

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine

Laboratoire EA4021, IFR 145 GEIST

N°.....

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Laurent Fourcade

Le 30 septembre 2008

Mécanismes physiopathologiques responsables des troubles de la motilité intestinale étudiés sur 2 modèles expérimentaux d'atrésies intestinales chez le rat

Directeur de Thèse : Professeur Franck STURTZ

Composition du JURY :

Rapporteurs

M. le Pr Francis JAUBERT	Anatomopathologie	U. de Paris V
M. le Pr Guillaume LEVARD	Chirurgie Pédiatrique	U. de Poitiers

Examineurs

M. le Pr Dominique MOULIES	Chirurgie Pédiatrique	U. de Limoges
M. le Pr Denis VALLEIX	Anatomie	U. de Limoges
M. le Pr Franck STURTZ	Biochimie	U. de Limoges

Examineur Invitée

Mme le Dr Jane LANGUEPIN	Pédiatrie	U. de Limoges
--------------------------	-----------	---------------

A mes parents,

Voilà, c'est fait, ils auront peut être bientôt tous leur Thèse...

Pour le soutien inconditionnel que vous m'avez apporté durant toutes ces années, veuillez trouver dans ce travail le signe de ma profonde gratitude,

A Sophie,

Tu m'as accompagné du Guatemala à la péninsule de Kohla, de mon Internat au Doctorat, ton soutien sans faille durant ces années m'a permis de mener à bien mes projets. Avec tout mon amour,

A Constance, Thibault, Tiphaine et Anatole, En espérant pouvoir un jour rattraper le temps que je vous ai volé,

A Marie-Christine et à François, je marche dans vos traces,

A mes amis,

Remerciements

Monsieur le Professeur Francis JAUBERT, Professeur d'anatomopathologie à l'hôpital Necker Enfants-malades,

Je voudrais vous adresser mes plus sincères remerciements pour avoir eu la gentillesse de bien vouloir juger notre travail. Vous nous avez initié à la complexité de votre spécialité, nous avons pu apprécier votre expertise auprès de nos patients. Votre disponibilité est restée sans faille de l'Irlande au Limousin. Nous sommes très honorés de votre présence à notre soutenance de Thèse.

Monsieur le Professeur Guillaume LEVARD, Professeur de Chirurgie Pédiatrique au CHU de Poitiers,

Je tiens à vous remercier très chaleureusement, pour avoir accepté sans aucune hésitation de juger notre travail. Nous espérons par cette Thèse avoir pu participer, un peu, à l'avancement des connaissances dans le domaine de la Chirurgie Pédiatrique. Nous avons pu apprécier, lors de vos visites à Limoges, votre sagesse et vos compétences techniques. Veuillez trouver à travers ce travail l'expression de notre profond respect.

Monsieur le Professeur Dominique MOULIES, Professeur de Chirurgie Pédiatrique, Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU de Limoges,

Monsieur et cher Maître, vous nous faites l'honneur de participer à ce jury de Thèse, malgré un sujet quelque peu éloigné des thématiques orthopédiques. Ce travail, rythmé par vos encouragements constants, est un peu le vôtre. Nous avons pu apprécier ces dernières années, la grande liberté que vous nous avez octroyée. Soyez ici certain que vos efforts et votre opiniâtreté ne resteront pas vains.

Monsieur le Pr Denis Valleix, Professeur d'Anatomie, Professeur de Chirurgie Digestive, CHU de Limoges,

Monsieur le Professeur, nous vous remercions d'avoir accepté notre invitation à ce jury de Thèse. Nous avons pu apprécier votre disponibilité et votre habileté dans la prise en charge de nos petits patients. Les souvenirs de votre enseignement de l'Anatomie restent des temps forts de notre formation. Nous espérons par cette Thèse nous être montrés dignes cet enseignement en ayant peut être pu, du moins en partie, assouvir votre insatiable curiosité.

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

Monsieur le Professeur, vous avez réussi la prouesse de nous permettre de finaliser ce travail échelonné sur plusieurs années. Vous nous avez accueilli au sein de votre équipe, sans aucun parti pris. Cette mise en confiance associée à des conseils toujours résolument positifs nous ont permis de finaliser nos résultats. Veuillez trouver en ce travail l'expression de notre sincère reconnaissance et le début d'une longue amitié. Merci.

