



HAL
open science

**Effet d'un retard de croissance intra-utérin sur la
prolifération et la différenciation des cellules
entéro-endocrines chez le rat. Master 1 Biologie Santé
TER (parcours Sciences Biologiques)**

Rose Meriaux

► **To cite this version:**

Rose Meriaux. Effet d'un retard de croissance intra-utérin sur la prolifération et la différenciation des cellules entéro-endocrines chez le rat. Master 1 Biologie Santé TER (parcours Sciences Biologiques). Alimentation et Nutrition. 2016. hal-02801767

HAL Id: hal-02801767

<https://hal.inrae.fr/hal-02801767v1>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Année universitaire
2015-2016

Master 1 Biologie Santé
parcours Sciences Biologiques
Rapport de TER

Rose Mériaux

Effet d'un retard de croissance intra-utérin sur la
prolifération et la différenciation des cellules entéro-
endocrines chez le rat.

Marième Ndjim, Gwenola Le Dréan

INRA - UMR 1280 Physiologie des adaptations
nutritionnelles (PhAN)

www.univ-nantes.fr



UNIVERSITÉ DE NANTES

SOMMAIRE

Abréviations	
Introduction.....	1
A. Contexte physiopathologique du retard de croissance intra-utérin	1
1. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU).....	1
2. Le concept du DOHaD	1
B. Le RCIU altère la régulation de la prise alimentaire.....	2
1. La régulation de la prise alimentaire à court-terme	2
2. La cholécystokinine : peptide clef de la satiété.....	2
3. Les cellules entéro-endocrines	2
4. La CCK chez le RCIU	3
C. Hypothèse et stratégie.....	3
Matériels et méthodes	4
A. Modèle de rats nés avec un RCIU	4
B. Modèle de rat transgénique CCK-GFP	4
C. Génotypage.....	5
D. Préparation des coupes et immunohistochimie	6
E. Microscopie à fluorescence et comptage.....	7
F. Mesure de l'expression de gènes par qRT-PCR.....	8
Résultats.....	10
A. Validation du modèle de rats transgéniques.....	10
B. Effet du RCIU sur la morphologie intestinale	11
C. Effet du RCIU sur les populations de CEE totales et de type I	12
1. Les cellules entéro-endocrines totales et de type I dans les villosités	13
2. Les cellules entéro-endocrines totales et de type I dans les cryptes	14
D. Effet du RCIU sur l'expression de marqueurs de différenciation	14
Conclusion et perspectives.....	16

ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

CEE : cellule-entéro endocrine

CCK : cholécystokinine

CgA : chromogranine A

CTRL : contrôle (rats nés sans retard de croissance intra-utérin)

DOHaD : developmental origins of health and disease, origine développementale de la santé et des maladies

EDTA : éthylène diamine tétraacétique

GIP : gastric inhibitory polypeptide

GFP : green fluorescent protein

Ngn3 : neurogénine 3

Pax6 : protein paired box 6

PCR : polymerase chain reaction

Pdx1 : pancreatic and duodenal homeobox 1

qPCR : PCR quantitative ou PCR en temps réel

RCIU : retard de croissance intra-utérin

RT : reverse transcription

TAE : tris acétate EDTA

TALEN : transcription activator-like effector nuclease

INTRODUCTION

A. Contexte physiopathologique du retard de croissance intra-utérin

1. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU)

Les enfants nés à terme avec un petit poids à la naissance (inférieur à 2,5 kg) en raison d'un retard de croissance intra-utérin constituent 8 % des nouveaux nés en France. La cause du RCIU est le plus souvent due à un défaut de transfert placentaire des nutriments, et notamment des acides aminés (Salam *et al.*, 2014).

Afin de leur assurer un rattrapage de croissance et un développement psychomoteur optimal, ces enfants sont nourris en routine avec des formules supplémentées en protéines. Cependant, selon la théorie de l'origine développementale de la santé et des maladies (developmental origin of health and disease, DOHaD), cette nutrition postnatale précoce pourrait s'avérer délétère à l'âge adulte, en augmentant le risque de développer des pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2 (Salam *et al.*, 2014).

2. Le concept du DOHaD

En se basant sur des études épidémiologiques, Barker a proposé qu'un petit poids à la naissance augmente le risque métabolique à l'âge adulte (Barker, 1990). De faibles ressources nutritionnelles induiraient l'apparition *in utero* d'un phénotype économe qui serait lié au poids de l'individu et serait délétère à l'âge adulte (Hales et Barker, 2001).

Cette hypothèse a donné lieu au DOHaD qui met en cause une altération de l'environnement nutritionnel à des périodes critiques du développement où l'organisme est plastique, comme durant la période périnatale (Khazipov et Luhmann, 2006) ou à l'adolescence (Crew *et al.*, 2007). Dans ces conditions, une « empreinte nutritionnelle » aussi appelée « programmation métabolique » peut se mettre en place, consistant en des modifications de la structure des organes et tissus (Desai *et al.*, 1996) qui modulent l'état de santé de l'individu à l'âge adulte.

En parallèle de la structure altérée des organes (Winick et Noble, 1996), il a été démontré chez le rat RCIU des dérégulations de la prise alimentaire (Coupé *et al.*, 2009 ; Orozco-Solis *et al.*, 2009) telles que c'est le cas dans le cadre de l'obésité (McMillen *et al.*, 2009).

B. Le RCIU altère la régulation de la prise alimentaire

1. La régulation de la prise alimentaire à court-terme

La régulation de la prise alimentaire à court terme, dite homéostatique, consiste à déclencher le rassasiement dès le début de la prise alimentaire, modulant la taille des repas et dans une moindre mesure leur fréquence, afin de maintenir la balance énergétique.

L'arrivée du bol alimentaire induit la distension gastrique et la détection des nutriments par des senseurs nutritionnels, déclenchant la sécrétion de peptides gastro-intestinaux par les cellules entéro-endocrines. Ces signaux sont intégrés *via* le nerf vague et le tronc cérébral vers l'hypothalamus qui initie la satiété par voie réflexe (Dockray, 2009). Parmi ces peptides on distingue notamment la cholécystokinine.

2. La cholécystokinine : peptide clef de la satiété

La cholécystokinine (CCK) est un peptide gastro-intestinal connu pour jouer un rôle clef dans le rassasiement, entre autres par l'inhibition de la vidange gastrique (Moran et McHugh, 1982). De plus, elle stimule la contraction de la vésicule biliaire (Liddle *et al.*, 1985) et la sécrétion d'enzymes pancréatiques (Harper et Raper, 1943). Elle est sécrétée par les cellules entéro-endocrines (CEE) et principalement les CEE de type I représentées majoritairement dans le duodénum proximal, en réponse aux acides gras à chaîne moyenne et longue ($C \geq 12$; Liou *et al.*, 2011).

3. Les cellules entéro-endocrines

L'épithélium de la muqueuse intestinale est composé de quatre types cellulaires majeurs, issus des mêmes cellules souches, et regroupés en deux grandes classes (*Figure 1.A*) selon leur fonction. Les cellules absorbatives comprennent les entérocytes. La lignée sécrétrice regroupe les cellules de Paneth, les cellules de Goblet et les cellules entéro-endocrines (CEE). La différenciation de ces cellules implique plusieurs gènes de différenciation (*Figure 1.B*).

