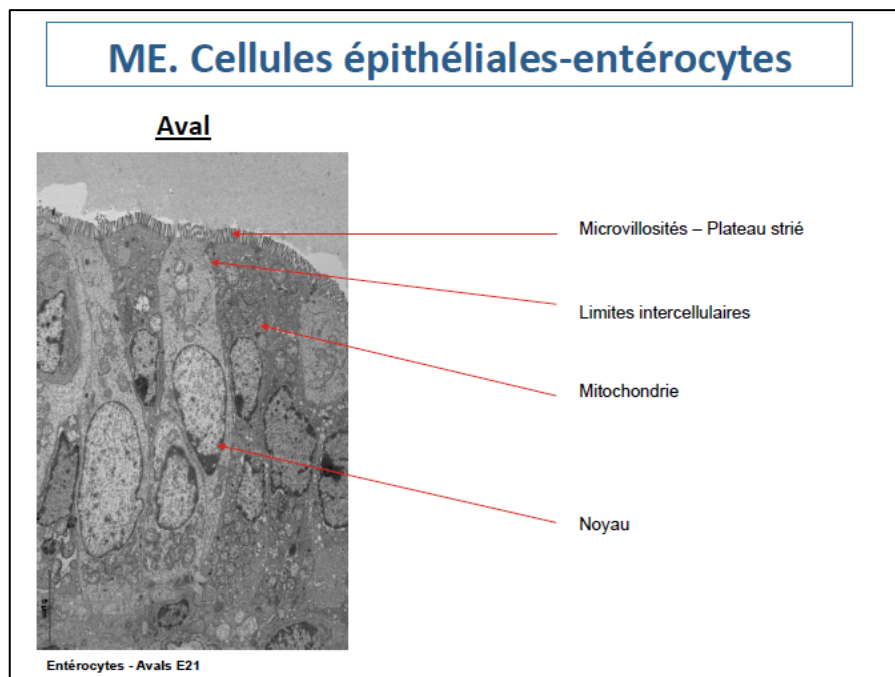


Figure 48: Ultrastructure en microscopie électronique des entérocytes en aval
Mise en évidence de deux types d'entérocytes évoquant deux degrés de maturation

(ii) Les cellules caliciformes

L'épithélium intestinal des témoins E21, des segments d'amont et d'aval comportent des cellules caliciformes qui présentent des caractéristiques ultrastructurales similaires (*Figure 49*). Ces cellules semblent plus abondantes dans le segment d'amont. Ces résultats ont confirmé la numération des cellules caliciformes sur des sections d'intestins témoins E21, d'amont et d'aval colorées par le PAS (*voir plus haut*).

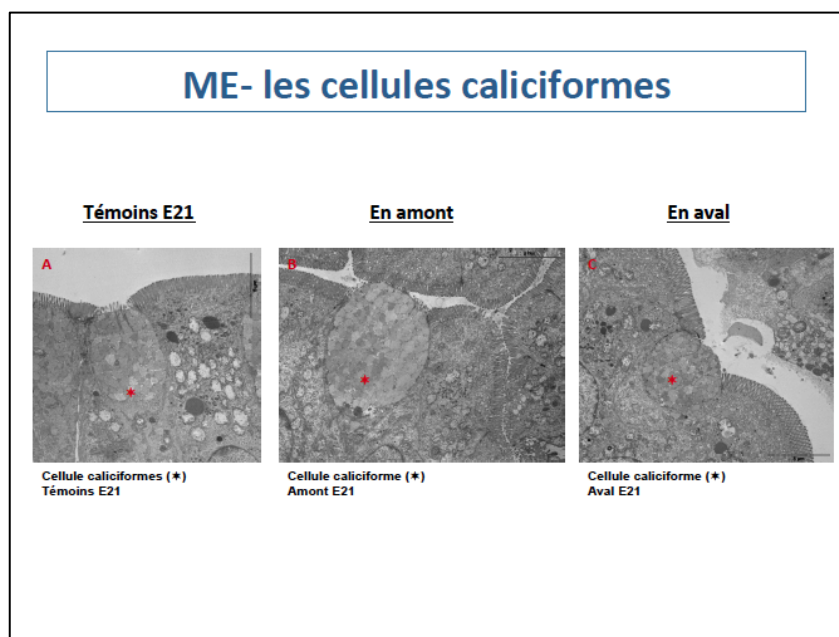


Figure 49: Ultrastructure en microscopie électronique sur des cellules caliciformes
Mise en évidence des cellules caliciformes d'ultrastructure similaire chez les témoins E21 et ligaturés

6) Etude ultrastructurale de la couche musculaire

La musculature est formée de deux couches de cellules musculaires lisses à disposition circulaire dans la couche interne et à disposition longitudinale dans la couche externe. Au niveau des intestins témoin E21, la musculature comporte 4 à 5 assises de cellules musculaires à disposition circulaire formant la couche interne et une seule assise de cellules musculaires à disposition longitudinale constituant la couche externe (*Figure 50A*).

Pour le segment d'amont (*Figure 50B*), la musculature comporte 3 assises de cellules musculaires lisses circulaires formant la couche interne et 2 assises cellulaires longitudinales pour la couche externe. Le diamètre des cellules de la longitudinale externe semble plus important qu'au niveau des témoins E21.

Pour le segment d'aval (*Figure 50C*), la musculature est uniquement constituée de cellules musculaires circulaires. Elle est dépourvue de couche longitudinale.

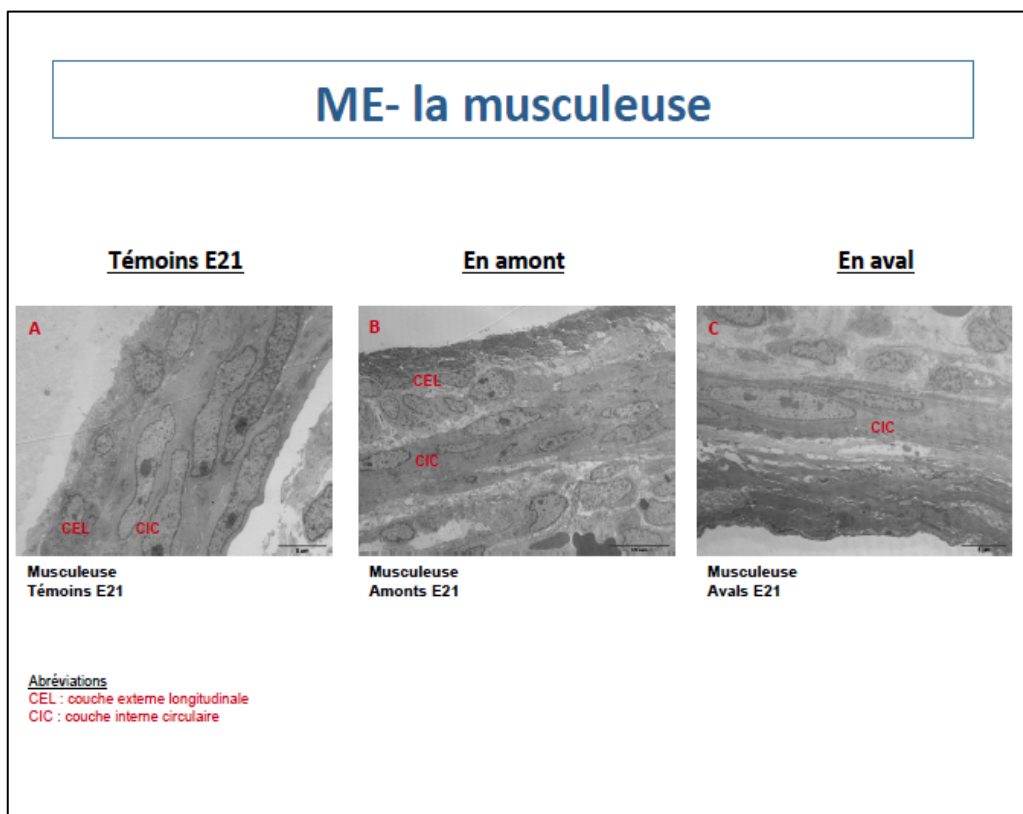


Figure 50: Ultrastructure en microscopie électronique de la musculature
Diminution des assises musculaires en amont, avec augmentation du diamètre des myocytes, diminution des assises cellulaires en aval.

7) Etude de facteurs de maturation intestinale

Des modifications d'expression génique concernant les facteurs trophiques et leurs récepteurs comme exposés dans le chapitre de l'introduction ont été recherchés. Les principaux résultats sont rapportés dans le tableau 18. L'ensemble de ces facteurs connaît globalement une cinétique d'expression génique décroissante entre E15 et E21. Il n'existait pas de différence statistiquement significative entre amont et aval à l'exception du G-CSF qui est augmenté dans le segment d'amont et d'aval.

Tableau 19: Expression génique des marqueurs de maturation intestinale

Analyse transcriptomique ciblée sur les facteurs de croissance intestinale									
Gènes		Cinétique témoins				Proximal		Distal	
FACTEURS DE CROISSANCE		FOLD CHANGES				p VALUE		AMONT VS.	
ABBREVIATION NOM		ED15-ED17	ED17-ED19	ED19-ED21	ED15-ED21	ED15-ED21	TE	p VALUE	TE
ERYTHROPOIETINE									
Epo	erythropoietin	-1.128	-1.06315	-1.07829	-1.29312	2.18E-007	1.05666	0.156	-1.08249
Epor	erythropoietin receptor	1.01539	-1.09922	-1.04434	-1.13056	0.152	1.10363	0.108	-1.01101
ACIDE RETINOIQUE									
Rai1	retinoic acid induced 1	-1.08331	-1.31377	-1.3419	-1.90981	1.3E-005	1.18428	0.625	1.16197
Rai14	retinoic acid induced 14	-1.65684	-1.48031	-1.05074	-2.57709	1.2E-008	1.28581	0.220	-1.05033
Rai2	retinoic acid induced 2	1.2318	-1.52943	-1.21455	-1.508	2.2E-003	-1.40241	0.164	-1.02885
Rxra	retinoid X receptor alpha	1.0887	1.18231	-1.02459	1.25629	8.1E-003	1.09345	0.734	1.12591
Rxrb	retinoid X receptor beta	1.03708	-1.00536	-1.05333	-1.02112	0.670	1.23747	0.630	1.00557
Rxrg	retinoid X receptor gamma	-1.52044	-1.39282	-1.02413	-2.1688	4.97E-005	1.1359	0.688	1.06153
Rara	retinoic acid receptor, alpha	-1.3022	-1.21374	-1.02911	-1.62655	4.59E-006	1.09087	0.091	1.10101
Rarb	retinoic acid receptor, beta	-1.72108	-1.96561	-1.12459	-3.80443	2.18E-007	-1.02708	0.881	1.01744
Rarg	retinoic acid receptor, gamma	-1.22592	1.0137	-1.00215	-1.21194	0.152824	1.31578	0.578	1.2019
AUTRES FACTEURS									
Igf1	insulin-like growth factor 1	-1.44976	-1.58317	-1.41884	-3.25654	1.2E-004	1.47593	0.115	1.16637
Igf1r	insulin-like growth factor 1 receptor	-1.2823	-1.63369	-1.09096	-2.28543	1.8E-005	1.07105	0.540	1.12282
Igf2	insulin-like growth factor 2	-1.04299	1.14829	-1.74317	-1.58333	1.2E-004	-1.1394	0.389	1.02622
Igf2r	insulin-like growth factor 2 receptor	-1.14445	1.04885	-1.0395	-1.13425	0.117	-1.138	0.157	1.07434
Egf	epidermal growth factor	-1.17839	-1.09644	-1.0292	-1.32977	2.1E-002	1.0722	0.173	1.05187
Egfr	epidermal growth factor receptor	-1.37569	-1.26604	1.19431	-1.45832	8.66E-005	1.18427	0.184	1.12154
Csf3	granulocyte-colony stimulating factor 3	-1.08595	1.01168	-1.13826	-1.22183	6.3E-003	3.18962	0.043	1.61265
Csf3r	granulocyte-colony stimulating factor 3 receptor	-1.01352	1.0756	-1.15616	-1.08943	0.25	2.30442	0.004	1.77467

Sur-exprimé, fold change >1.2
 Sur-exprimé, fold change >2
 Sous-exprimé, fold change <-2
 Sous-exprimé, fold change <-1.2

8) Résultats préliminaires chez des nouveau-nés humains

Afin de confirmer les données retrouvées sur les cellules neuroendocrines, une étude pilote a été réalisée sur deux cas humains. Il s'agit de nouveau-nés pris en charge pour

atrésie intestinale dans notre structure et pour lesquels la zone atrétique avait été envoyée et conservée au laboratoire d'anatomopathologie. Les intestins témoins utilisés provenaient de 3 fœtus à terme, décédés à la naissance suite à une strangulation par le cordon ombilical. Il a été investigué successivement la morphométrie, l'étude du SNE et du SE avec des techniques et des marqueurs identiques à ceux décrits pour le rat.

a) Etude du SNE

Ces résultats confirment les données connues sur l'aspect morphologique déjà bien décrit dans le chapitre précédent chez le rat : augmentation du diamètre externe et de la couche musculaire sur le segment proximal. En ce qui concerne le SNE, il est également constaté un nombre de ganglions plus important dans le segment proximal. Le caractère original de ces résultats est la différence de morphologie des ganglions : ils apparaissent de forme plutôt arrondie dans le segment proximal et de forme plutôt allongée dans le segment distal. Ces résultats sont représentés dans la figure 51.