Madame le Dr Jane Languepin, Praticien Hospitalier, Gastroentérologue Pédiatre, Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU de Limoges,

Madame le Docteur Languepin, Chère Jane, je te remercie de participer à l'examen de cette Thèse. Même si nous n'avons pas effectué de travaux en commun, j'ai essayé d'intégrer dans cette thèse l'esprit de tes remarques toujours avisées. En espérant que nos discussions animées se poursuivent encore de longues années, je te prie de bien vouloir recevoir l'expression de ma sincère amitié.

**Monsieur le Docteur Yoanne MOUSSEAU, Faculté de Médecine de
Limoges**

Je te remercie pour ta patience, tes capacités d'écoute et ta participation à toutes les phases de l'élaboration de ce travail. Ta connaissance des outils informatiques n'a d'égale que celle de tes talents culinaires. J'espère que ce travail n'était que le début de nouvelles aventures scientifiques.

**Mademoiselle le Docteur Guislaine BARRIERE, Faculté de Médecine de
Limoges**

J'ai pu apprécier ta disponibilité à chaque fois que j'ai eu besoin de conseils de tous ordres, sois en remerciée.

**Madame le Docteur Jeanne COOK-MOREAU, Maître de Conférence des
Universités d'Immunologie, Faculté de Pharmacie de Limoges,**

Ton accent Limousin est toujours à améliorer, merci pour ta disponibilité pour les corrections linguistiques de dernières minutes, sois assurée de ma sincère amitié.

**Madame le Docteur Hélène CHABLE-RABINOVITCH, Maître de
Conférence des Universités de Biochimie, Praticien Hospitalier Faculté de
Médecine de Limoges,**

Je tenais à te remercier pour tes encouragements et ta disponibilité à mon égard.

Monsieur le Docteur Yasser BAAJ,

Cher compagnon de Thèse, j'ai pu apprécier ta gentillesse et ta bonne humeur, je te souhaite le meilleur ainsi qu'à toute ta famille à ton retour en Syrie.

Monsieur le Docteur Hao QIU,

Merci pour tes trucs et astuces, je te souhaite un bel avenir familial et professionnel.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidées et avec qui j'ai travaillé à Dublin : le Professeur Prem Puri qui m'a accueilli dans son laboratoire, mes collègues, Taka Oue, Eiji Miyazaki, Hideki Shima, Sean O'Brian...

Un grand merci à toute l'équipe de chirurgie pédiatrique qui ont eu à supporter mes absences et ma bonne humeur: Dr Longis, Dr Peyrou, Dr Grimaudo, Dr Lansade, Dr Odin, Dr Béchonnet, Dr Beurdeley, Dr Senguelen.

Merci au Dr François Bertin, pour ses encouragements à maintenir le cap.

Je tenais également à remercier mes collègues de l'HME pour leur compréhension.

Merci au Pr Sarnacki, au Dr Cerf-Bensussan et au Dr Frédérique Sauvat avec qui tout a commencé..., à Madame Michèle Leborgne et Monsieur Gérard Pivert qui m'ont initié à l'art du microtome à l'hôpital Necker.

Résumé

L'atrésie intestinale est une malformation congénitale du tube digestif qui nécessite une intervention rapide. Les suites opératoires sont grevées par des troubles fonctionnels de l'alimentation nécessitant un support nutritionnel parentéral avec une longue hospitalisation et une morbidité élevée conduisant parfois au décès de ces patients. Des anomalies du développement du système nerveux entérique et de l'épithélium ont été pressenties comme étant à l'origine de ces troubles fonctionnels. Ces anomalies seraient prédominantes pour certains soit en amont de l'obstacle, soit, pour d'autres, en aval de l'atrésie. Pour préciser cela, nous avons développé deux modèles animaux originaux de création d'obstruction du tube digestif chez le rat qui nous ont permis d'effectuer des études immunohistochimiques à l'aide de marqueurs de la différenciation du SNE et de l'épithélium. Nous avons montré que des anomalies de développement du plexus myentérique prédominaient en aval de l'obstacle intestinal généré dans ce modèle par une ligature intestinale. Nous avons également pu reproduire un type d'atrésies survenant chez l'homme, les atrésies intestinales multiples en utilisant un second modèle tératogénique consistant à injecter de l'adriamycine par voie intra-péritonéale à des rates gestantes. L'étude des fragments atrétiques a confirmé l'existence d'anomalies du développement du SNE post-atrétique et a permis de mettre en évidence le rôle des facteurs endocrines dans la maturation du SNE dans ce contexte pathologique.