Les CEE sont des régulatrices essentielles de la digestion, de l'appétit et du métabolisme énergétique. Elles constituent un des plus grands systèmes endocrine chez l'Homme : elles produisent et stockent des peptides gastro-intestinaux, qu'elles libèrent en réponse à des *stimuli* nutritionnels, on parle de « sensing nutritionnel ». Elles synthétisent plusieurs de ces peptides (cholécystokinine, GIP, ghréline...) mais

souvent l'un d'eux de façon majoritaire, qui définit leur type (Gunawardene *et al.*, 2011). Les CEE représentent environ 1% de la population épithéliale et sont disséminées tout au long du tractus gastro-intestinal, ce qui les rend difficiles à étudier.

4. La CCK chez le RCIU

Dans le cadre de nos études nous utilisons un modèle de rat né avec un RCIU obtenu par restriction protéique des mères pendant la gestation et la lactation. Ces rats développent à l'âge adulte une prédisposition aux pathologies métaboliques ainsi qu'une dérégulation de la prise alimentaire passant par une altération de la mise en place de la satiété. En effet les rats nés avec un RCIU sont résistants aux effets satiétogènes de la cholécystokinine. Cette résistance s'accompagne d'un défaut de régulation de la sécrétion de CCK dont la concentration plasmatique postprandiale reste élevée plus longtemps (pas de retour au niveau basal 2 h après le repas) chez le rat RCIU adulte (Poinignon *et al.*, 2014).

C. Hypothèse et stratégie

Au vu de ceci nous avons émis l'hypothèse que les défauts de mise en place de la satiété et de régulation de la sécrétion de CCK observés chez le rat RCIU pourraient être liés à une altération de la prolifération et/ou de la différenciation des CEE de type I sécrétrices de CCK. La maturation de l'intestin chez le rat se produisant entre la troisième semaine de gestation et les 15 premiers jours de vie, nous nous sommes posé la question d'une éventuelle programmation des CEE, et notamment des CEE sécrétrices de CCK, au cours de la période périnatale.

Afin de répondre à notre hypothèse nous avons développé un modèle de rat RCIU à partir de rats transgéniques exprimant la protéine fluorescente GFP sous le contrôle du promoteur de la CCK, afin de faciliter l'étude ces cellules très faiblement représentées dans l'épithélium. Nous avons caractérisé les CEE de type I chez le rat RCIU par rapport à des rats nés de poids normal en effectuant un dénombrement par rapport à la population totale des CEE dans le duodénum proximal, et en mesurant l'expression relative de marqueurs de différenciation exprimés par les progéniteurs endocrines précurseurs des CEE de type I (facteurs de transcription) et par les cellules différenciées (peptides gastro-intestinaux).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Modèle de rats nés avec un RCIU

À partir de rats transgéniques nous avons développé un modèle de rat RCIU, obtenu par restriction protéique isocalorique des mères pendant la gestation et la lactation. Les mères des rats RCIU sont nourries avec un régime (AB Diets, Hollande) comprenant 8% de protéines (contre 20% chez les contrôles), supplémenté en maltodextrine pour maintenir l'apport calorique au niveau de celui des contrôles. A partir du sevrage, les ratons reçoivent un régime standard (Safe A03, adapté pour la croissance).

Ce type de modèle obtenus par restriction protéique a été montré comme étant suffisant pour induire un retard de croissance intra-utérin avec des conséquences métaboliques chez les petits une fois à l'âge adulte (Snoeck *et al.*, 1990). Le nombre de petits par mère n'est pas affecté, seul leur poids est diminué.

B. Modèle de rat transgénique CCK-GFP

La transgénèse a été effectuée par la plateforme Biogenouest, TRIP (Transgénèse Rat et ImmunoPhénomique) à Nantes. La méthodologie TALEN (transcription activator-like effector nuclease) a été utilisée. Elle a consisté en l'insertion d'un transgène codant pour la GFP, sous le contrôle du promoteur de la CCK, au sein de la cassette Rosa26 à forte activité transcriptionnelle (*Figure 2*).

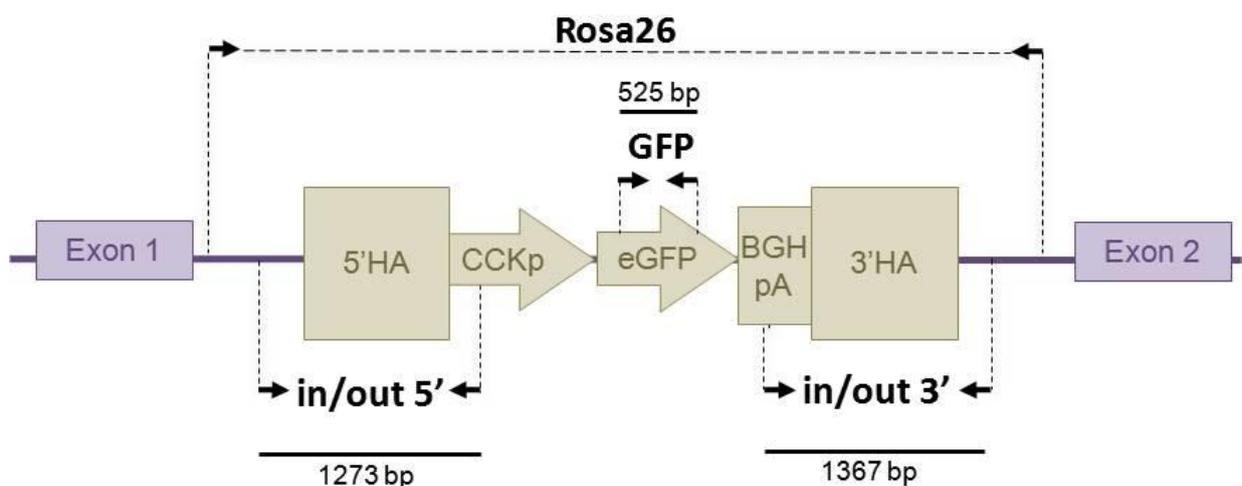


Figure 2. Schéma de la construction CCK-eGFP (transgène en brun), au sein du locus Rosa26 (en violet). Sont représentés les couples d'amorces utilisés pour les PCR de génotypage, ainsi que la taille des amplicons attendus.

Les rats transgéniques ont été accouplés de façon à obtenir un nombre assez important pour les répartir en deux groupes : les contrôles et les RCIU. Lors des analyses, nous avons travaillé uniquement sur des homozygotes afin d'optimiser la stabilité du phénotype et l'homogénéité des résultats.

C. Génotypage

Une biopsie à la queue a été effectuée sur les rats transgéniques contrôles et RCIU âgés de 35 jours. Les tissus ont été placés dans une solution de lyse (NaCl 0,2 M ; Tris 0,1 M pH 8,3 ; SDS 0,2 % ; EDTA 5 mM ; protéinase K (P8107S, Biolabs) 100 µg/mL) à 56°C pour la nuit. Le lysat a été utilisé comme matrice pour effectuer les PCR.