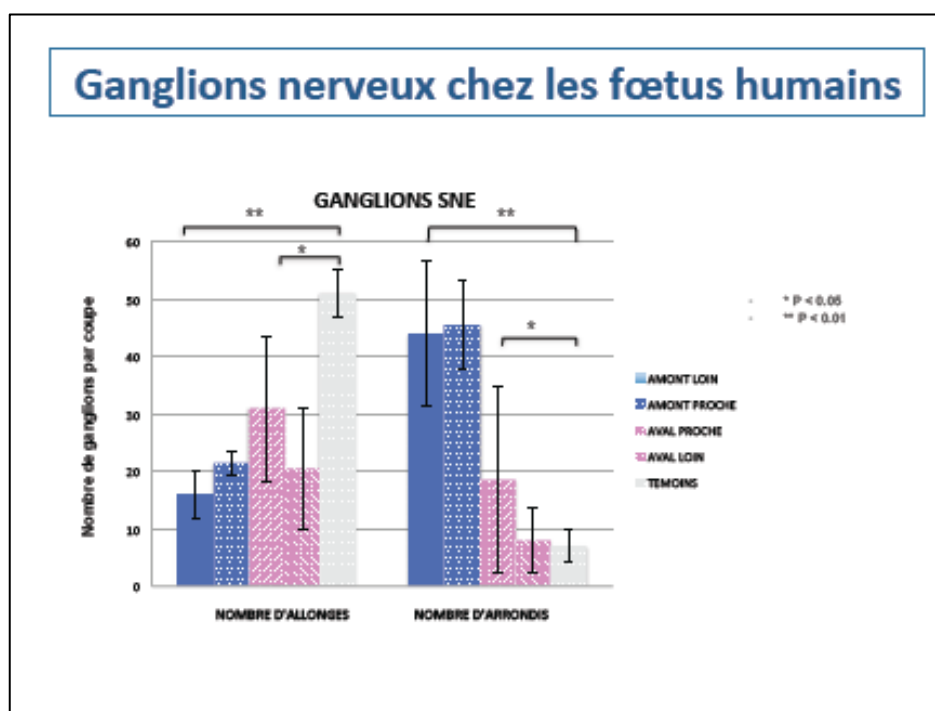


Figure 51 : Etude des ganglions nerveux entériques chez l'atrésie humaine.

Le nombre de ganglions allongés semble plus important dans le segment distal et celui des ganglions arrondis dans le segment proximal.

b) Etude du système endocrine

Il est également constaté un nombre de cellules endocrines plus important dans le segment proximal. Comme sur le modèle du rat, ce nombre de cellules est supérieur sur le segment proximal à distance de l'atrésie, en comparaison au segment distal, où le nombre

de cellules est également supérieur à celui des intestins contrôles. Ces résultats sont représentés dans la figure 52.

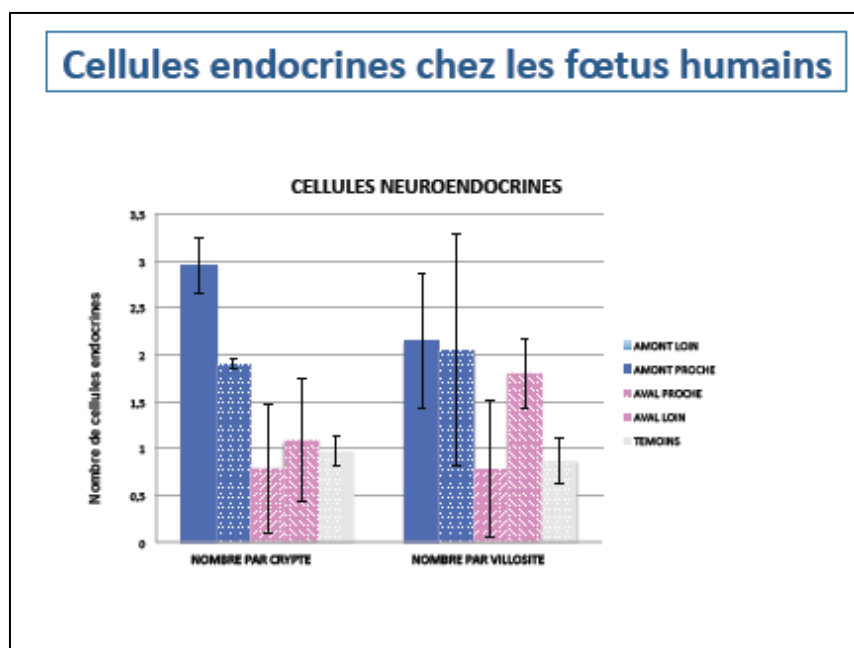


Figure 52 : Etude des cellules endocrines chez l'atrésie humaine.
Le nombre de cellules endocrines par crypte ou villosité est plus important dans le segment proximal.

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION ET

PERSPECTIVES

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce chapitre est divisé en trois grandes parties. Dans la première partie, nous discuterons l'évolution globale et cinétique de l'expression génique de l'intestin en fin de gestation. Puis, les différences globales entre intestins d'amont et d'aval seront abordées, permettant de définir l'impact de l'occlusion anténatale et les caractères pathologiques de chacun des deux segments. Enfin, le comportement de chaque type cellulaire sera envisagé sous ses différents aspects avec pour objectif de dégager leurs tendances et d'éventuelles pistes thérapeutiques.

A. Maturation de l'intestin fœtal entre E15 et E21

Par l'approche transcriptomique, il a pu être étudié le profil global de maturation de l'intestin grêle. Il s'agit, à notre connaissance, d'un travail original qui n'a pas encore été publié. Cette étude nous a permis d'observer une augmentation de l'expression génique en fin de gestation, particulièrement accélérée après E17 pour les marqueurs épithéliaux alors que nous constatons une diminution pour ceux du système nerveux entérique. Cette cinétique semble tout à fait logique et illustre la préparation de l'intestin à sa fonction de digestion comme c'est le cas, dès la naissance des mammifères, afin d'assurer lors de cette transition rapide leur indépendance énergétique. Tous ces résultats mettent en lumière les changements qui découlent de l'interruption de la continuité par ligature à E18. La date de cette ligature apparaît ainsi tardive si l'on considère que l'on se situe après le dernier cinquième de la gestation dans le modèle murin.

B. Conséquences globales de l'atrésie sur les intestins d'amont et d'aval

Les résultats de la morphométrie confirment l'ensemble de ceux déjà publiés dans la littérature [83, 84, 89]. Le segment d'amont se dilate sous la pression du liquide amniotique dégluti. Il mesure ainsi 2 à 3 fois le diamètre de l'intestin témoin. Ses différentes couches sont d'épaisseur comparables à l'intestin témoins à l'exception de la couche musculaire. D'après les études fonctionnelles [83], cette hypertrophie musculaire est associée à une hypercontractilité. Le segment d'aval dépourvu de flux amniotique est lui de diamètre plus petit et son profil en morphométrie est très proche du segment témoins. Le débat qui attribue l'aspect le plus pathologique soit à l'amont [92, 94] soit à l'aval [79, 84] est encore d'actualité. Comme semblent le prouver les tableaux 1 et 2 présentés en annexe, une

tendance se dégage plutôt en faveur d'un segment d'amont comme étant le plus éloigné du segment contrôle. Des auteurs ont même rapporté des profils très similaires entre le segment contrôle et le segment d'aval [4, 77, 78, 80-82, 88, 90, 91, 93, 94, 106].

Selon nos résultats de transcriptomique globale, le segment proximal semble bien plus affecté par la ligature que le segment d'aval étant donné le nombre significativement plus élevé d'expression génique différentielle dans le segment d'amont. Si l'on considère conjointement l'étude différentielle et l'étude cinétique, une tendance se dégage : l'absence de modification pour le segment distal et surtout une hyperdifférenciation pour le segment proximal. En effet, dans le segment proximal, les augmentations d'expression génique observées chez le témoin sont d'autant plus majorées, alors que les diminutions sont d'autant plus minorées par rapport aux témoins et à la cinétique de développement. La combinaison de ces deux phénomènes nous laisse penser que le segment d'amont présente une accélération de maturation. Ainsi, dans le segment d'amont, le profil d'expression génique serait également en faveur d'une accélération de la maturation en comparaison aux témoins, comme cela a pu être avancé une fois [79].

Cette notion trouverait son fondement dans la théorie du stress mécanique induit par la pression liquide amniotique. Selon la mécanotransduction [107], tout stress mécanique dans le développement embryonnaire induit une prolifération cellulaire et une différenciation tissulaire. Le segment d'aval dépourvu de cet excès de pression ne présente pas d'accélération de maturation.

C. Conséquences tissulaires de l'obstruction intestinale

Trois principales composantes sont abordées ici : le système nerveux entérique en tant que chef d'orchestre, la muqueuse avec sa fonction de protection, de digestion, et de défense (épithélium) puis le lien entre les deux, le système neuroendocrine.

1) Le système nerveux entérique

Le système nerveux a été la composante la plus étudiée dans les travaux de l'atrésie intestinale. Nos travaux confirment globalement les travaux déjà publiés tout en les replaçant dans leur contexte tissulaire intestinal global.

Il s'agit ici de la première étude contextualisant le SNE de l'intestin atrétique dans son développement gestationnel. Il a été noté avec surprise une sous régulation des gènes codant pour les facteurs pan neuronaux entre E15 et E21, alors que l'expression de la plupart des autres gènes augmentait, comme par exemple celle des cellules neuroendocrines. Comme pour l'analyse globale, l'effet de la ligature sur le SNE était plus important sur le segment d'amont, l'effet était quasi nul sur le segment d'aval. Ces résultats inattendus sont confirmés par l'immunohistochimie où les ganglions nerveux du segment

proximal ont un aspect plus arrondi et plus dense que chez les témoins E21, témoignant d'un profil mature. L'aspect de ces ganglions en distal est au contraire plus proche des témoins E18, soit un aspect étiré et moins dense, témoins d'un retard de maturation.

Des études récentes rapportent ainsi l'implication du SNE dans le segment proximal pour expliquer les troubles de la motilité intestinale [81]. Tout ceci est encore débattu mais notre approche utilisant plusieurs techniques qui se sont corroborées les unes aux autres, permettent de penser que ces résultats ont une solidité acceptable et apportent donc des éléments nouveaux à la littérature.

2) Le système neuroendocrine

Les cellules du système neuroendocrine (CSE) sont organisées telles des cellules isolées dans la muqueuse digestive. Elles ne représentent que 1% des cellules de cette muqueuse [108] mais l'ensemble constitue le plus gros appareil sécréteur endocrinien de l'organisme [9, 109]. Elles ont longtemps été considérées comme des dérivés des crêtes neurales car ces cellules expriment des hormones et des régulateurs transcriptionnels qui étaient communément associés aux crêtes neurales [110]. Actuellement leur origine endodermique n'est plus débattue [8, 111]. Il existe 10 sous types de CSE qui se différencient à partir des précurseurs situés dans les cryptes intestinales [112]. Les cellules de la souris et du poulet sont très proches de celles de l'homme. Chez le poulet, elles apparaissent dès le 10^{ème} jour de gestation [113], soit un jour avant les cellules sérotoninergiques du SNE.

Dans notre travail, l'analyse transcriptomique a montré une augmentation de l'expression génique de ces marqueurs des CSE chez les fœtus témoins de E15 à E21: d'un point de vue quantitatif, ces modifications sont plus importantes que celles du SNE. Cette augmentation chez les témoins est particulièrement élevée en fin de gestation, ce qui suggère une implication du SE pour les processus néonataux de digestion. Les résultats du transcriptome ont été confirmés par l'immunohistochimie. Chez les fœtus avec ligature, le segment proximal avait une augmentation importante du nombre de CSE en comparaison au groupe contrôle et à l'inverse dans le segment distal. Le segment proximal semble encore une fois le plus perturbé par la ligature. Ces résultats ont été confirmés par un échantillon de patients humains avec atrésie iléo-jéjunale. Même si l'évolution après la naissance n'a pu être étudiée, il est probable que la perturbation du SE a un rôle tout aussi important que celle du SNE en ce qui concerne les complications opératoires.

Des données similaires avaient été rapportées sur un modèle d'atrésie chez le poulet [93] mais avec des techniques limitées à l'immunohistochimie. Les auteurs retrouvaient un nombre de cellules très augmenté en proximal. Ils retrouvaient également un lien entre la précocité et la sévérité de la dilatation d'une part et le nombre de cellules d'autre part. De telles observations ont été rapportées pour les neurones du SNE [77, 92] sur le même modèle.

Comme pour le SNE, les modifications en analyse transcriptomique confirment la maturation accélérée dans le segment proximal et retardée dans le segment distal. Cette réorganisation pourrait également répondre aux lois de la mécanotransduction évoquée dans le chapitre du SNE. Les CSE jouent un rôle clé dans le contrôle de la sécrétion et de la motilité intestinale. Dans le petit intestin, elles sont spécialisées dans la sécrétion de diverses hormones : la gastrine qui stimule la sécrétion enzymatique, la somatostatine qui inhibe la motilité et la sécrétion de gastrine, la cholécystokinine qui inhibe la mobilité gastrique et régule l'homéostasie du glucose, le polypeptide YY (PYY) qui régule la prise alimentaire ou la 5-hydroxytryptamine qui stimule la motilité intestinale.

De notre analyse, il ressort que les troubles du SE dans l'intestin avec atrésie sont probablement imputables aux variations de pression. En effet, le segment d'amont est très modifié alors que le segment d'aval l'est beaucoup moins. Le fait que le segment d'aval est quasi superposable au témoin est un argument qui milite contre l'influence des facteurs circulants du liquide amniotique dégluti. Aussi, il est connu depuis quelques années que les CSE peuvent jouer un rôle de mécanorécepteur [114]. Elles sont donc sensibles à la pression luminale. Récemment, il a été mis en évidence la présence d'un mécanorécepteur spécifique de ces cellules, appelé Piezo 2 [115], et qui partage beaucoup de similitudes avec les mécanorécepteurs des cellules cutanées de *Merckel* [116]. La stimulation de Piezo 2 entraîne la sécrétion de sérotonine par les CSE. Dans notre étude, ces récepteurs sont diminués en amont, ce qui peut être la conséquence d'un rétro contrôle négatif par surstimulation. Le récepteur Piezo 1, lui, est retrouvé dans les cellules épithéliales de l'intestin, il n'est pas modifié dans notre étude et il n'est pas certain à l'heure actuelle de sa présence ou de son implication dans la mécanotransduction des CSE. Ainsi les phénomènes de pression par le biais de la sécrétion de la sérotonine joueraient peut-être un rôle dans les anomalies de maturation du SE. La figure 53 illustre le circuit établi entre le SNE et le SE en réponse à la pression luminale.