MOTS CLES : Atrésie intestinale ; Système nerveux entérique ;; Immunohistochimie ; Rat ; Fœtus.

Abstract

Small bowel atresia remains a challenging problem among neonatal digestive disorders. In all cases, the treatment is based on surgical intervention consisting of resection of the obstructed part of the bowel followed by a primary anastomosis. A successful surgical correction and an adequate length of small intestine are not always sufficient to obtain a full recovery of the bowel. In fact, in about 20% of treated newborns, small bowel function remains not optimal, making it impossible to give these children a normal oral feed. Disturbances in enteric nervous system (ENS) and in epithelium development have been suspected in the pathogenesis of these disorders. A part of the authors consider that these abnormalities are mainly observed in the upper part of the obstruction. For the others, such disturbances are mainly observed in the lower part. Thus, we developed 2 animal models of intestinal obstruction in the rat using immunohistochemical reagents involved in epithelium and enteric nervous system differentiation. We demonstrated in the lower part of a surgical induced obstruction, a delay in the maturation of the ENS. Using a teratogenic model (adriamycin), we also reproduced multiple gastrointestinal atresia, a rare kind of human intestinal atresia with a poor prognosis. We also demonstrated the major role of amniotic fluid digestion and mesenteric blood supply in the ENS maturation.

Key words : Intestinal atresia ; Enteric nervous system ; Immunohistochemistry ; Rat ; Fœtus

Table des matières

Table des Matières

Résumé	8
Abstract	9
I. INTRODUCTION	17
II. Partie Bibliographique : Etat de la question	22
II.1. Atrésies jéjunoiléales chez l'enfant	22
II.1.1. Définition – Données épidémiologiques	22
II.1.2. Hypothèses physiopathologiques	23
II.1.3. Circonstances de découverte des atrésies intestinales.....	25
II.1.4. Classifications	26
II.1.5. Traitement.....	28
II.1.6. Conséquences des atrésies intestinales	28
II.1.7. Histologie de l'intestin de part et d'autre de l'atrésie chez l'Homme	30
II.2. Apport des modèles expérimentaux animaux d'obstruction prénatale du tube digestif	32
II.2.1. Chez le mouton.....	32
II.2.2. Chez l'embryon de poulet	33
II.2.3. Chez le rat.....	34
II.2.4. Chez le lapin	34
II.3. Embryologie-Histologie de l'intestin grêle	35
II.3.1. Rappel embryologique	35
II.3.2. Rappel de histologie normale de l'intestin grêle mature.....	36
II.4. Développement histologique des différentes structures	42
II.4.1. Développement épithélial.....	42

II.4.2.	Développement du système nerveux entérique	44
II.4.3.	Voies de régulation de la migration des cellules de la crête neurale dans l'ébauche intestinale.	47
II.4.4.	Maturation neuronale	53
II.4.5.	Architecture interneuronale	54
II.4.6.	Les cellules gliales	68
II.4.7.	Les cellules interstitielles de Cajal.....	68
II.4.8.	Développement des couches musculaires.....	69
II.5.	Techniques d'étude du SNE	69
II.5.1.	Techniques histologiques.....	69
II.5.2.	Marqueurs de l'apoptose neuronale du SNE	77
II.5.3.	<i>Whole-mount</i> préparation.....	78
II.5.4.	Analyseur d'images.....	79
II.5.5.	Electrophysiologie	80
II.6.	Synthèses et Objectifs du travail	82
III.	Partie Expérimentale et Publications	87
III.1.	Présentation synoptique des études	87
III.1.1.	Première étude	88
III.1.2.	Seconde étude.....	89
III.1.3.	Troisième étude	89
III.1.4.	Quatrième étude	90
III.1.5.	Cinquième étude.....	90
III.2.	Mise au point du modèle chirurgical d'obstruction intestinale par ligature anté-natale de l'intestin	91
III.2.1.	Présentation du modèle	91