Pour chaque animal nous avons effectué trois PCR en utilisant les amorces (Eurofins, France) décrites dans le Tableau I, la polymérase Herculase (Agilent, France) et un thermocycleur CFX Connect (Bio-Rad). La PCR correspondant au couple « GFP » (5 min à 95°C ; 2 min à 64°C ; 30 cycles de 30 s à 72°C, 10 s à 98°C, 10 s à 62°C ; puis 3 min à 72°C ; 15 min 4°C) permet de contrôler que l'animal exprime bien la GFP.

La PCR « in/out » (5 min à 95°C ; 2 min à 64°C ; 30 cycles de 1 min à 72°C, 30 s à 98°C, 30 s à 62°C ; puis 3 min à 72°C ; 15 min 4°C) est subdivisée en deux réactions (« in/out 5' » et « in/out 3' ») qui rendent compte de l'insertion du transgène au sein de la cassette Rosa26. Les deux couples d'amorces s'hybrident de part et d'autre des jonctions entre la séquence de la cassette et la séquence du transgène (*Figure 2*), et permettent de s'assurer que l'intégration s'est bien effectuée à l'endroit prévu.

La PCR « Rosa26 » (cycle : cf. GFP) permet de s'assurer de l'homozygotie. Les amorces, dont les sites d'hybridation sont situés au sein de la cassette Rosa26 de part et d'autre du transgène (*Figure 2*), permettent une amplification uniquement dans le cas où le gène n'a pas été inséré. En cas d'insertion, la séquence est trop longue pour être amplifiée en programme PCR standard et n'apparaît pas sur le gel. Ainsi une bande apparaît si l'animal est hétérozygote, mais pas s'il est homozygote.

Tableau I. Caractéristiques des amorces pour les PCR de géotypage.
 Nom et séquence des amorces sens (□) et anti-sens (□) correspondant à chaque PCR. Chaque couple est associé à la taille attendue de l'amplicon.

Type de PCR	Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'	Taille
GFP	GFP Up	CCTCGTGACCACCCTGACCT	525 pb
	GFP Lo3	TCCATGCCGAGAGTGATCCC	
In/out 5'	rROSA26-5outFor	TCCCACCCTCCCCTTCCTCT	1273 pb
	5rCCKpRev	TGTGACCCCGTTGCCCTGGAT	
In/out 3'	3BGHpA-Up2	CCAGATTTTTCTCCTCTCCTG	1367 pb
	rROSA26-3outRev	TGGGTATCACTGGCTGTCCTAGATA	
Rosa26	rROSAfw1	TGAACTGTGAATAGGCCCAAGTG	350 pb
	rROSArev1	GCATTTTAAAAGAGCCCAGTACTTCA	

Les produits de PCR ont été déposés sur des gels d'agarose 1,5 % (Agarose, EP-0010-10, Eurogentec ; tampon Tris Acetate EDTA 1X, TAE Buffer 5X, 135852-26-5, Biosolve). Le tampon de charge (G190A) et l'échelle ADN (G171A) utilisés proviennent de Promega. La migration sur gel s'est faite à 100 V dans une solution de TAE 1X et les gels ont été incubés 15 min sous agitation dans une solution contenant un intercalant de l'ADN (NaCl 0,1 M ; GelRed BY1740, FluoProbes), puis révélés aux ultra-violets (G:Box, Syngene, Ozyme).

D. Préparation des coupes et immunohistochimie

Les prélèvements ont été faits sur les animaux préalablement géotypés homozygotes à 40 jours (n = 5 pour chaque groupe). Les organes ont été prélevés après laparotomie et lavés au NaCl 0,9%. Une section (1x1 cm) de chaque segment de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon, colon proximal et distal) a été réalisée sans l'ouvrir, de façon à conserver la forme tubulaire et ainsi à protéger les villosités. Les prélèvements ont ensuite été fixés dans du paraformaldéhyde 4% avant d'être inclus en blocs de paraffine et coupés (4 µm d'épaisseur) de façon sériée par la plateforme Biogenouest MicroPCell, à Nantes.

Le déparaffinage et la réhydratation des lames ont été effectués en faisant trois bains d'histosol successifs (3 x 5 min), puis des bains d'éthanol à concentration décroissante (100%, 80%, 70%, 50%) et d'H₂O de 5 min chacun.

Pour le démasquage de l'antigène, nous avons utilisé un bain de tampon citrate (acide citrique 0,1 M ; citrate de sodium 0,1 M ; pH 6) chauffé au bain marie jusqu'à 85°C, puis pendant 20 min à 85°C.

Le marquage de la chromogranine A (CgA), spécifique des CEE, permet de visualiser les CEE totales au sein de l'épithélium intestinal (anticorps SP1 Chromogranine A 20085, Immunostar, au 1/1000^e). La révélation a été effectuée avec un anticorps secondaire biotinylé (anticorps secondaire goat anti-rabbit A24541, Life Technologies, au 1/1000^e) et de la streptavidine (streptavidine 568, S11226 Alexa Fluor, Invitrogen, au 1/1000^e). Un marquage au DAPI a également été effectué (DAPI D3571, Molecular Probes, au 1/10000^e) pour visualiser les noyaux. Les lames ont été montées au Prolong Gold antifade reagent (P36930, Molecular Probes).

E. Microscopie à fluorescence et comptage

Les lames ont été observées (x 10 pour le comptage des villosités, x 40 pour le comptage des cellules) au microscope Zeiss (Axio Imager M2m), et photographiées à l'aide du logiciel Zen 2.

Les lames ont été scannées avec le NanoZoomer (NanoZoomer Digital slide scanner, Hamamatsu) et analysées avec le logiciel NDP.view2 (Hamamatsu). Les hauteurs des villosités matures et entières ont été mesurées sur trois coupes pour chaque animal.

Les CEE totales marquées avec la chromogranine A et les CEE de type I exprimant la GFP ont été comptées sur trois coupes pour chaque animal, en privilégiant des coupes provenant de sections éloignées d'environ 16 µm sur l'organe afin d'avoir des valeurs les plus représentatives possible. Les cellules ont été comptées sur les villosités matures et entières et sur la crypte associée à la villosité, préférentiellement à droite de celle-ci.

F. Mesure de l'expression de gènes par qRT-PCR

Sur des rats âgés de 60 jours (n = 10 contrôles et n = 10 RCIU), le duodénum proximal, plus riche en cellules I, a été prélevé pour effectuer les PCR et a été placé immédiatement dans de l'azote liquide pour congélation.