Nous devons ici nous pencher sur le rôle de la sérotonine dans le système digestif. Il est connu que la sérotonine contenue dans le système digestif est quantitativement beaucoup plus importante que la sérotonine cérébrale – pourtant fort utile - mais son rôle est moins bien compris [117]. Au niveau digestif, elle est synthétisée par l'enzyme Tryptophane Hydroxylase 1 (TPH1) qui se trouve dans les CSE. Dans notre étude, cette enzyme est franchement augmentée ($FD \times 2$; $p = 10^{-2}$) sur le segment d'amont alors que la TPH2, isoenzyme spécifique des neurones, n'est pas modifiée, ni en amont, ni en aval.

De plus, il a été avancé que la sérotonine aurait peut-être un rôle d'hormone avec une action systémique [118] sur de multiples organes grâce à son transporteur : le SERT ou SLC6A4.

Pression et circuit neuro-endocrinien

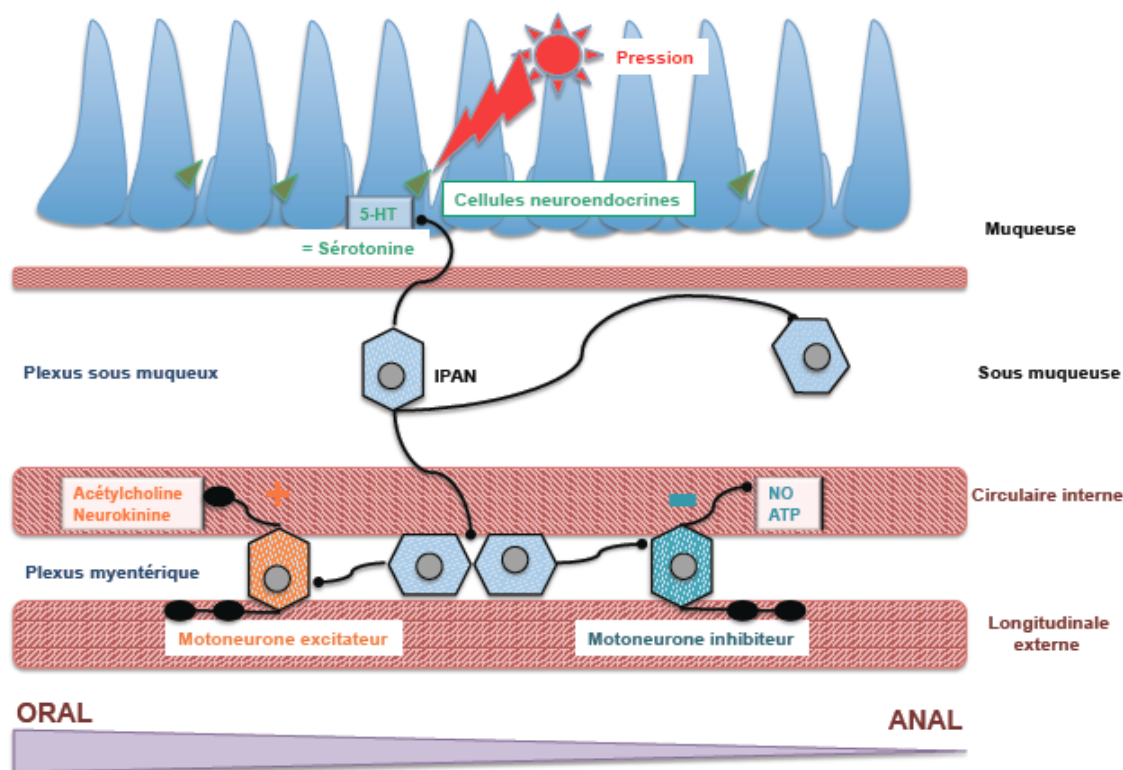


Figure 53 : Schématisation du circuit neuroendocrinien dans la pression lumenale

Le stimulus de pression est capté par les mécanorécepteurs Piezo 2 des cellules neuroendocrines. En conséquence, il est libéré de la sérotonine (5-HT) qui stimule les IPAN (Intrinsic Primary Afferent Neuron) qui stimule à son tour le plexus myentérique avec une inhibition de la contraction en aval et une activation en amont du même stimulus.

Dans notre étude, SERT est légèrement diminué en amont et en aval ce qui pourrait indiquer une down-regulation de ce transporteur. L'action locale intestinale de la sérotonine est décrite comme inflammatoire et plutôt neurotoxique si les neurones du SNE ne sont pas protégés. Cependant, la TPH2 induite elle dans les neurones a une action plutôt neuroprotective par l'activation des récepteurs 5HT-4. En effet ce récepteur induit la neurogénèse [119], il est neuroprotecteur pendant le développement. Dans nos résultats de transcriptomique, les récepteurs 5HT ne sont pas modifiés à l'exception de 5HTR7, récepteur à la sérotonine qui a un rôle connu dans le relâchement musculaire [120]. L'augmentation de ce récepteur pourrait ainsi découler d'une augmentation de pression dans le segment d'amont.

Tous ces éléments mériteraient bien sûr d'être confirmés mais incitent à se pencher sur le rôle de la sérotonine et des CSE dans les mécanismes physiopathologiques des atrésies digestives.

Ces considérations ouvrent la voie pour se poser la question des relations système digestif et système nerveux central. Mais ne faut-il pas introduire le SE comme un élément incontournable d'une voie hypothétique « microbiote-SE-SNE-SNC ». En effet, le SE est un véritable système sensoriel qui peut également capter et transmettre des informations sur le contenu de la lumière digestive [121]. Si les interactions CSE et SNE sont effectivement fonctionnelles comme l'indique *Bohorquez et al.* [42, 122], alors on peut imaginer que les CSE vont faire l'intermédiaire entre le microbiote et le SNE, lui-même en lien avec le SNC. Cette voie « microbiote-SE-SNE-SNC » pourrait expliquer comment le microbiote module le fonctionnement cérébral et que inversement le cerveau peut modifier la composition du microbiote via le système nerveux autonome végétatif [123] et peut-être les CSE. Cette transmission d'informations implique une interaction soit chimique à travers la libération de neuropeptides [124] selon le mode paracrine, soit synaptique. Cette dernière communication a été étayée par la découverte de connexions cellulaires directes entre les neurones du SNE et un prolongement cellulaire neuroendocrinien, décrit comme pseudo-axonal, récemment illustré en microscopie électronique avant d'être baptisé « neuropode » [42]. L'étude ultrastructurale de ce neuropode met en évidence des formations de type neurofilaments très similaires à celles des axones [42]. Après une description morphologique, le même auteur a prouvé une connexion fonctionnelle synaptique entre le « neuropode » et le SNE, faisant employer le terme de circuit. Ce dernier se présente comme une boucle entre SE et neurones entériques afférents (IPAN) ou efférents, le neurotransmetteur retrouvé étant la dopamine [122]. Ce lien physique avec le SNE confère un statut particulier à la cellule endocrine. Cette cellule endocrine représente 1% des cellules épithéliales, et est entourée d'entérocytes dont la demi-vie est de 5 jours alors que la sienne dépasse les 60 jours pour la population cellulaire du SE marquée au PYY [125]. Cette longévité découle probablement de son rôle privilégié dont le but serait de pérenniser le circuit qui a été créé avec le SNE.

Des perturbations de ces connexions pourraient altérer les fonctions homéostatiques intestinales, c'est ainsi que la littérature a récemment suggéré le rôle des cellules endocrines dans les désordres digestifs de nature inflammatoire ou auto-immune, avec des conséquences potentielles sur l'absorption et la mobilité [126, 127]. L'inflammation modifie les neurones notamment leur ratio avec une augmentation des neurones sérotoninergiques ainsi que les cellules neuroendocrines, il en découle une hyperexcitabilité des IPAN [128]. La figure 54 illustre toutes les hypothèses discutées et soulevées par ce travail.

Les cellules neuroendocrines ont également été incriminées dans des pathologies acquises comme le syndrome du côlon irritable [129] ou les complications de l'intestin court [130]. Dans le modèle animal du rat, Khen-Dunlop et al [83] avaient retrouvé une inflammation plus importante dans le segment d'amont avec une augmentation de certaines cytokines comme le Cxcl2, les interleukines 6 et 1. Or, il a été montré que cette inflammation est à l'origine d'une atteinte du SNE et des cellules neuroendocrines [128]. L'inflammation entraîne une modification de ces populations cellulaires ainsi qu'une augmentation de l'excitabilité des IPAN.

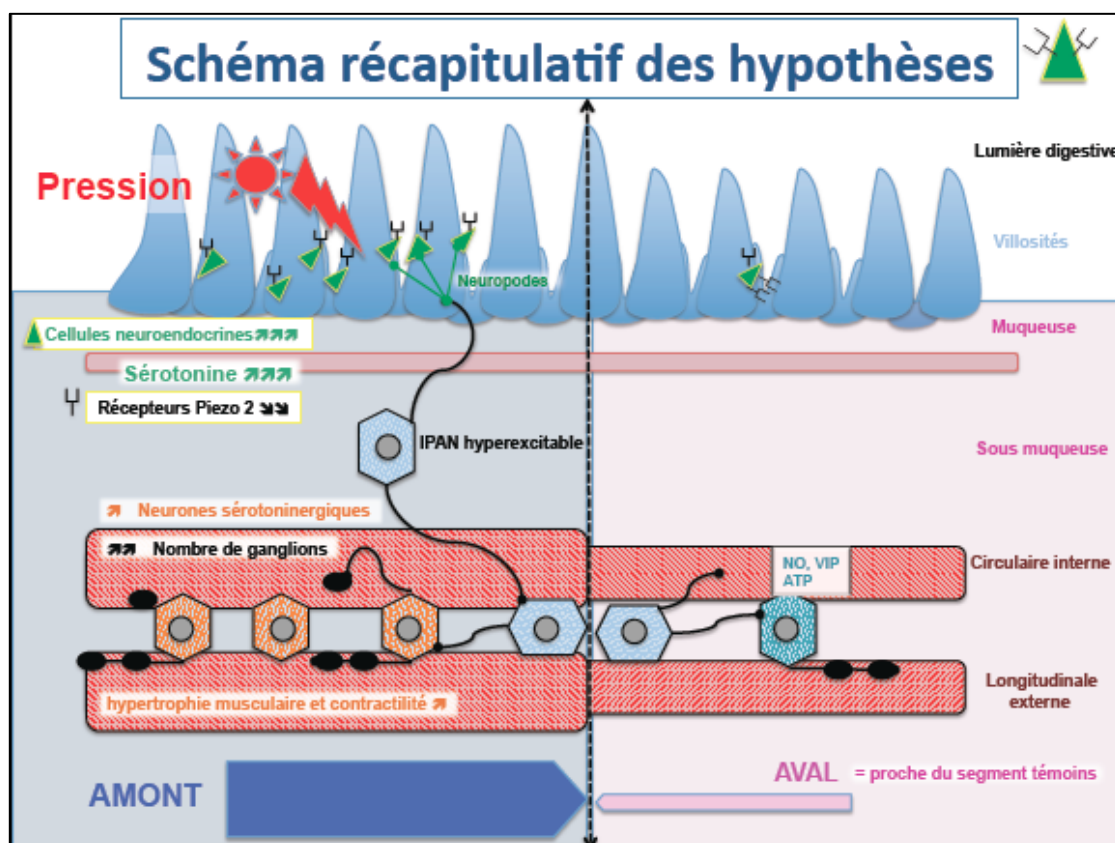


Figure 54 : Récapitulatif des hypothèses dans le modèle d'interruption digestive

Le stimulus de pression est capté par les mécanorécepteurs Piezo 2 des cellules neuroendocrines. En conséquence, il est libéré de la sérotonine (5-HT) qui rend les IPAN (Intrinsic Primary Afferent Neuron) hyperexcitables. Cela entraîne une augmentation de la proportion des neurones sérotoninergiques, une augmentation des ganglions nerveux une hypertrophie musculaire. Les caractéristiques globales du segment d'amont sont une augmentation de sa maturation alors que celles du segment d'aval sont proches du témoins.

Cette interaction entre SNE et SE est ainsi cruciale dès les premiers stades de maturation intestinale. Une donnée émergente prône l'importance du microbiote dès ces premiers stades de développement [40]. La modulation du microbiote par le SNC via la libération de molécules comme les catécholamines, la sérotonine ou les cytokines est connue depuis plusieurs années [131, 132]. Plus récemment, il a été soulevé l'hypothèse que l'interaction microbiote-cerveau influence crucialement l'évolution du SNC, évoqué sous le concept de cerveau social [133] probablement par des mécanismes de nature épigénétique ou transfert de gènes [134]. Or la période de plus grande influence par le microbiote pour le développement du SNC est la période périnatale [135] voire anténatale, c'est à dire la fenêtre étudiée ici pour la prise en charge de l'atrésie intestinale.

Au total, les troubles de la mobilité digestive seraient imputables tant aux perturbations du système neuroendocrine qu'à celles du SNE. Ces perturbations touchent donc le circuit entre SE et SNE sans que ces résultats ne nous permettent de statuer définitivement sur le mécanisme causal de l'anomalie. Il serait intéressant de pouvoir

expertiser in vitro d'une part les conséquences des modifications de pression luminale sur le SE et d'autre part les modifications sous jacentes du microbiote.

3) L'épithélium

D'après notre approche globale, le tissu épithélial apparaît comme le tissu le plus modifié par le phénomène d'atrésie. L'étude cinétique avec la forte variation d'expression génique en fin de gestation montre l'importance que va prendre l'épithélium à la naissance. Comme pour le cas des cellules neuroendocrines, cette différenciation relativement tardive au cours du développement embryonnaire pourrait expliquer la plus forte influence de l'obstruction mécanique. Contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, des différences entre amont et aval apparaissent dans notre travail. Les trois chapitres suivants détaillent les résultats des trois fonctions épithéliales : absorption, protection et défense antibactérienne.

a) Fonction de digestion et d'absorption

La malabsorption étant une des complications post-chirurgicales des atrésies, nous sommes intéressés aux fonctions de digestion et d'absorption médiées par les entérocytes. Il existe très peu de travaux sur le sujet. Ceux de *Schaart et al* [136] se sont intéressés à la structure épithéliale intestinale des nouveau-nés humains. Il s'agissait uniquement d'investigations immunohistochimiques pour étudier la morphologie entérocytaire et la structure épithéliale. Les marqueurs étaient des enzymes (lactase, sucrase-isomaltase) ou des transporteurs pour l'absorption (SGLT-1, Glut5). Cette étude ne retrouvait pas de différence entre les deux segments de l'atrésie, mais ne proposait aucune comparaison avec des témoins. Aucune information sur la distance entre les prélèvements et l'atrésie n'était fournie. Il existait une perturbation de l'architecture non spécifique autant en amont qu'en aval de l'atrésie.