III.2.2. Article	93
III.2.3. Conclusions de cette étude	103
III.3. Utilisation du modèle d'atrésie par ligature pour l'étude de la différenciation épithéliale et neuromusculaire	103
III.3.1. Recherche des effets d'une obstruction intestinale anté-natale sur la différenciation épithéliale	103
III.3.2. Recherche des effets d'une obstruction intestinale anté-natale sur la différenciation intestinale neuro-musculaire	112
III.3.3. Interprétation et perspectives pour la suite du travail	121
III.4. Cinétique d'expression des marqueurs neuromusculaires au sein de l'intestin grêle en développement	121
III.4.1. Matériels et méthodes	123
III.4.2. Résultats	124
III.4.3. Interprétation et perspectives par rapport à la suite du travail, utilisation ultérieure	128
III.5. Développement d'un modèle d'atrésies intestinales multiples induites par l'injection d'adriamycine	129
III.5.1. Justification de la création de ce modèle	129
III.5.2. Article : "Multiple gastrointestinal atresias resulted from disturbed morphogenesis"	131
III.5.3. Interprétation et Perspectives	135
III.5.4. Conséquences des atrésies intestinales multiples précoces sur le développement du SNE de rat	135
III.6. Etude de la différenciation du plexus myentérique chez l'enfant prématuré et chez l'enfant à terme	143

III.6.1.	Présentation de l'étude	143
III.6.2.	Article	144
III.6.3.	Interprétation et Perspectives	148
IV.	Partie discussion et perspectives.....	150
IV.1.	Synthèse et rappel des résultats obtenus-originalité des modèles	150
IV.2.	Comparaison du modèle mécanique VS tératogénique	152
IV.2.1.	Choix du rat comme modèle animal	152
IV.2.2.	Justification des deux méthodes d'obstruction prénatales utilisées	153
IV.2.3.	Etude des différences structurelles intestinales de part et d'autre de l'obstacle.....	155
IV.2.4.	Pistes étiologiques Facteurs extrinsèques.....	157
IV.3.	Perspectives de recherche.....	159
IV.3.1.	Pace-maker intestinal	159
IV.3.2.	Cellules gliales.....	160
IV.3.3.	Neuropeptides	160
IV.3.4.	Devenir des neuroblastes	160
IV.3.5.	Modèles d'atrésies chez le gros animal.....	161
IV.4.	Perspectives cliniques.....	161
IV.4.1.	Cractérisation de facteurs pronostiques	162
IV.4.2.	Modifications thérapeutiques à court terme : restauration du flux d'aval	163
IV.4.3.	Pistes thérapeutiques à plus long terme : restauration de la trophicité intestinale.....	164

V.	Conclusion.....	167
VI.	Annexes.....	170
VI.1.	Publications.....	170
VI.1.1.	Articles.....	170
VI.1.2.	Communications orales	170
VI.1.3.	Posters	172
VI.2.	Abréviations	173
VII.	Bibliographie	175

Introduction

I. INTRODUCTION

Les atrésies intestinales jéjuno-iléales représentent un spectre de malformations congénitales isolées ou syndromiques dont la conséquence est une interruption de la continuité de la lumière digestive (grec : a-privatif et trêsis : trou) du jéjunum ou de l'iléon avec éventuellement une absence de certains segments de cet organe. La fréquence de survenue des atrésies et sténoses congénitales du jéjunum et de l'iléon peut être globalement estimée à 1,3/10 000 naissances⁽¹⁻⁴⁾. Le traitement, que le mode de diagnostic soit anténatal ou non, reste chirurgical et consiste à réaliser une résection-anastomose de la zone atrétique. En dehors des problèmes posés par les pathologies qui peuvent être associées aux atrésies intestinales (mucoviscidose, laparoschisis, maladie de Hirschsprung) et de ceux liés à l'existence d'un grêle court, le problème majeur rencontré au décours de la cure chirurgicale des atrésies intestinales est lié aux anomalies de fonctionnement de l'intestin sus et sous-jacent à l'atrésie. En effet, chez 15 à 20% des enfants opérés, les anomalies peuvent persister plusieurs mois après le rétablissement de continuité⁽⁵⁻⁸⁾ et se traduisent par des troubles de la motricité, des troubles de l'absorption et par une plus grande sensibilité aux translocations bactériennes. Cette dernière complication, constitue la première cause de décès chez les nouveau-nés opérés d'une atrésie intestinale^(9, 10). Le traitement de ces anomalies fonctionnelles est la plupart du temps symptomatique et repose essentiellement sur la nutrition parentérale et l'augmentation très progressive des apports entéraux. En cas d'échec de ces traitements et, devant des aspects d'occlusions fonctionnelles sévères, il est cependant parfois nécessaire de ré-intervenir pour lever l'obstacle fonctionnel en réalisant une entérostomie⁽⁷⁾.