L'extraction d'ARN a été réalisée à l'aide de Trizol Reagent (15596026, Ambion, Life Technologies). Les échantillons ont ensuite été broyés (broyeur Precellys Evolution, Bertin Technologies) deux fois 25 s à 6000 rpm, avec un temps de pause de 15 s. Du chloroforme a été ajouté aux échantillons avant centrifugation (15 min à 12000 rpm). La phase aqueuse a été prélevée et de l'isopropanol froid y a été ajouté. Les échantillons ont été conservés 10 min à RT puis centrifugés (10 min à 12000 rpm). Les culots ont été lavés avec de l'éthanol 75% puis centrifugés (5 min à 12000 rpm) et laissés à sécher sous la hotte puis réhydratés avec de l'eau sans RNase (eau p.p.i., 3511618, B.Braun).

Une étape de digestion à la DNase (RQI RNase Free DNase, M6101, Promega) a ensuite été réalisée (45 min à 37°C puis 10 min à 65°C) afin d'éliminer l'ADN génomique restant après extraction.

La reverse transcription a été effectuée en deux étapes. La dénaturation a été effectuée à l'aide d'amorces aléatoires (C1181, Promega) et d'un thermocycleur MyiQ5 Bio-Rad (5 min à 65°C puis 1 min à 4°C). Pour l'élongation, un kit SuperScript III (SSIII 18080044, ThermoFischer) et un thermocycleur MyiQ5 (60 min à 50°C puis 15 min à 4°C) ont été utilisés.

L'analyse par PCR quantitative (qPCR) a été réalisée sur trois gènes de différenciation (Math1, Pax6 et Pdx1) et quatre peptides gastro-intestinaux (CCK, ghréline, GIP). Nous avons utilisé un mix de réaction contenant du SYBR green (172-5124, Bio-Rad) et les amorces (Eurofins, France) dont les séquences figurent dans le Tableau II, ainsi qu'un thermocycleur MyiQ5 (10 min à 95°C ; 35 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 60°C, 10 s à 72°C ; puis 5 s à 55°C ; 15 min à 95°C). Les niveaux d'expression ont été analysés en calculant le ΔCT ($2^{-\Delta CT} * 1000$) et le gène de la β -actine, un gène de ménage, a été utilisé pour normaliser les valeurs.

Tableau II. Caractéristiques des amorces pour l'étude des niveaux d'expression des marqueurs de différenciation. Nom et séquence des amorces sens (□) et anti-sens (□) correspondant à chaque marqueur.

Marqueur analysé	Nom des amorces	Séquence 5'-3'
β-actine	r BACTIN F	CTA TCG GCA ATG AGC GGT TCC
	r BACTIN R	GCA CTG TGT TGG CAT AGA GGT C
CCK	r CCKbd	TGC TTG GAG GAG GCG GAA TG
	r CCKbd	GCT GGG CTG AGG TGT GTG G
Ghréline	r Ghrl F	AGA GGC GCC AGC TAA CAA GTA A
	r Ghrl R	GCA GGA GAG TGC TGG GAG TT
GIP	r Gip F	CTC CTG TTC CTG GCT GTC
	r Gip R	GGC GAT GCT GTA ATC ACT G
Math1	r ATH1 F	TGT TAG CAA CGA TGT GAC TTC
	r ATH1 R	CAG ACC AGA GAC AGA GAT ACG
Pdx1	r PDX1 F	TGC CAG AGT TCA GTG CTA ATC C
	r PDX1 R	CTT CCC TGT TCC AGC GTT CC
Pax6	r Pax6 F	CAATTCCACAGCCCACCACACC
	r Pax6 R	GGGCATCGGCGGCAAAGC

RÉSULTATS

A. Validation du modèle de rats transgéniques

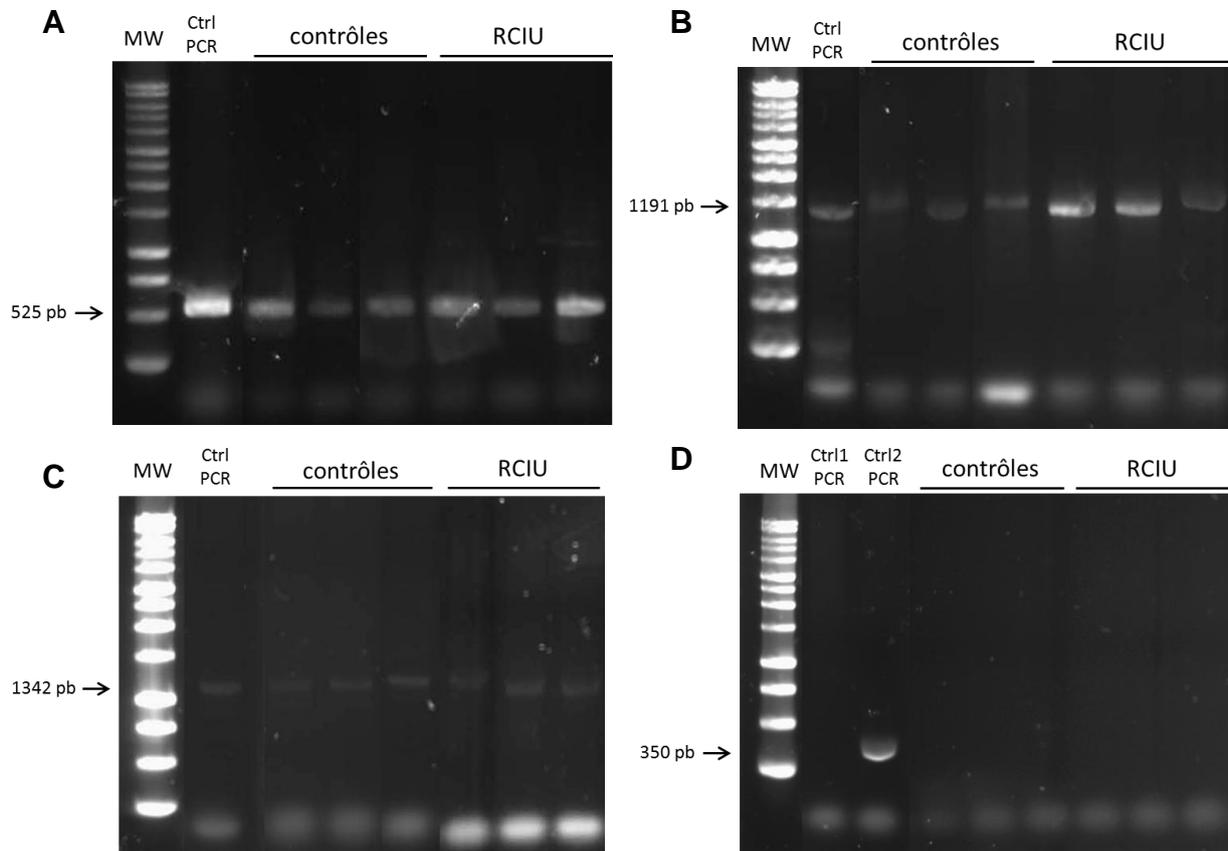


Figure 3. Résultats de migration des produits de PCR. PCR « GFP » pour l'insertion du transgène (A). PCR pour l'intégration du transgène dans la cassette Rosa26, in/out 5' (B) et in/out 3' (C). PCR « Rosa26 » de validation de l'homozygotie des animaux (D), pas d'amplicon attendu, Ctrl1 : rat contrôle homozygote, Ctrl2 : rat contrôle hétérozygote. n = 15 contrôles et n = 24 RCIU, sont représentés trois animaux par groupe à titre d'exemple.