Dans notre étude, il n'est pas retrouvé de différence d'expression génique de la lactase entre les deux portions de l'atrésie. En amont, la surface d'absorption augmente de manière significative, ainsi que l'expression de l'entérokinase. En revanche, notre étude s'est intéressée à la surface d'absorption, significativement augmentée en amont et diminuée en aval par rapport aux témoins. Ces résultats sont cohérents avec l'hypertrophie du segment d'amont, déjà rapportés dans la littérature [89].

Concernant l'aspect ultrastructural des entérocytes pour les intestins ligaturés, nous avons retrouvé un plateau strié et des systèmes de jonction bien présents au pôle apical, cependant la hauteur des microvillosités est diminuée de moitié en amont comme en aval. Le nombre des vacuoles d'absorption est réduit pour les intestins d'amont et les intestins d'aval en sont dépourvus. Les intestins d'aval sont caractérisés par la présence de deux populations d'entérocytes, une population semblant plus

immature avec un cytoplasme plus clair et un noyau de taille augmentée. Les travaux de *Serrano et al [137]* et *Baglaj et al [90]* se sont intéressés à l'aspect des villosités intestinales des entérocytes. Les résultats ne montrent pas de différence entre les segments d'amont et d'aval à E21 mis à part au niveau de l'obstruction pour *Baglaj et al [90]*. Ces deux équipes ne se sont pas intéressées aux autres cellules épithéliales.

Nos résultats montrent en outre deux types d'entérocytes en aval de la ligature à E21 suggérant, comme les résultats de transcriptomique, un retard de maturation de ce segment. Concernant l'augmentation de la surface d'absorption en amont, celle-ci semble être la conséquence de l'augmentation du diamètre. En effet, on note d'une part que l'expression génique de la plupart des marqueurs épithéliaux ne varie pas de part et d'autre de l'atrésie et d'autre part que la hauteur des villosités en amont et en aval de l'obstruction diminue en comparaison aux témoins. La diminution de la hauteur des villosités peut se concevoir comme un phénomène mécanique isolé, conséquence de l'interruption du liquide amniotique bien qu'un processus inflammatoire ne puisse être exclu. Aussi, les résultats obtenus sont difficiles à interpréter et à expliquer sans analyse fonctionnelle qui permettrait notamment d'évaluer l'activité enzymatique, particulièrement celle de la lactase.

b) Fonction de barrière intestinale

La fonction de barrière intestinale est principalement assurée par les constituants de la double-couche de mucus, sécrétée par les cellules caliciformes, et formant une barrière protectrice pour le tractus gastro-intestinal. Cette fonction de protection a été évaluée en quantifiant le nombre de cellules caliciformes et l'expression génique des produits de leur sécrétion. Le nombre de cellules caliciformes est significativement augmenté dans le segment d'amont. Cependant, l'expression génique des mucines en amont est variable, augmentée pour la mucine 5b et diminuée pour la mucine 16. En aval, les résultats diffèrent avec un nombre de cellules caliciformes légèrement diminué, une augmentation significative de la mucine 16 et peu de variations pour la mucine 5b. L'expression du TFF3 est significativement augmentée en amont et aval de l'atrésie.

Les seuls travaux disponibles sur le sujet sont également ceux de *Schaart [136]* dont les investigations immunohistochimiques ne montraient pas de différence entre les deux segments de l'atrésie pour les expressions de la mucine 2 et le TFF3. Ces résultats sont en contradiction avec les nôtres mais il est difficile de comparer les deux études étant donné qu'il n'est pas précisé le mode de quantification de l'expression dans cette publication. De même, la distance entre ces prélèvements et l'atrésie n'est pas non plus précisée, ce qui pourtant a probablement une influence.

La mucine 5b est augmentée en amont, comme toutes les mucines sécrétées et solubles, et comme le TFF3. Ces mucines sécrétées favorisent une augmentation de la couche de mucus et ainsi la protection de la barrière intestinale. La mucine 5b et le TFF3 sont aussi augmentés dans le segment d'amont en comparaison aux témoins. Cette

augmentation peut rentrer dans le cadre du phénomène d'hyper différenciation du segment d'amont, ou bien indiquer une augmentation des défenses en amont.

En ce qui concerne les mucines transmembranaires, certaines augmentent au cours du développement (mucines 1, 3 et 13), et elles sont légèrement augmentées en amont comme en aval. D'autres mucines transmembranaires (mucines 4 et 16) diminuent au cours du développement, mais présentent des variations plus marquées en amont et en aval. En effet, la mucine 16 diminue au cours du développement et reste diminuée en amont, alors qu'elle augmente en aval. Cette mucine n'a jamais été décrite dans la littérature comme étant impliquée dans la physiopathologie de l'atrésie. *Van Putten et al* [51] ont montré qu'une augmentation de cette mucine 16, comme dans le segment d'aval dans le présent modèle d'atrésie, est corrélée à une diminution des jonctions serrées dans les processus de cancérogenèse. Une hypothèse est que la diminution de ces jonctions favoriserait la perméabilité épithéliale et ainsi la translocation des agents pathogènes dans le segment d'aval. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires afin d'étudier la perméabilité épithéliale de l'intestin. Dans les travaux de *Khen-Dunlop et al* [83], la perméabilité paracellulaire n'était pas modifiée ni en amont ni aval alors que la perméabilité transcellulaire était augmentée en amont en comparaison à l'aval.

Dans notre étude, la mucine 4 est augmentée en amont alors qu'elle diminue au cours du développement. Cette augmentation serait impliquée dans les processus de cancérogenèse associés à de l'inflammation, et dans la survie des cellules épithéliales lorsqu'elle est associée à ERBB2 [51]. Cette hypothèse serait en accord avec les travaux de *Khen-Dunlop et al* [83], où une augmentation des cytokines pro-inflammatoires était retrouvée dans le segment d'amont. Ces processus inflammatoires pourraient expliquer l'augmentation de la perméabilité transcellulaire [83], retrouvée dans ce même segment d'amont. Des études précliniques ont mis en évidence que des stimuli de stress augmentaient la perméabilité intestinale, facilitant ainsi les phénomènes de translocation [138, 139]. Cette augmentation de perméabilité couplée ou à l'inflammation muqueuse intestinale pourrait altérer la mise en place de ces circuits intestin-cerveau [140, 141].

c) Fonction de défense antimicrobienne

Les peptides antimicrobiens sont sécrétés par les cellules épithéliales et en particulier par les cellules de *Paneth* et se répartissent sur toute la hauteur de la couche de mucus. La défense antimicrobienne a été évaluée par la quantification de l'expression génique de ces peptides.

En amont comme en aval, les α -défensines et le lysozyme 2 sont augmentés. Cette augmentation est physiologique au cours du développement, à l'exception de l' α -défensine 6 (Defa6) et l' α -défensine 8 (Defa8). Les travaux de *Schaart* [136] ne montraient pas de différence entre les deux segments de l'atrésie chez des nouveau-nés pour l'expression du lysozyme. Ces résultats ne sont pas en accord avec les nôtres, puisque nous retrouvons une

différence significative. Néanmoins, il est une fois de plus difficile d'exploiter cette étude étant donné que le mode de quantification pour l'expression du lysozyme n'est pas précisé.

La même évolution est notable concernant les récepteurs « toll-like » (TLR). Ils augmentent fortement au cours du développement, et en amont ou en aval de l'atrésie, sauf pour TLR5 dont l'expression est diminuée en amont mais augmentée en aval. Certains de ces récepteurs ne sont pas uniquement exprimés par les cellules M, mais aussi par les cellules sanguines (macrophages, monocytes, cellules dendritiques). Ceci explique que des TLR, notamment le TLR5, ont une expression augmentée dans des pathologies inflammatoires intestinales comme la maladie de Crohn, ou la colite ulcéreuse [142]. Cette augmentation traduirait un déficit dans la capacité à maintenir la barrière épithéliale intègre en aval, ce qui pourrait favoriser la translocation microbienne.

Les travaux de *Antoni et al* [52] et de *Gersemann et al* [142] rapportent également qu'un déficit en TLR4 ou TLR3 pourrait être à l'origine d'une inflammation de la paroi intestinale et faciliteraient l'apparition d'une maladie de Crohn. L'augmentation globale des α -défensines retrouvée en analyse transcriptomique dans les segments d'amont et d'aval pourrait s'expliquer par l'augmentation du nombre des cellules de Paneth par rapport aux contrôles.

Au total, les modifications des 3 composantes épithéliales dans le modèle d'interruption intestinale sont d'amplitude variable mais confirment que le profil d'amont est différent de celui d'aval. Leur interprétation définitive nécessite des expérimentations complémentaires. Avant tout, il s'agit de résultats originaux dans la littérature et dont l'exploitation doit être poursuivie.

IV. Perspectives

L'analyse transcriptomique ouvre des possibilités d'étude très larges dont seulement une partie des données a été exploitée par le présent travail. L'étude de nombreux gènes non étudiés jusque là donnera matière à d'autres considérations et à de nouveaux projets. En particulier, la focalisation sur les microARN pourra à elle seule constituer une étude avec une nouvelle démarche expérimentale sur ce modèle du rat.

L'étude préliminaire sur les tissus humains demande à être étayée par un volume plus important d'échantillons. Il est envisagé de travailler sur une collection plus importante, par exemple en colligeant des pièces opératoires de plusieurs centres de chirurgie pédiatrique. Ces considérations pourraient jeter les bases d'une étude dans le cadre d'un Projet Hospitalier de Recherche Clinique.

La découverte de perturbations du système endocrinien est originale. L'implication de la sérotonine en rapport avec les phénomènes de mécanotransduction demande à être confirmée, de même que le rôle du récepteur Piezo2. Si c'est le cas, les effets d'agonistes ou d'antagonistes de récepteurs sérotoninergiques pourraient être testés dans le modèle animal ou in vitro. La réflexion sur l'atteinte du système neuroendocrine ouvre la porte à toutes les modifications qui potentiellement existent dans le phénomène d'obstruction voire les anomalies congénitales ou non du tube digestif comme le laparoschisis ou le pseudo obstruction intestinale chronique.

Il est plausible que les anomalies du système nerveux entérique décrites dans ces affections [143, 144] s'associent à des anomalies du système neuroendocrinien dès lors que leur développement embryonnaire et leur fonctionnement sont indissociables. Indissociable l'est également la nature du microbiote, acteur incontournable de l'axe cerveau-intestin, qui pourrait être étudiée dans l'interruption intestinale anténatale. Une cartographie de quelques protéines du méconium a été réalisée chez les fœtus sains en vue de décrire son environnement utérin [145] mais une analyse protéomique pourrait cibler des protéines d'intérêt dans le syndrome obstructif. Ces réflexions pourraient emmener d'autres études à visée exploratrice puis thérapeutique sur des modèles animaux et pourquoi pas chez l'homme.

Le modèle du gros animal offre la possibilité d'un geste chirurgical à la naissance pour étudier l'évolution postnatale qui n'a pu être évaluée ici. Différents facteurs sont alors susceptibles d'influencer le comportement du tissu intestinal lors de la réalimentation. Le bénéfice d'une réalimentation très progressive avec un débit minimal dite « minimal enteral feeding » [146] a déjà été prouvée chez l'homme après une interruption intestinale anténatale comme l'atrésie ou bien dans le laparoschisis. Il serait intéressant d'étudier

l'influence de ce mode de réalimentation dans un modèle animal sur les différents types cellulaires notamment les cellules neuroendocrines.

Les modifications de la barrière intestinale dans notre modèle demandent à être mieux exploitées, notamment par confrontation avec des études immunohistochimiques et fonctionnelles. Dans cette perspective l'appui d'une analyse protéomique pourrait être informative, notamment pour analyser la composition du liquide amniotique dégluti. Les techniques de diagnostic anténatal de syndrome occlusif néonatal s'améliorent et rendent possibles des diagnostics de plus en plus précoces et précis. A l'inverse, les techniques de traitement *in utero* de ces malformations par un acte purement chirurgical de remise en continuité ne semblent pas réalisables dans un futur proche. La caractérisation du système neuroendocrine ou épithélial comme tissu cible pourrait ouvrir la possibilité de traitements alternatifs, comme par exemple l'injection anténatale de substances pour accélérer leur maturation ou modifier le développement des segments intestinaux. L'idée est par exemple de libérer en période anténatale dans le segment d'aval par le biais de gels à libération prolongée des substances contenues dans le liquide amniotique comme l'acide hyaluronique ou l'érythropoïétine.

Avant une application à l'homme, la contribution des modèles de gros animaux pourrait être une transition vers les applications thérapeutiques. Une collaboration avec l'entreprise Medincell SA, spécialisée dans la synthèse de gels avec fonction de libération prolongée de principes actifs pourrait être mise en place.

CONCLUSION

L'analyse transcriptomique d'une obstruction intestinale congénitale sur le modèle murin d'atrésie intestinale chez le rat nous a permis de montrer que l'intestin proximal et l'intestin distal ont un comportement différent, et ceci à plusieurs points de vue. L'analyse transcriptomique globale indique clairement que l'intestin d'amont connaît de plus fortes modifications dans l'expression génique, et ce pour l'ensemble des types cellulaires, que l'intestin d'aval. Il semble qu'il soit le siège d'une accélération de la différenciation en comparaison à l'intestin témoin. L'intestin distal aurait, du point de vue de l'expression génique, un comportement très proche de l'intestin témoin non-atrétique.

De plus, l'analyse du système nerveux entérique semble montrer que des modifications d'expression génique et des variations morphologiques existent, qu'elles concernent également plus le segment d'amont que celui d'aval mais que ces modifications semblent de moindre ampleur pour le système nerveux que pour le tissu endocrinien et épithélial. Le point nouveau apporté ici, par rapport à ce qui existe dans la littérature, est la mise en évidence de modifications significatives des cellules neuroendocriniennes, concernant également plus le segment d'amont que le segment d'aval. Associées à celles déjà décrites du système nerveux entérique, elles pourraient relier les troubles fonctionnels néonataux au substratum de l'atrésie intestinale.