En dehors des atrésies intestinales, ces anomalies fonctionnelles du tube digestif peuvent être rencontrées dans d'autres pathologies où il existe une occlusion chronique organique ou fonctionnelle du tube digestif dès la période anténatale: le laparoschisis, la maladie de Hirschsprung étendue et dans certains cas de malformations ano-rectales hautes⁽¹¹⁾. De même, chez les enfants chez qui une dérivation intestinale précoce a été nécessaire (entérocolite ulcéro-nécrosante), ce type de troubles fonctionnels est également noté après le rétablissement de continuité.

Plusieurs équipes ont essayé de dégager des facteurs pronostics des atrésies intestinales : profil des enzymes digestives dans le liquide amniotique⁽¹²⁾, poids de naissance, degré de prématurité, niveau de l'obstruction digestive, longueur de grêle restant, présence ou non de la valvule iléo-caecale⁽¹³⁾. Ces facteurs n'ont malheureusement pas permis de déterminer objectivement le degré de lésions du grêle restant et de préjuger de la rapidité de sa récupération fonctionnelle.

Ces anomalies de fonctionnement du tube digestif de part et d'autre de l'atrésie en amont et en aval de l'atrésie peuvent être interprétées de différentes façons : (i) sont-elles liées à des anomalies du développement intestinal dont le déterminisme est de la même nature que celui responsable de l'obstacle (qu'il s'agisse d'une atrésie intestinale, d'une maladie de Hirschsprung ou d'un laparoschisis ? L'association possible de ces différentes pathologies chez un même individu va dans le sens de cette hypothèse), (ii) sont-elles uniquement secondaires à l'obstacle qu'il soit de survenue ante ou post-natale? (Dans ce cas, on peut penser que ces anomalies seraient retrouvées chez l'adulte en occlusion chronique sans spécificité néo-natale), (iii) la survenue anténatale de l'obstacle, quelle que soit sa nature, peut elle entraîner des anomalies spécifiques du développement ?

Des études effectuées sur des modèles animaux (gros animaux) ont eu pour buts de comprendre l'étiologie des atrésies intestinales et de tenter de répondre à ces questions. Plusieurs modèles expérimentaux permettant d'induire une obstruction du tube digestif à différents stades de l'organogenèse ont été élaborés. L'ensemble de ces travaux, a démontré que la survenue d'une obstruction chronique du tube digestif (ou l'absence de "transit" digestif) durant la gestation induisait des lésions histologiques mais surtout des lésions ultra-structurales de la muqueuse intestinale ainsi que des modifications histochimiques et électrophysiologies de l'innervation aussi bien en amont qu'en aval de l'obstruction. Cependant, ces travaux n'ont pas permis de définir le mécanisme des anomalies fonctionnelles observées après la cure chirurgicale des atrésies.

Ainsi, pour aller plus loin dans l'appréciation de la physiopathologie de ces anomalies, avons-nous décidé sous la direction des Pr Claire Nihoul-Fékété et Sabine Sarnacki d'entreprendre l'étude des modifications de la différenciation neuromusculaire induites par une occlusion de survenue anténatale en utilisant des marqueurs de la différenciation du système nerveux entérique chez le rat. Nous avons pour cela mis au point deux modèles expérimentaux chez le rat qui nous ont permis de : (a) montrer l'importance du retentissement de l'occlusion sur le développement du SNE essentiellement en aval de l'obstacle sous la forme d'un retard de maturation, (b) d'établir une cartographie des différentes étapes du développement du SNE chez le rat, (c) de reproduire de manière expérimentale un spectre d'atrésies intestinales assez semblables à celles retrouvées chez l'enfant, confirmant l'atteinte du SNE d'aval et mettant en évidence le rôle capital de la vascularisation dans la maturation du SNE.

Dans une première partie de ce document, nous rapporterons les éléments déjà connus de la physiopathologie des atrésies intestinales, ainsi qu'une revue des explorations déjà effectuées dans le but de mieux comprendre cette problématique. Puis nous présenterons dans la Partie Expérimentale les modèles animaux que nous avons mis au point ainsi que les résultats que nous avons obtenus avec ces modèles. Enfin dans une 3^e Partie nous discuterons de la validité et de la portée des résultats de notre étude tant d'un point cognitif que d'un point de vue médico-chirurgical.