La PCR « GFP » (Figure 3.A) a permis de s'assurer de l'insertion du gène chez les animaux. Pour l'ensemble des échantillons contrôles et RCIU, les produits de PCR migrent à la taille attendue, c'est-à-dire 525 pb.

Les deux PCR « in/out » (Figure 3.B et 3.C) nous ont servi à contrôler l'insertion correcte du transgène dans la cassette Rosa26 à forte activité transcriptionnelle. Pour les deux PCR, les amplicons migrent aux tailles prévues : 1191 pb pour la PCR in/out 5' et 1342 pb pour la PCR in/out 3'.

La PCR « Rosa26 » (*Figure 3.D*) nous a permis de vérifier l'homozygotie des animaux. Comme escompté, la PCR n'a pas généré d'amplicon chez les rats homozygotes, contrairement au rat contrôle (Ctrl2) hétérozygote chez qui il y a eu synthèse d'amplicons migrant à 350 pb.

B. Effet du RCIU sur la morphologie intestinale

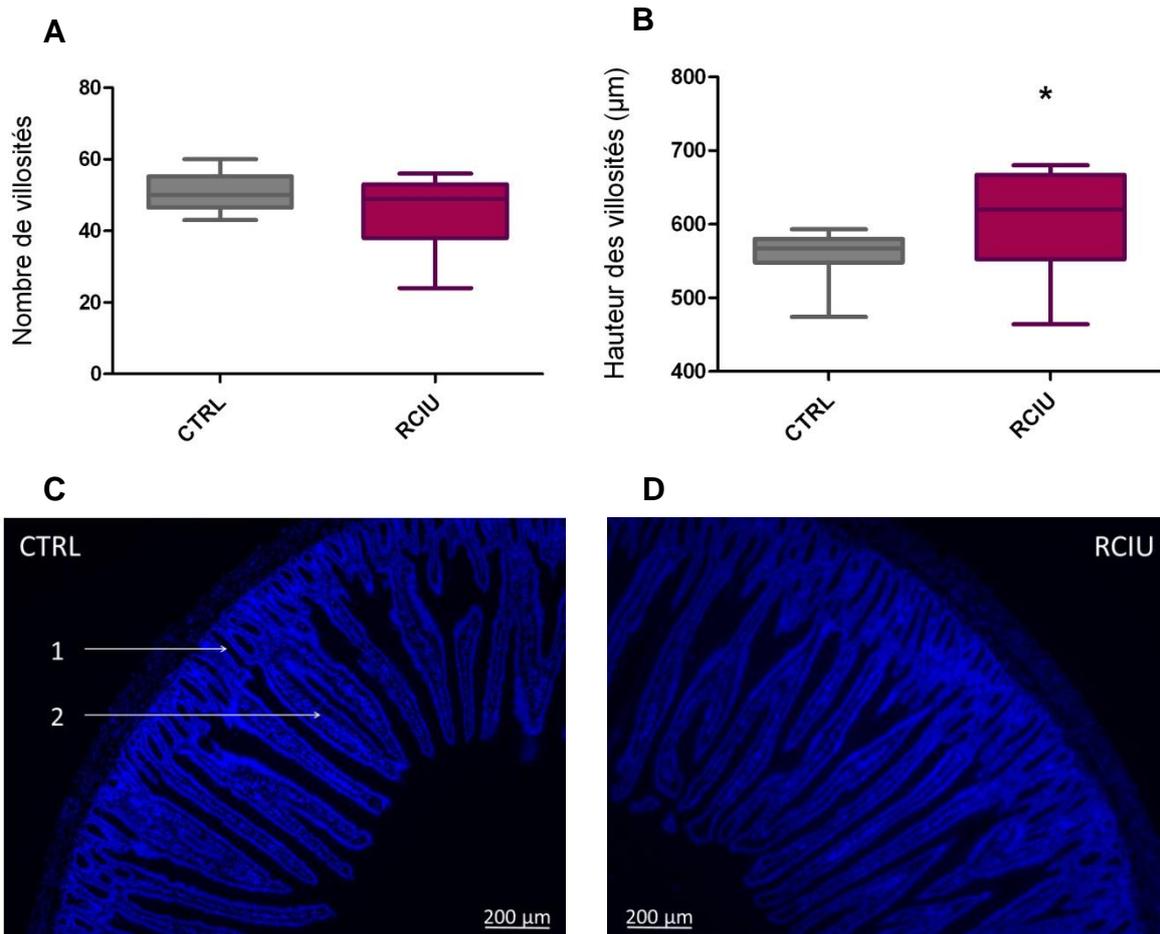


Figure 4. Morphologie des villosités intestinales. Nombre par coupe (A) et hauteur (B) moyens des villosités chez les rats contrôles (n = 4) et à RCIU (n = 5), * p < 0,05 (test de Mann-Whitney). Photographies (x 5) par microscope à fluorescence (DAPI) de coupes de duodénum de rats contrôles (C) et RCIU (D). Les flèches indiquent les cryptes (1) et les villosités (2).

Chez les rats contrôles comme chez les rats à RCIU, le nombre de villosités par coupe est similaire (*Figure 4.A*). En effet sur une coupe de duodénum de 4 µm d'épaisseur on compte une cinquantaine de villosités dans les deux groupes.

En revanche la hauteur des villosités est significativement plus importante chez les rats RCIU puisque chez ces derniers cette hauteur est supérieure de 8% à celle des rats contrôles (*Figure 4.B*). Elle est constatée par visualisation en microscopie à fluorescence (*Figure 4.C et D*).