Enfin, il a été mis en évidence d'authentiques anomalies épithéliales qui pourraient expliquer les troubles de la défense immunitaire et de la barrière digestives constatées dans les périodes postopératoires chez les patients.

Ces différents points amènent d'autres perspectives de recherche pour améliorer la prise en charge chirurgicale mais aussi extra-chirurgicale des patients porteurs d'un syndrome occlusif prénatal, dont l'atrésie jéjuno-iléale.

PUBLICATIONS

1. Communications orales

1. Congrès international de chirurgie pédiatrique EUPSA 2017 (Chypre): Disorders of neural crest derivative cells in congenital intestinal atresia
Q.Ballouhey, L.Richard, L.Fourcade, I.Ben Rhaïem, JM. Vallat, F.Sturtz, S.Bourthoumieu
2. Congrès national de l'Association des Morphologistes Reims 2017: Dérivés des crêtes neurales dans un modèle murin d'atrésie intestinale Q.Ballouhey, L.Richard, L.Fourcade, I.Ben Rhaïem, JM. Vallat, F.Sturtz, S.Bourthoumieu
3. Congrès national de Chirurgie Pédiatrique Toulouse 2016: Anomalies dans l'atrésie intestinale, quel est le rôle du système nerveux entérique ? Q.Ballouhey, L.Fourcade, L.Richard, F.Sturtz, S.Bourthoumieu

2. Communications affichées

1. Congrès international de chirurgie pédiatrique EUPSA 2016 (Milan): Postnatal disorders after congenital intestinal atresia : is enteric nervous system the only one guilty ? Q.Ballouhey, L.Fourcade, L.Richard, F.Sturtz, S.Bourthoumieu

3. Article

Article [147]: Involvement of the enteroendocrine system in intestinal obstruction. Ballouhey Q, Richard L, Fourcade L, Ben Rahiem I, Vallat JM, Sturtz F, Bourthoumieu S. PlosOne 2017

RESEARCH ARTICLE

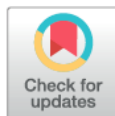
Involvement of the enteroendocrine system in intestinal obstruction

Quentin Ballouhey^{1,2*}, Laurence Richard^{1,3}, Laurent Fourcade^{1,2*}, Ines Ben Rhaïem¹, Jean Michel Vallat^{1,3}, Franck Sturtz^{1,4*}, Sylvie Bourthoumieu^{1,5*}

1 EA6309 peripheral neuropathy, University of Medicine, Limoges, France, **2** Department of pediatric surgery, University Hospital, Limoges, France, **3** Department of neurology, University Hospital, Limoges, France, **4** Department of biochemistry and molecular genetic, University Hospital, Limoges, France, **5** Department of histology, cytology and cytogenetic, University Hospital, Limoges, France

* These authors contributed equally to this work.

* qballouhey@gmail.com (QB); sylvie.bourthoumieu@unilim.fr (SB)



Abstract

Introduction

Intestinal atresia, a rare congenital condition, is often associated with intestinal motility disorders despite adequate neonatal surgery. Previous studies have focused on changes in the enteric nervous system (ENS). We hypothesized that other components of the digestive tract could be involved in this condition.

Material and methods

In a rat model of surgically-induced intestinal obstruction, a transcriptome analysis was performed to measure the global gene expression. Then, analyzes were focused on genes expressed in ENS and neuroendocrine cells. Rat fetus small intestines at different developmental stages (ED15, ED17, ED19 and ED21, (n = 22)) were studied as controls and compared to the upper and lower segments of small intestines from rat fetuses with surgically-induced obstruction (n = 14; ligature at ED18). The gene expression pattern was confirmed by immunohistochemistry, electron microscopy and RT-qPCR.

Results

From ED15 to ED21, there was a physiological decrease in the gene expression of ENS markers and an increase in that of neuroendocrine genes. Regarding operated embryos, the changes in global gene expression were significantly higher in the proximal segment compared to the distal segment (18% vs. 9%). More precisely, a decrease in ENS gene expression and an increase in neuroendocrine gene expression were observed in the proximal segment compared to controls, indicating an accelerated maturation pattern. Immunohistochemistry and electron microscopy confirmed these findings.

Conclusion

Fetal intestinal obstruction seems to induce an accelerated maturation in the proximal segment. Moreover, neuroendocrine cells undergo significant unexpected changes, suggesting

OPEN ACCESS

Citation: Ballouhey Q, Richard L, Fourcade L, Ben Rhaïem I, Vallat JM, Sturtz F, et al. (2017) Involvement of the enteroendocrine system in intestinal obstruction. *PLoS ONE* 12(11): e0186507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186507>

Editor: Michael Schubert, Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche-sur-Mer, FRANCE

Received: April 4, 2017

Accepted: October 3, 2017

Published: November 1, 2017

Copyright: © 2017 Ballouhey et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The results of the microarray analysis are publicly accessible in ArrayExpress. The accession number is: E-MTAB-5981.

Funding: This work was supported by a grant from CHU de Limoges, APREL (Appel à projet Recherche Equipes Emergentes et Labellisées, 2013), funded by ARS Limousin.

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

ANNEXES

Annexes-tableaux

Tableau 1 : Série des atrésies jéjuno-iléales publiées chez l’homme depuis 1999

Authors	Cohort	Day at curative surgery	Analyses	Methods	Proximal results	Distal results
Masumoto et al 1999 [26]	n=5 ileal atresia n=3 jejunal atresia	Newborn (GA: 34-40 week)	Morphological analysis ENS: PGP 9.5, NADPH-d Muscle: α-SMA ICC: c-Kit	IHC	Morphology: dilatation with hypertrophy of circular musculature. ENS: hypoplasia of the myenteric and submucous ganglia, reduction in the density of nerve fibers (enteric neurons) in the circular musculature, the muscularis mucosae and myenteric plexus, reduction in the size of ganglionic cells in both the plexuses Muscle: reduction in the intensity for α-SMA in the hypertrophic circular muscle layer ICC: hypoplasia of C-Kit-positive cells localized around the myenteric plexus, but rarely within the muscularis	ENS: distribution of nerves comparable with controls ICC: c-kit positive cells comparable with controls Muscle: weak hypertrophy in the circular musculature, distribution of α-SMA comparable with controls
Watanabe et al 2001 [27]	n=7 jejunal or ileal atresia (2 type II, 4 type III, 1 type IV) n=5 controls	Newborn (GA: 34-40 week)	Morphological analysis SNE (myenteric plexus): PGP 9.5, NF	IHC	Morphology: dilatation of the intestinal segment ENS: hyperplasia of the ganglia	Morphology and ENS: no difference with controls
Khen et al 2004 [6]	n=12 ileal atresia n=10 jejunal atresia n=31 controls	Newborn (GA: 34-40 week)	ENS (neuronal and glial cells): NF, nNOS, GFAP ICC: c-KIT	IHC	Neurons: accelerated maturation of myenteric plexus in comparison to controls Gial cells: accelerated maturation in comparison to controls ICC: delayed maturation in comparison to controls	Neurons: delayed maturation in comparison to controls Gial cells: delayed maturation in comparison to controls ICC: comparable with neonatal controls
Ozguner et al 2005 [28]	n=6 jejunal atresia type III n=4 ileal atresia (3 type III, 1 type I) n=3 controls	Newborn	Morphological analysis muscle ENS: Synaptophysin	Masson trich. HE IHC	Muscle: at 1 cm proximal to the atresia: segmental absence of muscular layers and replacement with fibrous tissue on both the antimesenteric and mesenteric sides. At 2 cm, deficiency of muscle layers (circular and longitudinal), segmental muscular hypertrophy and irregularity. Normal at 4cm. ENS: at 1 cm proximal to the atresia: absence of normal ganglia in the myenteric nerve plexus. At 2 cm, decreasing of number, diameter, and intensity of the ganglion cells. Normal at 4 cm.	Muscle: at 1 cm distal to the atresia, reduction of muscle layers. At 2 cm, normal longitudinal and circular muscle layers ENS: at 1 cm, decreased number of ganglia, reduction of intensity and diameter of ganglion cells, polymorphism in the size of the ganglia. At 2 cm distal to the atresia: comparable with controls.
Ramachandran et al 2007 [29]	n=6 ileal atresia (5 type IIIa, 1 multiple atresia) n=2 controls	Newborn (GA: 36-38 week)	ENS: AChE, NADPH-d	Whole mount IHC	Multiple atresia: loss of architecture, absence of neuronal cells in ganglia Type IIIa atresia: similar changes in innervation of proximal and distal blind atretic end. NADPH-d: intensity of NADPH-d comparable with controls, conserved architecture, large ganglia with abnormal shape. AChE: alteration in architecture, large irregularly shaped ganglia. In the atretic bowel with meconium: reduction in the intensity of AChE	Type IIIa atresia. NADPH-d: intensity of NADPH-d comparable with controls, conserved architecture, large ganglia with abnormal shape. AChE: alteration in architecture, large irregularly shaped ganglia.
Tander et al 2010 [30]	n=7 ileal atresia n=14 jejunal atresia n=14 controls	Newborn (GA: 38-40 week)	ICC: CD117	IHC	Reduction of the number of ICC.	Reduction of the number of ICC.
Gfroerer et al 2010 [31]	n=7 ileal atresia (6 type III, 1 multiple atresia) no control	Newborn (GA: 38-40 week)	ENS (neuronal and glial cells): S-100, PGP-9.5, NF ICC: C-kit	HE IHC	Neuron: strong expression of PGP 9.5 and NF in the ganglion cells and nerve fibers of the myenteric plexus, no increase in number of ganglia within both plexuses, neuronal dysplasia Gial cells: Increase in expression of S-100 immunoreactive cells in the two plexuses, presence of S100-positive giant ganglia within the submucosal plexus. ICC: reduction in density of ICCs within the myenteric plexus (presence of ICC in the circular and longitudinal muscle layer)	Normal expression and distribution of ENS and ICC within the submucosal and myenteric plexuses and muscular layers.
Wang et al 2013 [7]	n=25 atresia (3 type II, 15 type III, 7 type IV) n=10 controls	Newborn (GA: 34-41 week)	ENS (neuronal and glial cells): calretinin, S-100 ICC: c-kit Muscle: α-SMA Growth factors: GDNF, BMP-2	IHC	Normal expression of both GDNF and BMP-2 at 10 cm proximal to the atresia. Normal expression of CR, c-kit, α-SMA, and S-100 at 15 cm proximal to the atresia.	Normal expression of all 6 markers at 3 cm distal to the atresia site was normal.
Khen-Dunlop et al 2013 [11]	n=8 jejunal atresia	Newborn (GA: 32-39 week)	Morphometric analysis ENS: ChAT, n-NOS Inflammation: CxCL2, IL1 beta, IL6, IL10, IFN gamma, iNOS	HES IHC RT-PCRq	Morphology: normal mucosa, muscular hypertrophy, myenteric plexus spaced knots. Neurons: higher expression of ChAT in proximal myenteric neurons than distal segments, similar expression of n-NOS in myenteric neurons between the proximal and distal segments. Inflammation: no difference in mRNA expression for cytokines CXCL2, IL1 beta, IL6, IL-10, iNOS or IFN gamma.	Morphology: normal mucosa, myenteric plexus with continuous aspect Neurons: higher proportion of ChAT-IR neurons Inflammation: no difference in mRNA expression

Tableau 2 : Série des atrésies jéuno-iléales expérimentales publiées chez l’animal depuis 2001