Partie bibliographique

Etat de la Question

II. Partie Bibliographique : Etat de la question

Il nous a semblé important, pour la bonne compréhension de la suite de l'exposé, d'effectuer à partir de toutes les données disponibles à ce jour, une mise au point relative aux atrésies intestinales et aux problèmes cliniques qu'elles soulèvent. Une synthèse des résultats des différents travaux expérimentaux déjà réalisés sur ce sujet sera ensuite proposée dans le but de servir de référentiel au travail de thèse.

II.1. Atrésies jéjunoiléales chez l'enfant

II.1.1. Définition – Données épidémiologiques

Décrite pour la première fois en 1683⁽¹⁴⁾, l'atrésie jéjuno-iléale est une malformation congénitale qui continue à soulever de nombreuses interrogations tant sur le plan de sa physiopathologie que d'un point de vue clinique. Une atrésie, comme nous l'avons vu en introduction, va entraîner une interruption de la lumière digestive, interruption qui peut survenir n'importe où le long du tube digestif, de l'œsophage au colon.

Les atrésies intestinales que nous allons étudier dans cette thèse sont les atrésies jéjuno-iléales. On les distingue en pratique courante des autres atrésies intestinales, les atrésies duodénales et les atrésies coliques. Les atrésies duodénales appartiennent en effet à un autre spectre malformatif avec un taux élevé d'association avec des anomalies chromosomiques (Trisomie 21) ou a d'autres malformations congénitales. Elles seraient dues à un défaut de perméation et de recanalisation de la lumière digestive à un stade très précoce du développement

embryonnaire. Les atrésies coliques représentent moins de 5% de l'ensemble des atrésies intestinales.

La prévalence des atrésies jéjuno-iléale (sans les atrésies duodénales) n'a que rarement été rapportée. Elle est estimée à un taux variant de 0,8 et 1,3 pour 10000 naissances^(1-3, 15). Le sexe ratio des atrésies jéjuno-iléales est voisin de 1⁽³⁾. A la différence d'autres anomalies congénitales, il n'a pas été mis en évidence de facteurs environnementaux comme étant à l'origine des atrésies jéjuno-iléales. Si l'on regarde l'âge maternel, Il existe deux pics de fréquence entre 20 et 24 ans puis après 35 ans⁽³⁾. La prévalence de cette malformation serait en légère augmentation ces dernières années⁽³⁾.

II.1.2. Hypothèses physiopathologiques

Même si de nombreux travaux ont permis d'élaborer des hypothèses à l'origine des atrésies intestinales, le mécanisme complet de la séquence aboutissant à une atrésie intestinale n'est pas encore clairement défini. Louw et Barnard⁽¹⁶⁾ ont, les premiers, démontré qu'une origine ischémique pouvait être suspectée comme étant à l'origine des atrésies intestinales. En effet, ils ont pu reproduire expérimentalement des atrésies du grêle chez l'animal en interrompant la vascularisation intestinale de fœtus de chien. Ce modèle ischémique a été reproduit chez le fœtus de mouton en 1968⁽¹⁷⁾ et depuis, il a été utilisé avec succès chez les fœtus de chien⁽¹⁸⁾, de rat⁽¹⁹⁾ et chez l'embryon de poulet⁽²⁰⁾.

Ces travaux corroborent ce qui est généralement admis chez l'Homme à savoir que l'atrésie succéderait à un épisode d'ischémie intestinale de survenue tardive pendant la vie intra-utérine⁽²¹⁾. Ainsi l'atteinte d'une des branches de l'artère

mésentérique supérieure qu'elle soit due à un accident thrombotique primitif (anomalie du facteur V Leyden)⁽²²⁾, ou à un accident mécanique (volvulus, invagination, laparoschisis) aboutirait à l'interruption de la continuité de l'intestin. Toujours dans le sens d'une origine ischémique, les atrésies intestinales sont plus fréquemment rencontrées lors des grossesses gémellaires⁽²⁾ dont on connaît le risque plus élevé d'anomalies vasculaires d'origine placentaire. Ces atrésies surviendraient vers la 12^e SA, date de réintégration de l'anse intestinale primitive dans l'abdomen ou plus tard comme l'atteste la présence dans les segments en aval de l'atrésie de matériel digéré (lanugo, cellules cutanées fœtales) en provenance du liquide amniotique. Un autre témoin indirect de la participation vasculaire est l'augmentation récente de la fréquence des atrésies jéjuno-iléales⁽³⁾ (sans augmentation des atrésies duodénales) au même titre que l'augmentation de la prévalence des laparoschisis dont l'origine ischémique est bien établie.