C. Effet du RCIU sur les populations de CEE totales et de type I

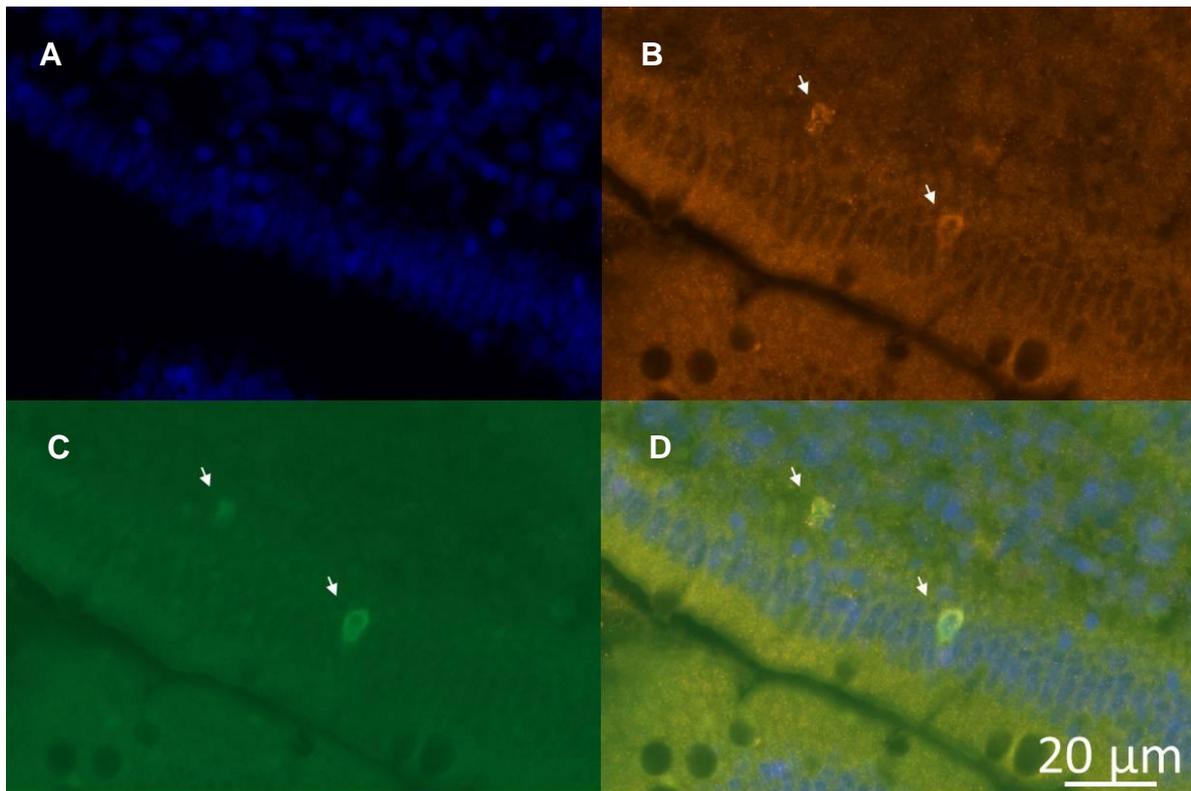


Figure 5. Visualisation des cellules d'intérêt en microscopie à fluorescence. Sur une coupe de duodénum proximal chez un rat contrôlé, révélation des noyaux au DAPI (A), de la chromogranine A (B) et de la CCK (C). Superposition des images (D). Les flèches indiquent les CEE de type I.

Nous avons validé le marquage (*Figure 5.A et B*) et l'expression de la GFP sur des coupes de duodénum (*Figure 5.C*). Malgré le bruit de fond, les cellules exprimant la GFP se distinguent assez nettement pour permettre leur comptage (*Figure 5.D*). Comme attendu, les cellules exprimant la GFP produisent également le marqueur des cellules entéro-endocrines matures, la chromogranine A (*Figure 5.B et D*).

1. Les cellules entéro-endocrines totales et de type I dans les villosités

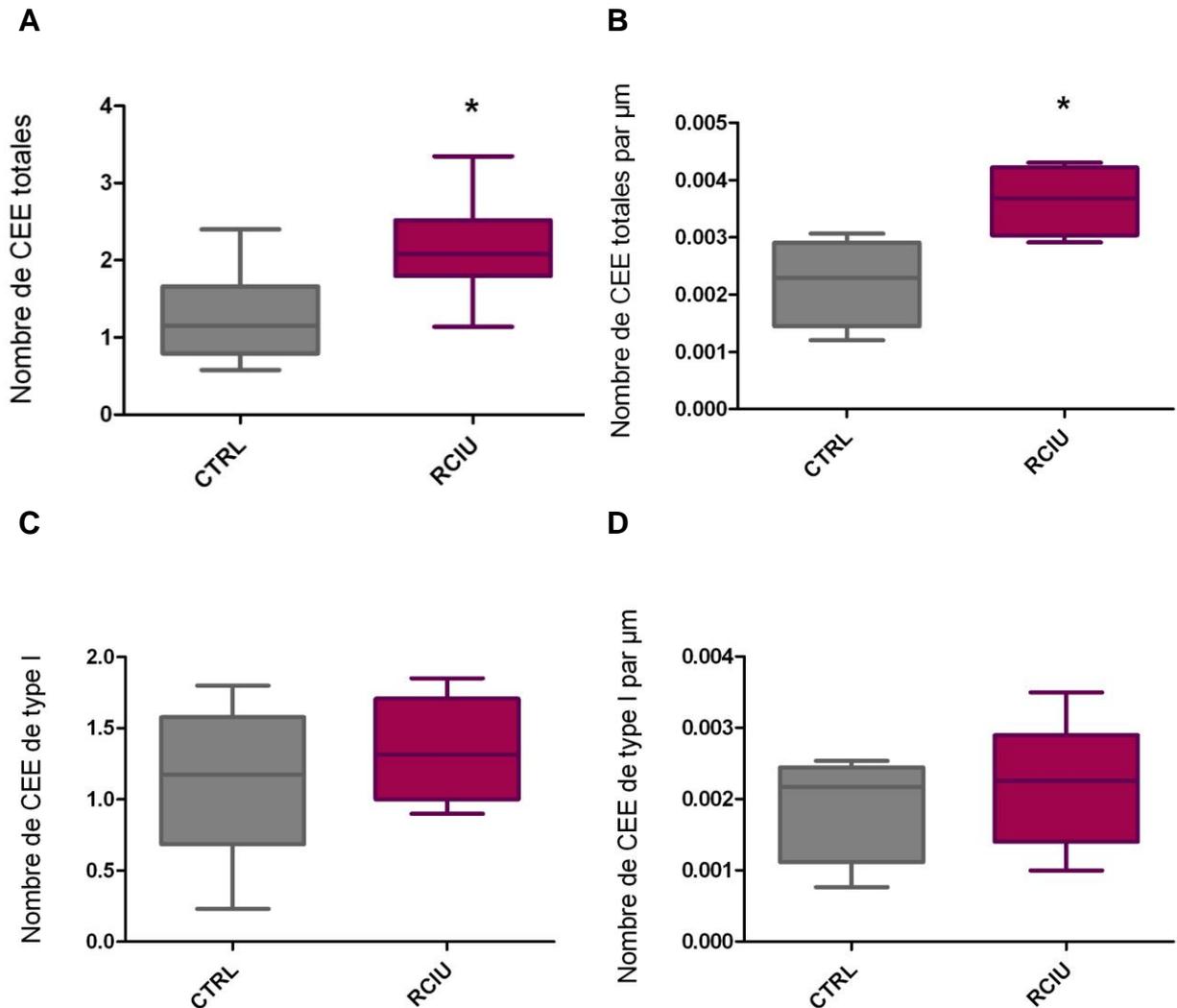


Figure 6. Effectifs des CEE totales et des CEE exprimant la CCK dans les villosités. Nombre de CEE totales par villosité chez les rats contrôles (CTRL) et RCIU (A). Densité de CEE totales (B). Nombre de CEE de type I par villosité chez les rats contrôles et RCIU (C). Densité de CEE de type I (D). * $p < 0,05$ (test de Mann-Whitney), $n = 4$ contrôles et $n = 5$ RCIU.