Authors	Animal model	Fetuses cohort	Atrésia model	Day at intestinal obstruction	Day at gut harvested	Analyses	Methods	Proximal results	Distal results
Chang et al 2001 [23]	Adult mouse	n=34	partial or total occlusion with polyethylen clip	40-60 days after birth	24-72 hours and 14 days	Morphological analysis: muscle, ICC ICC: ACK2 Electrical activity in circular muscles: functional studies	IHC TEM Electrophysiology	Muscle: hypertrophic, hyperplastic in tunica muscularis ICC: reduction of cells until 100 mm from clip, intermediate cells with ultrastructural features between fibroblasts and ICC Electrical activity: absence or reduction of slow waves Muscle: ED15: thicker muscular layer. ED17: no difference with controls. ED19: moderate hypertrophy of muscular layer.	Muscle: hypertrophic, hyperplastic in tunica muscularis ICC: reduction of cells until 5-10 mm from clip Electrical activity: normal slow wave activity
Ragbaj et al 2001 [8]	Chicken	n=108/462 atresia n=34/57 sham operated n=99/99 controls	surgical coagulation	ED12	ED15, ED17, ED19 and ED21	Morphometric analysis: epithelium, muscle	SEM TEM	Morphology: markedly dilatation, conservation of typical 4-tunica structure Ganglia: absence of submucosal ganglia, reduction in number of myenteric ganglia, increase in number of nerve cells per ganglion, abnormal fashion forming longitudinal clusters of densely packed nerve cells in the myenteric plexus. Nerve fibers: loss of axons in ganglia ICC: absence of ICC.	No difference with controls.
Schoenberg et al 2002 [20]	Chicken	n=88 atresia	surgical ligature	ED11	ED19	Morphological analysis ENS: AChE	Silver staining TEM IHC	Morphology: reduction in number of ganglia in submucosa, loss of AChE-IR in the submucosal layer, nerve cells in the myenteric ganglia were arranged themselves in round and not in oval cluster ICC: reduction in number of ICC.	Morphology: normal or hypoplastic gut Ganglia: reduction in number of ganglia in submucosa, loss of AChE-IR in the submucosal layer, nerve cells in the myenteric ganglia were arranged themselves in round and not in oval cluster ICC: reduction in number of ICC.
Parisi Sahi et al 2004 [21]	Chicken	n=64/199 atresia n=32 controls n=25/36 sham controls	surgical coagulation	ED12	ED15, ED17, ED19 and ED20	ENS: VIP, SP	IHC	Morphology: various intestinal dilatation Neurons: ED15: increase of VIP-IR fibers in the submucous and myenteric plexuses, in the circular muscular layer, and in the deep muscular plexus (DMP) for all moderately dilated bowels. In a severely dilated proximal bowel, reduction of VIP-IR fibers in proximal and distal bowel. ED17-ED19: disorganization and loss of the VIP-IR fibers from severely dilated tracts, thickened and broken fibers in the circular muscular layer. ED17: decrease of SP-IR. ED19: disappearance of SP-IR in the mucosa and submucous plexus.	Neurons: ED15: increase of VIP-IR fibers in the submucous and myenteric plexuses, in the circular muscular layer, and in the deep muscular plexus (DMP). In severely dilated proximal bowel, reduction of VIP-IR fibers in proximal and distal bowel. ED17-ED19: similar VIP and SP staining patterns to controls
Fliegel et al 2006 [24]	Chicken	n=56 atresia and controls	surgical ligature	ED11	ED11, ED12, ED13, ED14, ED15, ED16, ED17 and ED18	ENS: AChE	Silver staining IHC	Morphology: beginning dilatation at ED13 Nervous plexuses: ED13: normal morphology of both the myenteric and submucosal plexus compared to control. ED17: rarification of the submucosal plexus compared to controls, normal aspect of the myenteric plexus in both groups.	Nervous plexuses: ED17: rarification of the submucosal plexus compared to controls, normal aspect of the myenteric plexus in both groups.
Fourcade et al 2009 [10]	Rat	n=14 atresia and controls	surgical ligature	ED18	ED21	ENS: Synaptophysin Muscle: α-SMA	IHC	Ganglia: increased density of ganglia compared to distal segments with mature aspect of the myenteric plexus. Muscle: mature muscular pattern with SMA expression similar to ED21 controls at ED21	Ganglia: immature aspect of the myenteric plexus (pattern similar to controls at ED17). Muscle: immature aspect of the muscular pattern with SMA expression similar to ED17 controls.
Vaccaro et al 2009 [25]	Chicken	n=35 atresia n=14 sham operated	surgical coagulation	ED12 and ED16	ED19	Enterorendocrine cells: serotonin, neuropeptin	Grimeluis silver stain IHC	Morphology: dilatation. Enterorendocrine cells: significant increase in number of cell number (mainly in chick embryos operated on ED12), increase of serotonin positive cell number (especially in chick embryos operated on ED12), increase in number of neurotensin immunoreactive cells	Enterorendocrine cells: decrease in number of serotonin positive cell of chick embryos operated on ED16, compared to controls, no difference in number of neurotensin cells compared to controls.
Fourcade et al 2010 [9]	Rat	n=65 atresia n=33 sham operated n=25 controls	surgical ligature	ED16 to ED20	ED21	Morphological analysis	HES	Morphology: dilatation, increase in diameter compared to distal segments Histology: no modification in relation to the thickness of the inner muscle layer.	Morphology: larger diameter Neurons: reduction in density of the-IR neurons, increase in neuronal surface area, similar proportion of nNOS-IR neurons, increase in proportion of ChAT-IR neurons. No difference in the proportion of ChAT-IR neurons in comparison to controls. Glia cells: no significant difference in the density of glial cells Muscle: similar contractile response between proximal segments and controls
Khen-Dunlop et al 2013 [11]	Rat	n=44 atresia n=12 controls	surgical ligature	ED18	ED21	Morphological analysis ENS: ChAT, n-NOS, SOX10, Hu Inflammation: Ccl2, IL1 beta, IL6, IL10, IFN gamma, iNOS Apoptosis: caspase-3 Muscle: muscular contraction with carbachol	Whole-mount IHC RT-PCR Functional studies	Neurons: reduction in density of the-IR neurons, increase in neuronal surface area, similar proportion of nNOS-IR neurons, increase in proportion of ChAT-IR neurons. No difference in the proportion of ChAT-IR neurons in comparison to controls. Glia cells: no significant difference in the density of glial cells Muscle: similar contractile response between proximal segments and controls	Neurons: reduction in the proportion of ChAT-IR neuron compare to control Muscle: concentration 100-fold higher than controls to obtain contractile response
von Sochaczewski et al 2016 [22]	Chicken	n=15 atresia n=5 sham operated n=5 controls	surgical ligature	ED11 Group 1: 8-day ligature Group 2: 4-day ligature with released obstruction on ED15	Group 1: ED12 to ED19 Group 2: ED16 to ED19	Morphological analysis ENS: AChE activity	Silver impregnation TEM Thiocholine method of cholinesterase	Group 1: increase in number of ganglia after ED14, reduction in density with reduction in size of ganglia, reduction in number of large ganglia, absence of axonal network and myenteric plexus, reduction of non-myelinated axons, fibroblast-like cells replaced ICCs Group 2: increase in number of ganglia until ED17, reduction in density of ganglia until ED15, then increase at ED16 (decompression of the bowel), increase in amount of glial cells and cells with intermediate features between ICC and fibroblasts.	Groups 1 and 2: ganglion numbers, size, axonal network similar to controls.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Individualisation de l'intestin primitif.....	15
Figure 2 : Développement embryonnaire de l'intestin primitif.....	16
Figure 3 : Migration des cellules des crêtes neurales.....	18
Figure 4 : Migration des cellules des crêtes neurales.....	20
Figure 5 : Schéma illustrant la structure histologique de l'intestin	23
Figure 6 : Coupe histologique d'intestin humain (X200).	24
Figure 7 : Coupe de microscopie électronique.....	25
Figure 8 : Schéma de villosité intestinale avec les cellules souches épithéliales.	26
Figure 9 : Coupe intestinale à l'hématoxyéosine chez le cochon.....	27
Figure 10 : Diagramme schématique illustrant les diverses projections nerveuses.....	28
Figure 11 : Diagramme des connexions neuronales.....	29
Figure 12 : Exemple de circuit neuronal.	30
Figure 13 : Coupe des microvillosités intestinales en microscopie électronique.	31
Figure 14 : Représentation schématique des couches de mucus.....	32
Figure 15 : Représentation schématique de la sténose intestinale.....	35
Figure 16 : Classification des atrésies jéjuno-iléales selon <i>Grosfeld</i> [57]	35
Figure 17 : Modèle murin d'atrésie jéjuno iléale	41
Figure 18 : Différentes étapes de différenciation des cellules issues du SNE.	42
Figure 19 : Photo macroscopique du prélèvement intestinal à ED21	54
Figure 20 : Schématisation de l'atrésie et protocole de prélèvement	55
Figure 21 : Schématisation de la surface d'absorption intestinale.....	62
Figure 22 : Résultats morphométriques.	64
Figure 23 : Résultats de la surface d'absorption	65
Figure 24 : Résultats de l'analyse globale transcriptomique : cinétique	67
Figure 25 : Résultats globaux de la transcriptomique : proximal/ distal	68
Figure 26 : Principaux marqueurs des cellules du SNE	70
Figure 27 : Diagramme illustrant le résultat transcriptomique de PGP9.5.....	71
Figure 28 : Résultats d'expression génique des marqueurs du SNE en RT-PCRq.	75
Figure 29 : Résultats IHC des marqueurs du SNE sur des rats témoins.....	76
Figure 30 : Résultats IHC des marqueurs du SNE sur des rats ligaturés	77
Figure 31 : Etude quantitative des ganglions nerveux du SNE	78
Figure 32 : Clichés de microscopie électronique	79
Figure 33 : Clichés de microscopie électronique sur fœtus témoins E21.....	79
Figure 34 : Clichés de microscopie électronique sur les intestins d'amont.....	80
Figure 35 : Clichés de microscopie électronique sur les intestins d'aval.....	81
Figure 36 : Expression génique par transcriptomique de la somatostatine.....	83
Figure 37 : Résultats d'expression génique des marqueurs du SE en RT-PCRq.....	85

Figure 38 : Résultats d'expression génique des marqueurs du SE en RT-PCRq.....	86
Figure 39 : Résultats d'expression génique des marqueurs	87
Figure 40 : Résultats d'expression génique des enzymes digestives en RT-PCRq	88
Figure 41 : Résultats par RT-PCRq des constituants de la barrière	90
Figure 42 : Résultats par RT-PCRq des agents antibactériens	92
Figure 43 : Numération des cellules caliciformes par coloration PAS	93
Figure 44 : Microscopie électronique sur des entérocytes à E18.....	94
Figure 45 : Microscopie électronique sur des entérocytes à E21.....	95
Figure 46 : Microscopie électronique sur des entérocytes à E21.....	95
Figure 47 : Ultrastructure en microscopie électronique des entérocytes en amont	96
Figure 48 : Ultrastructure en microscopie électronique des entérocytes en aval	97
Figure 49 : Ultrastructure en microscopie électronique sur des cellules caliciformes...	97
Figure 50 : Ultrastructure en microscopie électronique de la musculature.....	98
Figure 51 : Etude des ganglions nerveux entériques chez l'atrésie humaine.....	100
Figure 52 : Etude des cellules endocrines chez l'atrésie humaine.	101
Figure 53 : Schématisation du circuit neuroendocrinien dans la pression lumenale ...	107
Figure 54 : Récapitulatif des hypothèses dans le modèle d'interruption digestive	109

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Facteurs trophiques et de maturation pour la maturation digestive	22
Tableau 2: Tableau récapitulatif des gènes et de leurs amorces.....	58
Tableau 3: Tableau récapitulatif des références des anticorps utilisés.....	60
Tableau 4: Tableau récapitulatif des mesures.....	64
Tableau 5: Etude transcriptomique globale: résultats des témoins.....	66
Tableau 6: Etude des plus grands écarts entre segment d'amont et d'aval.....	69
Tableau 7: Etude transcriptomique ciblée sur le SNE.....	71
Tableau 8: Etude transcriptomique cinétique des crêtes neurales.	72
Tableau 9: Etude transcriptomique cinétique ciblée sur les marqueurs des cellules nerveuses.....	73
Tableau 10: Etude transcriptomique des cellules nerveuses.	74
Tableau 11: Etude transcriptomique cinétique ciblée sur les marqueurs des sous types de neurones	74
Tableau 12: Etude transcriptomique cinétique ciblée sur les marqueurs des cellules endocrines	75
Tableau 13: Etude transcriptomique ciblée sur les marqueurs du SE et du SNE.....	82
Tableau 14: Etude transcriptomique ciblée sur les récepteurs du SE	84
Tableau 15: Expression génique des enzymes digestives par transcriptomique.....	88
Tableau 16: Expression génique des constituants de la barrière	89
Tableau 17: Expression génique des agents antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth.....	90
Tableau 18: Expression génique des agents antimicrobiens sécrétés par les cellules M	91
Tableau 19: Expression génique des marqueurs de maturation intestinale	99

BIBLIOGRAPHIE

1. Hemming V, Rankin J: **Small intestinal atresia in a defined population: occurrence, prenatal diagnosis and survival.** *Prenat Diagn* 2007, **27**(13):1205-1211.
2. Celli J: **Genetics of gastrointestinal atresias.** *Eur J Med Genet* 2014, **57**(8):424-439.
3. Goyal RK, Hirano I: **The enteric nervous system.** *N Engl J Med* 1996, **334**(17):1106-1115.
4. Ramachandran P, Vincent P, Ganesh S, Sridharan S: **Morphological abnormalities in the innervation of the atretic segment of bowel in neonates with intestinal atresia.** *Pediatr Surg Int* 2007, **23**(12):1183-1186.
5. Kapur RP: **Developmental disorders of the enteric nervous system.** *Gut* 2000, **47** Suppl 4:iv81-83; discussion iv87.
6. Paran TS, Rolle U, Puri P: **Enteric nervous system and developmental abnormalities in childhood.** *Pediatr Surg Int* 2006, **22**(12):945-959.
7. larsen: **Embryologie humaine**, 2ème édition edn: de boeck; 2007.
8. Andrew A, Kramer B, Rawdon BB: **The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells--the last word?** *The Journal of pathology* 1998, **186**(2):117-118.
9. Gunawardene AR, Corfe BM, Staton CA: **Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract.** *International journal of experimental pathology* 2011, **92**(4):219-231.
10. Roth KA, Kim S, Gordon JI: **Immunocytochemical studies suggest two pathways for enteroendocrine cell differentiation in the colon.** *The American journal of physiology* 1992, **263**(2 Pt 1):G174-180.
11. Obermayr F, Hotta R, Enomoto H, Young HM: **Development and developmental disorders of the enteric nervous system.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2013, **10**(1):43-57.
12. Hao MM, Bornstein JC, Vanden Berghe P, Lomax AE, Young HM, Foong JP: **The emergence of neural activity and its role in the development of the enteric nervous system.** *Developmental biology* 2013, **382**(1):365-374.
13. Lake JI, Heuckeroth RO: **Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013, **305**(1):G1-24.
14. Sheaffer KL, Kaestner KH: **Transcriptional networks in liver and intestinal development.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012, **4**(9):a008284.
15. Takashima S, Hartenstein V: **Genetic control of intestinal stem cell specification and development: a comparative view.** *Stem Cell Rev* 2012, **8**(2):597-608.

16. Good M, Siggers RH, Sodhi CP, Afrazi A, Alkhudari F, Egan CE, Neal MD, Yazji I, Jia H, Lin J *et al*: **Amniotic fluid inhibits Toll-like receptor 4 signaling in the fetal and neonatal intestinal epithelium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(28):11330-11335.
17. Chalazonitis A, Tang AA, Shang Y, Pham TD, Hsieh I, Setlik W, Gershon MD, Huang EJ: **Homeodomain interacting protein kinase 2 regulates postnatal development of enteric dopaminergic neurons and glia via BMP signaling.** *J Neurosci* 2011, **31**(39):13746-13757.
18. Chalazonitis A, Pham TD, Rothman TP, DiStefano PS, Bothwell M, Blair-Flynn J, Tessarollo L, Gershon MD: **Neurotrophin-3 is required for the survival-differentiation of subsets of developing enteric neurons.** *J Neurosci* 2001, **21**(15):5620-5636.
19. Denjean C: **Le ventre, notre deuxième cerveau.** In. Arte; 2017.
20. Rebeihi A: **L'intestin notre deuxième cerveau.** In.: France Inter; 2017.
21. Trahair JF, Sangild PT: **Systemic and luminal influences on the perinatal development of the gut.** *Equine veterinary journal Supplement* 1997(24):40-50.
22. Hirai C, Ichiba H, Saito M, Shintaku H, Yamano T, Kusuda S: **Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells.** *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2002, **34**(5):524-528.
23. Juul SE, Joyce AE, Zhao Y, Ledbetter DJ: **Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates.** *Pediatr Res* 1999, **46**(3):263-268.
24. Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD: **Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus.** *Early human development* 1998, **52**(3):235-249.
25. Ledbetter DJ, Juul SE: **Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight.** *J Pediatr Surg* 2000, **35**(2):178-181; discussion 182.
26. Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y, DeMarco V: **Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine.** *Gut* 2001, **49**(2):182-189.
27. Juul SE, Christensen RD: **Absorption of enteral recombinant human erythropoietin by neonates.** *The Annals of pharmacotherapy* 2003, **37**(6):782-786.
28. Davis LE, Widness JA, Brace RA: **Renal and placental secretion of erythropoietin during anemia or hypoxia in the ovine fetus.** *American journal of obstetrics and gynecology* 2003, **189**(6):1764-1770.
29. Brace RA, Cheung CY, Davis LE, Gagnon R, Harding R, Widness JA: **Sources of amniotic fluid erythropoietin during normoxia and hypoxia in fetal sheep.** *American journal of obstetrics and gynecology* 2006, **195**(1):246-254.
30. Mikovic Z, Mandic V, Parovic V, Bogavac M, Simin N: **Erythropoietin in amniotic fluid as a potential marker in distinction between growth restricted and constitutionally small fetuses.** *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 2014, **27**(11):1134-1137.
31. Longaker MT, Peled ZM, Chang J, Krummel TM: **Fetal wound healing: progress report and future directions.** *Surgery* 2001, **130**(5):785-787.