Cependant, il existe un autre type d'atrésies intestinales chez l'Homme où l'hypothèse ischémique ne semble pas univoque. Il s'agit des atrésies intestinales familiales multiples, qui ont été décrites chez quelques familles informatives^(23, 24). Ces atrésies, gravissimes, affectent toute la longueur de l'intestin grêle. Le mésentère n'est pas interrompu et les segments intestinaux non atrétiques sont soit non-perméables, soit remplis d'un matériel mucoïde épais. Ces atrésies relèveraient soit de processus précoces de non-perméation de la lumière du tube digestif, soit de processus inflammatoires aseptiques anténataux.

Deux modèles animaux ont également permis d'obtenir des atrésies intestinales sans qu'un processus ischémique soit directement impliqué. Tout d'abord, Thompson⁽²⁵⁾ en injectant de l'adriamycine (par voie intra-péritonéale) chez des rates en début de gestation a obtenu des atrésies intestinales ainsi que tout un

spectre d'anomalies intéressant divers appareils (appareil cardiovasculaire, appareil urogénital, appareil digestif). Plus tard, Fairbanks⁽²⁶⁾ a obtenu, en utilisant un modèle de souris knock-out pour le gène du FGFb (fibroblast growth factor de type IIb), des atrésies intestinales principalement coliques et duodénales. Il a également démontré que l'intégrité des structures vasculaires était maintenue, invalidant ainsi une hypothèse vasculaire à l'origine des atrésies observées. D'autres malformations étaient associées (dysplasies osseuses, craniosténoses) avec les atrésies intestinales. Il semblerait que ce modèle de souris induise une perturbation de la voie de signalisation régulant la balance prolifération cellulaire-apoptose, au dépend de la prolifération cellulaire et au profit de l'apoptose⁽²⁷⁾.

Ainsi, les caractéristiques de ces types d'atrésie, atrésies familiales multiples chez l'Homme, atrésies par utilisation d'un agent tératogénique et souris knock-out, sont en faveur de l'interruption, soit par une anomalie génétique soit par un évènement non génétique, des voies de développement de l'embryon.

II.1.3. Circonstances de découverte des atrésies intestinales

Le diagnostic prénatal permet actuellement de dépister selon les séries de 30%^(3, 28) à 50%^(29, 30) des atrésies jéjuno-iléales. Etant plus distales que les atrésies duodénales, leur diagnostic est plus difficile car les signes indirects de retentissement de l'occlusion sont plus frustrés et plus tardifs. Il est classiquement découvert une image échographique liquidienne intra-abdominale évoquant une dilatation digestive qui peut parfois être associée à un hydramnios. Cette image, repérée et confirmée sur des échographies répétées, ne permet cependant pas de

prévoir la localisation exacte de l'obstacle. Le terme auquel ce diagnostic échographique est réalisé varie beaucoup, allant de 25 semaines d'aménorrhée (SA) à quelques jours avant le terme. La période où elle peut être détectée le plus facilement est entre la fin du second trimestre et le début du troisième trimestre⁽²⁹⁾. La précocité du diagnostic et l'importance de la dilatation peuvent constituer pour certains un indice de gravité de la l'atrésie⁽³¹⁾. L'IRM fœtale peut permettre de différencier les atrésies grêles des atrésies coliques du fait de la différence de signal entre le méconium et le reste du contenu digestif⁽³²⁾. Elle permet d'avoir une bonne appréciation de la nature du grêle en aval de l'atrésie. En l'absence de diagnostic anténatal, c'est seulement après la naissance que le diagnostic sera suspecté devant un tableau d'occlusion néo-natale.