Dans les villosités le nombre de CEE totales est significativement plus élevé chez les rats RCIU que chez les contrôles (*Figure 6.A*). En effet on compte 71% de CEE totales en plus chez les rats RCIU. Cette augmentation du nombre de CEE totales n'est pas seulement liée à la hauteur plus importante des villosités constatée chez les rats RCIU, puisqu'elle est toujours significative lorsque le nombre de cellules est ramené à la hauteur des villosités (*Figure 6.B*). En effet le nombre de CEE par μm de villosité chez les rats à RCIU est 64% plus élevé que celui trouvé chez les rats contrôles.

Le nombre de CEE de type I sécrétrices de CCK n'est pas modifié au sein des villosités des rats à RCIU (*Figure 6.C*), même lorsqu'il est ramené à la hauteur des villosités (*Figure 6.D*).

2. Les cellules entéro-endocrines totales et de type I dans les cryptes

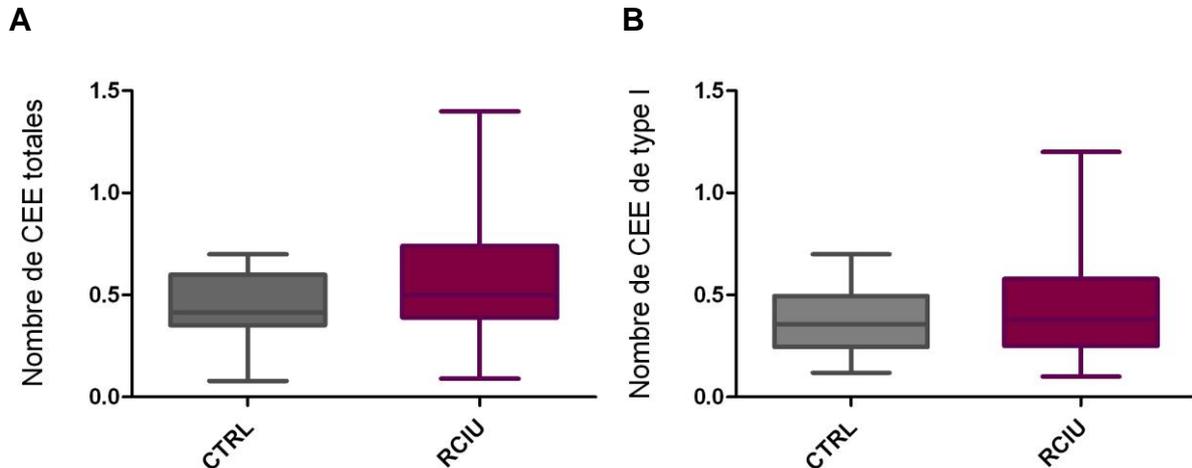


Figure 7. Effectifs des CEE totales et des CEE de type I dans les cryptes. Nombre de CEE totales (A) et de type I (B) par crypte chez les rats contrôles (n = 4) et RCIU (n = 5).

Chez les rats à RCIU âgés de 40 jours, ni le nombre de CEE totales ni le nombre de CEE type I ne sont modifiés au sein des cryptes (*Figure 7.A et B* respectivement) par rapport aux rats contrôles.

D. Effet du RCIU sur l'expression de marqueurs de différenciation

Parmi les peptides gastro-intestinaux, le niveau d'expression de la CCK n'est pas modifié chez les rats à RCIU par rapport aux rats contrôles (*Figure 8.A*), de même que celui de la ghréline (*Figure 8.B*). L'expression du GIP, en revanche, est nettement diminuée chez rats à RCIU, avec une expression relative égale à 24% de celle des rats contrôles (*Figure 8.C*).

Le niveau d'expression des gènes de différenciation étudiés n'est pas affecté (*Figure 8.D et E*) à l'exception de celui de Pax6 qui tend à être inférieur ($p = 0,0999$) chez les RCIU (*Figure 8.F*) par rapport aux rats contrôles.