32. Hill DR, Rho HK, Kessler SP, Amin R, Homer CR, McDonald C, Cowman MK, de la Motte CA: **Human milk hyaluronan enhances innate defense of the intestinal epithelium.** *J Biol Chem* 2013, **288**(40):29090-29104.
33. Gersting JA, Kotto-Kome CA, Du Y, Christensen RD, Calhoun DA: **Bioavailability of granulocyte colony-stimulating factor administered enterally to suckling mice.** *Pharmacological research* 2003, **48**(6):643-647.
34. Kimble RM, Breier BH, Gluckman PD, Harding JE: **Enteral IGF-I enhances fetal growth and gastrointestinal development in oesophageal ligated fetal sheep.** *The Journal of endocrinology* 1999, **162**(2):227-235.
35. Pillai SB, Hinman CE, Luquette MH, Nowicki PT, Besner GE: **Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor protects rat intestine from ischemia/reperfusion injury.** *The Journal of surgical research* 1999, **87**(2):225-231.
36. Michalsky MP, Lara-Marquez M, Chun L, Besner GE: **Heparin-binding EGF-like growth factor is present in human amniotic fluid and breast milk.** *J Pediatr Surg* 2002, **37**(1):1-6.
37. Watkins DJ, Yang J, Matthews MA, Besner GE: **Synergistic effects of HB-EGF and mesenchymal stem cells in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion injury.** *J Pediatr Surg* 2013, **48**(6):1323-1329.
38. Watkins DJ, Zhou Y, Chen CL, Darbyshire A, Besner GE: **Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor protects mesenchymal stem cells.** *The Journal of surgical research* 2012, **177**(2):359-364.
39. Ozgenel GY, Filiz G: **Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats.** *Journal of neurosurgery* 2003, **98**(2):371-377.
40. Obata Y, Pachnis V: **The Effect of Microbiota and the Immune System on the Development and Organization of the Enteric Nervous System.** *Gastroenterology* 2016, **151**(5):836-844.
41. **Codex Virtualis.** In.; 2017.
42. Bohorquez DV, Samsa LA, Roholt A, Medicetty S, Chandra R, Liddle RA: **An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy.** *PLoS One* 2014, **9**(2):e89881.
43. Peterson LW, Artis D: **Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis.** *Nature reviews Immunology* 2014, **14**(3):141-153.
44. Abramovic M, Radenkovic G, Velickov A: **Appearance of interstitial cells of Cajal in the human midgut.** *Cell and tissue research* 2014, **356**(1):9-14.
45. Uesaka T, Young HM, Pachnis V, Enomoto H: **Development of the intrinsic and extrinsic innervation of the gut.** *Developmental biology* 2016, **417**(2):158-167.
46. Brierley SM, Linden DR: **Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2014, **11**(10):611-627.
47. Furness JB: **Types of neurons in the enteric nervous system.** *Journal of the autonomic nervous system* 2000, **81**(1-3):87-96.

48. Rao M, Gershon MD: **The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2016, **13**(9):517-528.
49. images G: **Glycocalyx and brush border.** In.; 2017.
50. Kim YS, Ho SB: **Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress.** *Current gastroenterology reports* 2010, **12**(5):319-330.
51. van Putten JPM, Strijbis K: **Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer.** *Journal of innate immunity* 2017, **9**(3):281-299.
52. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF: **Intestinal barrier in inflammatory bowel disease.** *World journal of gastroenterology* 2014, **20**(5):1165-1179.
53. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I: **Functional food science and gastrointestinal physiology and function.** *The British journal of nutrition* 1998, **80** Suppl 1:S147-171.
54. Walker K, Badawi N, Hamid CH, Vora A, Halliday R, Taylor C, Shi E, Roy GT, Simpson E, Holland AJ: **A population-based study of the outcome after small bowel atresia/stenosis in New South Wales and the Australian Capital Territory, Australia, 1992-2003.** *J Pediatr Surg* 2008, **43**(3):484-488.
55. Joshi SB, Kinhal V, Desai M, Tilak, Choudhari FU: **A Rare Case of Jejunal Atresia Due to Intrauterine Intussusception.** *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2015, **9**(9):PD30-31.
56. Shalkow J: **Small intestine atresia.** In.; 2017.
57. Grosfeld JL, Ballantine TV, Shoemaker R: **Operative mangement of intestinal atresia and stenosis based on pathologic findings.** *J Pediatr Surg* 1979, **14**(3):368-375.
58. Spitz L CA: **Duodenoduodenostomy.** In: *Pediatric Surgery*. 5th Edition edn. Edited by L S. London: Spitz Editor: Chapman and Hall Medical; 1995.
59. Rescorla FJ, Grosfeld JL: **Intestinal atresia and stenosis: analysis of survival in 120 cases.** *Surgery* 1985, **98**(4):668-676.
60. Fischer RT, Friend B, Talmon GA, Grant WJ, Quiros-Tejeira RE, Langanas AN, Coccia PF: **Intestinal transplantation in children with multiple intestinal atresias and immunodeficiency.** *Pediatric transplantation* 2014, **18**(2):190-196.
61. Notarangelo LD: **Multiple intestinal atresia with combined immune deficiency.** *Current opinion in pediatrics* 2014, **26**(6):690-696.
62. Ein SH, Shandling B: **The late nonfunctioning duodenal atresia repair.** *J Pediatr Surg* 1986, **21**(9):798-801.
63. Sakaguchi T, Hamada Y, Masumoto K, Taguchi T: **Segmental dilatation of the intestine: results of a nationwide survey in Japan.** *Pediatr Surg Int* 2015, **31**(11):1073-1076.
64. Paterson-Brown S, Stalewski H, Brereton RJ: **Neonatal small bowel atresia, stenosis and segmental dilatation.** *The British journal of surgery* 1991, **78**(1):83-86.

65. Gupta S, Gupta R, Ghosh S, Gupta AK, Shukla A, Chaturvedi V, Mathur P: **Intestinal Atresia: Experience at a Busy Center of North-West India.** *Journal of neonatal surgery* 2016, **5**(4):51.
66. Dolk H: **Methylene blue and atresia or stenosis of ileum and jejunum.** **EUROCAT Working Group.** *Lancet* 1991, **338**(8773):1021-1022.
67. Nusinovich Y, Revenis M, Torres C: **Long-term outcomes for infants with intestinal atresia studied at Children's National Medical Center.** *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2013, **57**(3):324-329.
68. J. Goujard DV: **Atrésies de l'intestin grêle dans 19 registres eurocat.** Paris, France; 1981-1992.
69. Boureau M: **Les atrésies intestinales:** Gastroentérologie pédiatrique; 1986.
70. Newmn K: **Jejunioleal atresia.** In: *Surgery of Infants and Children.* edn. Edited by KTO: Philadelphia-New York: Lippincot-Raven; 1997: 1193-1200.
71. Hukkinen M, Kivisaari R, Koivusalo A, Pakarinen MP: **Risk factors and outcomes of tapering surgery for small intestinal dilatation in pediatric short bowel syndrome.** *J Pediatr Surg* 2017, **52**(7):1121-1127.
72. Hukkinen M, Kivisaari R, Merras-Salmio L, Koivusalo A, Pakarinen MP: **Small Bowel Dilatation Predicts Prolonged Parenteral Nutrition and Decreased Survival in Pediatric Short Bowel Syndrome.** *Annals of surgery* 2017, **266**(2):369-375.
73. Haller JA, Jr., Tepas JJ, Pickard LR, Shermeta DW: **Intestinal atresia. Current concepts of pathogenesis, pathophysiology, and operative management.** *The American surgeon* 1983, **49**(7):385-391.
74. Muller F, Dommergues M, Ville Y, Lewin F, Delvalez-Morichon N, Nihoul-Fekete C, Bargy F, Dumez Y, Boue A: **Amniotic fluid digestive enzymes: diagnostic value in fetal gastrointestinal obstructions.** *Prenat Diagn* 1994, **14**(10):973-979.
75. Alshehri A, Emil S, Laberge JM, Skarsgard E: **Outcomes of early versus late intestinal operations in patients with gastroschisis and intestinal atresia: results from a prospective national database.** *J Pediatr Surg* 2013, **48**(10):2022-2026.
76. Schurink M, Hulscher JB, Nieuwenhuijs VB, Heineman E, Rings EH: **A surgical perspective of the outcome of a multidisciplinary intestinal rehabilitation program for children with short bowel syndrome in The Netherlands.** *Transplantation proceedings* 2014, **46**(6):2102-2108.
77. Masumoto K, Suita S, Nada O, Taguchi T, Guo R: **Abnormalities of enteric neurons, intestinal pacemaker cells, and smooth muscle in human intestinal atresia.** *J Pediatr Surg* 1999, **34**(10):1463-1468.
78. Watanabe Y, Ando H, Seo T, Katsuno S, Marui Y, Horisawa M: **Two-dimensional alterations of myenteric plexus in jejunioleal atresia.** *J Pediatr Surg* 2001, **36**(3):474-478.
79. Khen N, Jaubert F, Sauvat F, Fourcade L, Jan D, Martinovic J, Vekemans M, Landais P, Brousse N, Leborgne M *et al*: **Fetal intestinal obstruction induces alteration of enteric nervous system development in human intestinal atresia.** *Pediatr Res* 2004, **56**(6):975-980.

80. Ozguner IF, Savas C, Ozguner M, Candir O: **Intestinal atresia with segmental musculature and neural defect.** *J Pediatr Surg* 2005, **40**(8):1232-1237.
81. Wang X, Yuan C, Xiang L, Li X, Zhao Z, Jin X: **The clinical significance of pathological studies of congenital intestinal atresia.** *J Pediatr Surg* 2013, **48**(10):2084-2091.
82. Gfroerer S, Metzger R, Fiegel H, Ramachandran P, Rolle U: **Differential changes in intrinsic innervation and interstitial cells of Cajal in small bowel atresia in newborns.** *World journal of gastroenterology* 2010, **16**(45):5716-5721.
83. Khen-Dunlop N, Sarnacki S, Victor A, Grosos C, Menard S, Soret R, Goudin N, Poussot M, Sauvat F, Revillon Y *et al*: **Prenatal intestinal obstruction affects the myenteric plexus and causes functional bowel impairment in fetal rat experimental model of intestinal atresia.** *PLoS One* 2013, **8**(5):e62292.
84. Fourcade LM, Mousseau Y, Sauvat F, Khen-Dunlop N, Cerf-Bensussan N, Sarnacki S, Sturtz FG: **A new rat model of prenatal bowel obstruction: development and early assessment.** *J Pediatr Surg* 2010, **45**(3):499-506.
85. L.Fourcade: **Mécanismes physiopathologiques responsables des troubles de la motilité intestinale étudiés sur 2 modèles expérimentaux d'atrédies intestinales chez le rat.** Limoges: Limoges; 2008.
86. Moore SW, Laing D, Melis J, Cywes S: **Secondary effects of prolonged intestinal obstruction on the enteric nervous system in the rat.** *J Pediatr Surg* 1993, **28**(9):1196-1199.
87. Fourcade L, Mousseau Y, Jaubert F, Sturtz FG: **Myenteric plexus alterations downstream from a prenatal intestinal obstruction in a rat model.** *Neurosci Lett* 2009, **461**(2):126-130.
88. Chang IY, Glasgow NJ, Takayama I, Horiguchi K, Sanders KM, Ward SM: **Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction.** *The Journal of physiology* 2001, **536**(Pt 2):555-568.
89. Schoenberg RA, Kluth D: **Experimental small bowel obstruction in chick embryos: Effects on the developing enteric nervous system.** *J Pediatr Surg* 2002, **37**(5):735-740.
90. Baglaj SM, Czernik J, Kuryszko J, Kurooka P: **Natural history of experimental intestinal atresia: morphologic and ultrastructural study.** *J Pediatr Surg* 2001, **36**(9):1428-1434.
91. Fiegel HC, Schonberg RA, Roth B, Grasshoff S, Kluth D: **Submucosal plexus of dilated gut disappears after ligation in chicken embryos: preliminary results.** *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery [et al] = Zeitschrift für Kinderchirurgie* 2006, **16**(6):407-410.
92. Parisi Salvi E, Vaccaro R, Baglaj SM, Renda T: **Nervous system development in normal and atresic chick embryo intestine: an immunohistochemical study.** *Anatomy and embryology* 2004, **209**(2):143-151.
93. Vaccaro R, Parisi Salvi E, Nofroni I, D'Este I, Baglaj SM, Renda T: **Endocrine cells in atresic chick embryo intestine: histochemical and immunohistochemical study.** *European journal of histochemistry : EJH* 2009, **53**(3):143-150.
94. von Sochaczewski CO, Wenke K, Grieve A, Westgarth-Taylor C, Loveland JA, Metzger R, Kluth D: **Regenerative capacity of the enteric nervous system: is immaturity defining the point of no return?** *The Journal of surgical research* 2016, **209**:112-121.

95. von Sochaczewski CO, Wenke K, Metzger RP, Loveland JA, Westgarth-Taylor C, Kluth D: **Reversible small bowel obstruction in the chicken foetus.** *African journal of paediatric surgery : AJPS* 2015, **12**(1):12-17.
96. Touloukian RJ: **Antenatal intestinal adaptation with experimental jejunoileal atresia.** *J Pediatr Surg* 1978, **13**(6):468-474.
97. Tepas JJ, Wyllie RG, Shermeta DW, Inon AE, Pickard LR, Haller JA, Jr.: **Comparison of histochemical studies of intestinal atresia in the human newborn and fetal lamb.** *J Pediatr Surg* 1979, **14**(3):376-380.
98. Trahair JF, Rodgers HF, Cool JC, Ford WD: **Altered intestinal development after jejunal ligation in fetal sheep.** *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology* 1993, **423**(1):45-50.
99. Doolin EJ, Ormsbee HS, Hill JL: **Motility abnormality in intestinal atresia.** *J Pediatr Surg* 1987, **22**(4):320-324.
100. Pickard LR, Santoro S, Wyllie RG, Haller JA, Jr.: **Histochemical studies of experimental fetal intestinal obstruction.** *J Pediatr Surg* 1981, **16**(3):256-260.
101. Fourcade L, Shima H, Miyazaki E, Puri P: **Multiple gastrointestinal atresias result from disturbed morphogenesis.** *Pediatr Surg Int* 2001, **17**(5-6):361-364.
102. Knowles CH, Martin JE: **New techniques in the tissue diagnosis of gastrointestinal neuromuscular diseases.** *World journal of gastroenterology* 2009, **15**(2):192-197.
103. De Giorgio R, Cogliandro RF, Barbara G, Corinaldesi R, Stanghellini V: **Chronic intestinal pseudo-obstruction: clinical features, diagnosis, and therapy.** *Gastroenterology clinics of North America* 2011, **40**(4):787-807.
104. Yang JJ, Ma YL, Zhang P, Chen HQ, Liu ZH, Qin HL: **Histidine decarboxylase is identified as a potential biomarker of intestinal mucosal injury in patients with acute intestinal obstruction.** *Mol Med* 2011, **17**(11-12):1323-1337.
105. Xia ZQ, Ding DK, Zhang N, Wang JX, Yang HY, Zhang D: **MicroRNA-211 causes ganglion cell dysplasia in congenital intestinal atresia via down-regulation of glial-derived neurotrophic factor.** *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2016, **28**(2):186-195.
106. Tander B, Bicakci U, Sullu Y, Rizalar R, Ariturk E, Bernay F, Kandemir B: **Alterations of Cajal cells in patients with small bowel atresia.** *J Pediatr Surg* 2010, **45**(4):724-728.
107. Farge E: **Mechanotransduction in development.** *Current topics in developmental biology* 2011, **95**:243-265.
108. Cheng H, Leblond CP: **Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types.** *The American journal of anatomy* 1974, **141**(4):537-561.
109. Rehfeld JF: **The new biology of gastrointestinal hormones.** *Physiological reviews* 1998, **78**(4):1087-1108.
110. May CL, Kaestner KH: **Gut endocrine cell development.** *Molecular and cellular endocrinology* 2010, **323**(1):70-75.

111. Barker N, van de Wetering M, Clevers H: **The intestinal stem cell.** *Genes & development* 2008, **22**(14):1856-1864.
112. Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB: **Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells.** *Endocrinology* 2004, **145**(6):2639-2644.
113. Romanoff A: **The avian embryo : structural and functional developpment.** In., Yhe MacMillan Compagny edn.: NY; 1960: 430-531.
114. Kim M, Javed NH, Yu JG, Christofi F, Cooke HJ: **Mechanical stimulation activates Galphaq signaling pathways and 5-hydroxytryptamine release from human carcinoid BON cells.** *The Journal of clinical investigation* 2001, **108**(7):1051-1059.
115. Wang F, Knutson K, Alcaino C, Linden DR, Gibbons SJ, Kashyap P, Grover M, Oeckler R, Gottlieb PA, Li HJ *et al*: **Mechanosensitive ion channel Piezo2 is important for enterochromaffin cell response to mechanical forces.** *The Journal of physiology* 2017, **595**(1):79-91.
116. Nakatani M, Maksimovic S, Baba Y, Lumpkin EA: **Mechanotransduction in epidermal Merkel cells.** *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2015, **467**(1):101-108.
117. Gershon MD, Tack J: **The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders.** *Gastroenterology* 2007, **132**(1):397-414.
118. Mawe GM, Hoffman JM: **Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2013, **10**(8):473-486.
119. Gershon MD: **Serotonin is a sword and a shield of the bowel: serotonin plays offense and defense.** *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2012, **123**:268-280; discussion 280.
120. Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE: **5-HT7 receptors: current knowledge and future prospects.** *Trends in pharmacological sciences* 2000, **21**(2):70-77.
121. Latorre R, Sternini C, De Giorgio R, Greenwood-Van Meerveld B: **Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication.** *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2016, **28**(5):620-630.
122. Bohorquez DV, Shahid RA, Erdmann A, Kreger AM, Wang Y, Calakos N, Wang F, Liddle RA: **Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells.** *The Journal of clinical investigation* 2015, **125**(2):782-786.
123. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A: **Gut/brain axis and the microbiota.** *The Journal of clinical investigation* 2015, **125**(3):926-938.
124. Furness JB, Rivera LR, Cho HJ, Bravo DM, Callaghan B: **The gut as a sensory organ.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2013, **10**(12):729-740.
125. Tsubouchi S, Leblond CP: **Migration and turnover of entero-endocrine and caveolated cells in the epithelium of the descending colon, as shown by radioautography after continuous infusion of 3H-thymidine into mice.** *The American journal of anatomy* 1979, **156**(4):431-451.
126. Worthington JJ: **The intestinal immunoendocrine axis: novel cross-talk between enteroendocrine cells and the immune system during infection and inflammatory disease.** *Biochemical Society transactions* 2015, **43**(4):727-733.

127. Harrison E, Lal S, McLaughlin JT: **Enteroendocrine cells in gastrointestinal pathophysiology.** *Current opinion in pharmacology* 2013, **13**(6):941-945.
128. Lomax AE, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA: **Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits.** *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 2006, **126-127**:250-257.
129. El-Salhy M, Gundersen D, Ostgaard H, Lomholt-Beck B, Hatlebakk JG, Hausken T: **Low densities of serotonin and peptide YY cells in the colon of patients with irritable bowel syndrome.** *Digestive diseases and sciences* 2012, **57**(4):873-878.
130. Martin GR, Wallace LE, Hartmann B, Holst JJ, Demchyshyn L, Toney K, Sigalet DL: **Nutrient-stimulated GLP-2 release and crypt cell proliferation in experimental short bowel syndrome.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, **288**(3):G431-438.
131. Stephens RL, Tache Y: **Intracisternal injection of a TRH analogue stimulates gastric luminal serotonin release in rats.** *The American journal of physiology* 1989, **256**(2 Pt 1):G377-383.
132. Yang H, Stephens RL, Tache Y: **TRH analogue microinjected into specific medullary nuclei stimulates gastric serotonin secretion in rats.** *The American journal of physiology* 1992, **262**(2 Pt 1):G216-222.
133. Stilling RM, Bordenstein SR, Dinan TG, Cryan JF: **Friends with social benefits: host-microbe interactions as a driver of brain evolution and development?** *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2014, **4**:147.
134. Iyer LM, Aravind L, Coon SL, Klein DC, Koonin EV: **Evolution of cell-cell signaling in animals: did late horizontal gene transfer from bacteria have a role?** *Trends in genetics : TIG* 2004, **20**(7):292-299.
135. Borre YE, O'Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF: **Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders.** *Trends in molecular medicine* 2014, **20**(9):509-518.
136. Schaart MW, Yamanouchi T, van Nispen DJ, Raatgeep RH, van Goudoever JB, de Krijger RR, Tibboel D, Einerhand AW, Renes IB: **Does small intestinal atresia affect epithelial protein expression in human newborns?** *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2006, **43**(5):576-583.
137. Serrano J, Esahli H, Larsson L, Zetterstrom R: **Experimental intestinal obstruction in rats. Studies on structure and disaccharidase activities.** *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie* 1991, **1**(2):92-96.
138. Groot J, Bijlsma P, Van Kalker A, Kiliaan A, Saunders P, Perdue M: **Stress-induced decrease of the intestinal barrier function. The role of muscarinic receptor activation.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000, **915**:237-246.
139. Keita AV, Soderholm JD: **The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors.** *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2010, **22**(7):718-733.
140. Soderholm JD, Perdue MH: **Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, **280**(1):G7-G13.

141. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF *et al*: **Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders**. *Cell* 2013, **155**(7):1451-1463.
142. Gersemann M, Wehkamp J, Stange EF: **Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease**. *Journal of internal medicine* 2012, **271**(5):421-428.
143. Auber F, Danzer E, Noche-Monnery ME, Sarnacki S, Trugnan G, Boudjemaa S, Audry G: **Enteric nervous system impairment in gastroschisis**. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie* 2013, **23**(1):29-38.
144. Westfal ML, Goldstein AM: **Pediatric enteric neuropathies: diagnosis and current management**. *Current opinion in pediatrics* 2017, **29**(3):347-353.
145. Lisowska-Myjak B, Skarzynska E, Bakun M: **Meconium proteins as a source of biomarkers for the assessment of the intrauterine environment of the fetus**. *Journal of developmental origins of health and disease* 2018:1-9.
146. Walter-Nicolet E, Rousseau V, Kieffer F, Fusaro F, Bourdaud N, Oucherif S, Benachi A, Sarnacki S, Mitanchez D: **Neonatal outcome of gastroschisis is mainly influenced by nutritional management**. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2009, **48**(5):612-617.
147. Ballouhey Q, Richard L, Fourcade L, Ben Rhaiem I, Vallat JM, Sturtz F, Bourthoumieu S: **Involvement of the enteroendocrine system in intestinal obstruction**. *PLoS One* 2017, **12**(11):e0186507.

RESUMES

Etude de la paroi intestinale dans un modèle murin d'interruption intestinale: focus sur le système nerveux entérique et du système neuroendocrine

But de l'étude

L'atrésie intestinale est une anomalie congénitale définie par une perte de la continuité digestive. Malgré une restauration chirurgicale précoce de cette continuité, surviennent durant les premiers mois de vie des troubles de la motilité digestive et des surinfections bactériennes chez un tiers des patients. Ces troubles fonctionnels étaient attribués jusque là principalement à des altérations du système nerveux entérique. Le but de cette étude était de confirmer cette hypothèse mais également d'élargir le champ des explorations aux autres composants du tube digestif.

Matériel et méthodes

Le modèle animal de l'atrésie chez le rat initialement décrit dans notre équipe a été utilisé pour caractériser les anomalies d'expression génique par transcriptomique. L'étude portait également sur la maturation digestive chez des fœtus de rat contrôle entre un stade de développement embryonnaire E15 et E21. Des modifications en amont et en aval de l'obstruction ont été étudiées en prélevant deux segments successifs de 1 cm par cette approche globale transcriptomique puis précisées par RT-PCRq et confirmées par des techniques immunohistochimiques et de microscopie électronique.

Résultats

Chez les fœtus témoins, l'expression génique montre une décroissance physiologique pour le SNE et une augmentation pour les systèmes neuroendocrine et épithélial de E15 à E21. Concernant les fœtus avec atrésie, les modifications concernent quasi exclusivement le segment d'amont avec une augmentation du calibre intestinal, de l'épaisseur musculaire et une accélération globale de la maturation. Une redistribution des sous types neuronaux est constatée dans le segment d'amont ainsi qu'une augmentation de l'expression du système neuro endocrine. Pour ces deux systèmes, le segment d'aval est peu modifié. Des modifications importantes du système épithélial sont observées en amont comme en aval avec pour conséquence probable une altération de la barrière intestinale et du système anti infectieux.

Conclusion

Ces résultats montrent que les changements prédominent dans le segment en amont de l'atrésie alors que le segment d'aval était parfois considéré comme le plus pathologique. De plus, il a été retrouvé des changements inattendus du système neuroendocrine et épithélial qui sous tendent une implication non exclusive du SNE. D'autres recherches sont nécessaires pour confirmer ces données et les exploiter dans une démarche thérapeutique.

Mots clés: atrésie intestinale, transcriptomique, système nerveux entérique, système entéroendocrine, modèle animal, épithélium, rat, fœtus.

Disorders of the intestinal wall in a rat model of intestinal obstruction: implication of the enteric nervous system and neuroendocrine system

Aim of the study

Intestinal atresia is a rare congenital affection with postoperative motility disorders, leading sometimes to death. Previous related studies mainly focused on enteric nervous system (ENS) alterations as it was identified to cause abnormal peristalsis. The aim of the study was to expertise the underlying pathological conditions of intestinal atresia using a global approach, before focusing on ENS and neuroendocrine cells in order to precise the presumptive involvement of the different layers of the intestinal wall.

Methods

Preliminary transcriptomic approach was elected to screen global gene expression involved in intestinal development and atresia-linked disorders in the rat model previously described by our team. Rat embryos were assigned to atretic group and controls embryos at different stages of development ED15, ED17, ED19 and ED21. Two successive intestine samples of 1 cm were harvested in the proximal segment and in the distal one. The pattern of gene expression was further assessed by immunohistochemistry, electron microscopy and RT-qPCR.

Main results

A physiological decrease in gene expression for enteric nervous system markers and an increase for neuroendocrine and epithelial system was observed on controls from stages ED15 to ED21. Regarding affected embryos, structural modifications concerned the proximal segment with increased muscular layer and a significant disruption including global accelerated maturation was observed in the proximal segment with increased gene expression of neuroendocrine system. Distal segment was comparable to controls for the two systems. Important modifications were noted concerning the epithelial system with consequent abnormalities of the gut barrier and anti infectious functions.

Conclusions

Fetal intestinal obstruction results in a disrupted gut development predominant in the proximal segment. The distal segment and the ENS were poorly concerned by theses changes. Neuroendocrine and epithelial cells underwent significant unexpected changes, supporting the evidence that ENS do not play an exclusive role in the pathways of intestinal motility disorders.

Keywords: intestinal atresia, transcriptome, enteric nervous system, endocrine cells, animal model, rat, fetus.