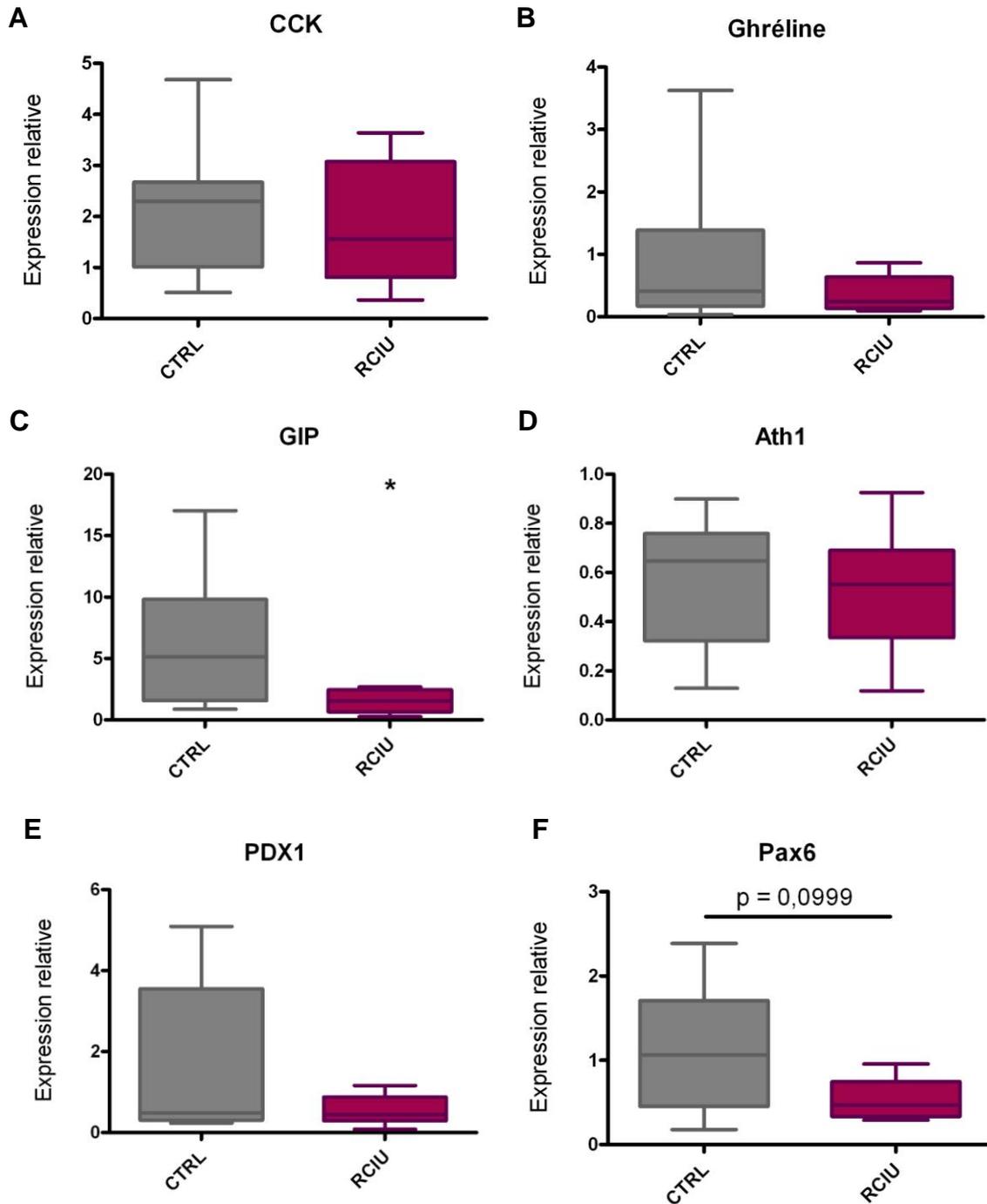


Figure 8. Expression relative ($2^{-\Delta CT}$) de marqueurs de différenciation. Expression relative des peptides gastro-intestinaux CCK (A) et GIP (B) chez les rats à RCIU par rapport aux rats contrôles. Expression relative du facteur de transcription Pax6 (C). * $p < 0,05$ (test de Mann-Whitney), $n = 10$ pour chaque groupe.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude était de caractériser l'effet d'un RCIU sur la population de CEE sécrétrices de CCK (CEE I) dans le duodénum du jeune rat afin de mieux comprendre la mise en place des défauts de satiété observés à l'âge adulte. Pour cela, nous avons utilisé un modèle rat transgénique CCK-GFP chez qui les CEE I sont fluorescentes. Cette approche se justifie par la grande dispersion et la très faible représentativité des CEE I dans l'épithélium intestinal (0,5 à 1% des CEE totales).

Cette étude a permis de montrer que le retard de croissance intra-utérin a un impact sur la morphologie des villosités intestinales dans le duodénum des rats RCIU âgés de 40 jours. En effet, même si le nombre de villosités est similaire à celui des rats nés de poids normal, leur hauteur est plus importante chez les rats à RCIU. Ce résultat suggère un effet hyperplasique villositaire du RCIU à cet âge.

Concernant les populations de CEE totales (marquées à la chromogranine A) et les CEE I (GFP), les résultats sont différents selon l'axe crypte/villosité.

Ainsi, dans les cryptes, ni le nombre de CEE totales ni le nombre de CEE I ne sont modifiés chez les rats RCIU par rapport aux rats contrôles. La prolifération et la différenciation des CEE à partir des cellules progénitrices (*Figure 1.B*) démarrent dans les cryptes puis les CEE en différenciation migrent le long des villosités où elles acquièrent leur phénotype mature (Van der Flier et Clevers, 2009). Ceci pourrait expliquer que le RCIU n'ait pas d'effet sur les nombres de CEE totales et de CEE I dans les cryptes où elles sont plus faiblement représentées. Il serait intéressant de procéder à un marquage spécifique des progéniteurs de la lignée endocrine (Ngn3) afin de mesurer l'effet d'un RCIU sur les cellules indifférenciées des cryptes.

Dans les villosités des rats RCIU, le nombre de CEE I est similaire à celui des rats contrôles tandis que le nombre de CEE totales est plus important. Le retard de croissance intra-utérin n'affecterait pas la population des CEE I mais aurait un effet sur la prolifération des CEE totales, cohérente avec l'augmentation de la hauteur des villosités. Il est cependant possible que cette hyperplasie ne concerne pas seulement la lignée endocrine mais également les autres types cellulaires de l'épithélium. Afin de mieux caractériser cette prolifération, il serait intéressant de réaliser un marquage immunohistochimique à l'aide d'un marqueur de prolifération tel que Ki-67.

Cet effet prolifératif pourrait être dû à une adaptation intestinale du rat RCIU au cours du développement postnatal suite à la restriction protéique maternelle. Celle-ci induirait un retard de maturation intestinale (Faça-Verthon *et al.*, 2009) qui serait compensé après la naissance suite à un apport nutritionnel plus important. Il y aurait alors une augmentation de la surface d'échange et des capacités endocrines caractérisé par une prolifération des CEE. Des analyses similaires au cours de la vie post-natale et à l'âge adulte permettraient de définir si ces effets du RCIU sont transitoires ou durables et s'ils relèvent d'une adaptation nutritionnelle au jeune âge. Des effets transitoires du RCIU ont ainsi été observés sur le développement de l'iléon dans un modèle de souris RCIU nés de mères hypertendues (Fung *et al.*, 2016). Ces effets, bien que transitoires, perturbent le développement normal de l'intestin et peuvent prédisposer à des dysfonctionnements futurs.

Nous avons également étudié l'expression de marqueurs de différenciation des CEE et notamment les peptides gastro-intestinaux qui caractérisent leur type de sécrétion. L'analyse du gène de la CCK ne montre pas de différence de son niveau d'expression chez les RCIU par rapport aux contrôles, ce qui est cohérent avec le nombre constant de CEE de type I déterminé par comptage. Le niveau d'expression du GIP est quant à lui diminué. Pourtant, les villosités du RCIU montrent des CEE totales plus nombreuses, or dans le duodénum proximal elles sont supposées être principalement des cellules exprimant la CCK et des cellules K exprimant le GIP (Gunawardene *et al.*, 2011). Il est nécessaire de poursuivre le phénotypage car d'autres types de CEE, notamment celles sécrétant la sérotonine (*Figure 1.B*), sont localisées sur toute la longueur du tube digestif et pourraient être la lignée de CEE dont la population est augmentée par le RCIU.

Nous nous sommes également intéressés aux gènes de différenciation exprimés par les précurseurs de la lignée endocrine. Les niveaux d'expression des gènes de différenciation Pax6 et Pdx1, caractéristiques de CEE intestinales impliquées dans la sécrétion de peptides gastro-intestinaux satiétogènes (*Figure 1.B*), ne sont que peu (Pax6) ou pas (Pdx1) affectés par le RCIU. Ceci suggère que la différenciation de cette catégorie de CEE à localisation exclusive dans l'intestin dont font partie les CEE de type I n'est pas affectée par le RCIU.

Au vu de ces résultats, les défauts de régulation de la sécrétion de CCK observés chez le rat RCIU ne semblent pas s'expliquer par des altérations de la prolifération, de la différenciation ou de l'expression des CEE I qui la secrètent.

Il faut cependant noter que les analyses d'expression de gènes de différenciation ont été effectuées sur des rats âgés de 60 jours. La croissance postnatale est une période d'adaptations physiologiques importantes et un écart d'âge de 20 jours peut ne pas être négligeable sur les effets observés. Il aurait été judicieux de réaliser ces analyses sur les mêmes rats que ceux utilisés pour le comptage. Par ailleurs, le comptage a été effectué une seule fois par une seule personne, un second est indispensable avant de pouvoir soutenir ces observations. Ces résultats préliminaires seront de plus à approfondir par tri cellulaire des CEE I par cytométrie en flux. Le niveau d'expression des marqueurs de différenciation pourra ensuite être étudié par qRT-PCR sur cellules triées, ce qui permettra une analyse plus fine et plus spécifique de l'effet du RCIU sur le phénotype des CEE I.