II.1.4. Classifications

Une fois le diagnostic confirmé et l'enfant correctement réanimé, l'intervention chirurgicale pourra être entreprise. Le premier temps va consister à explorer la cavité abdominale pour confirmer le diagnostic, vérifier l'absence d'autres atrésies ou d'autres anomalies digestives (troubles de la rotation intestinale). De nombreuses classifications d'atrésies intestinales ont été élaborées en fonction de l'aspect macroscopique rencontré. Celle de Grosfeld⁽³³⁾ est la plus utilisée et permet de définir 4 types (Fig 1). Le type I est défini par un diaphragme endo-luminal sans solution de continuité de la paroi digestive ni anomalie du mésentère. Les deux extrémités d'une atrésie de type II sont séparées par un cordon fibreux plein avec un défaut mésentérique minime. Le type III est subdivisé en type IIIa et le type IIIb. Le type IIIa est caractérisé par la disparition du segment intestinal atrétique emportant

en général le segment mésentérique en regard. C'est le type le plus fréquent d'atrésie intestinale jéjuno-iléale. La longueur intestinale peut être raccourcie. Le type IIIb est rare et est caractérisé par un segment proximal développé au niveau de la naissance du jéjunum. L'artère mésentérique supérieure est vestigiale et elle est littéralement engainée par une structure intestinale également vestigiale. L'intégrité du tube digestif est à nouveau obtenue au niveau du caecum. Le pronostic est défavorable du fait de la très courte longueur d'intestin grêle fonctionnel. Les atrésies de type IV correspondent au groupe des atrésies dites multiples, en particulier dans les atrésies familiales multiples déjà décrites.

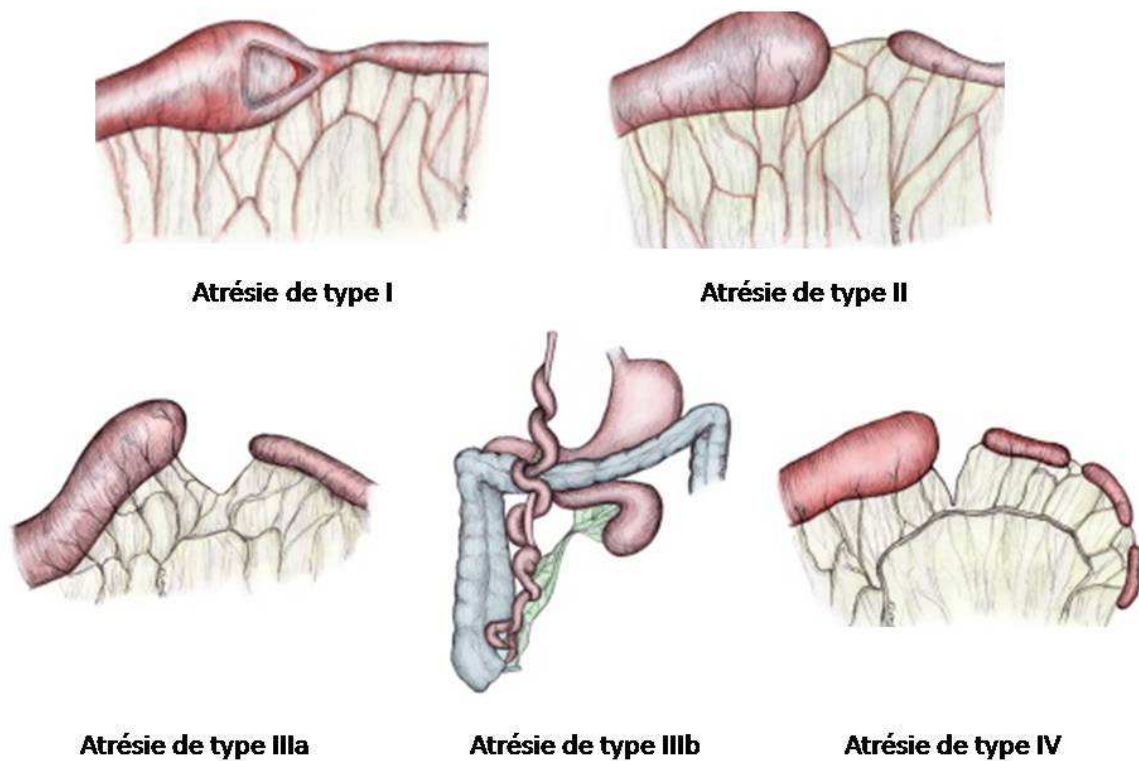


Figure 1 : Description des 4 types d'atrésies jéjuno-iléales selon la classification descriptive proposée par Grosfeld⁽³³⁾.

II.1.5. Traitement

La priorité, qu'elle que soit la stratégie utilisée, va consister à mettre le patient dans une situation permettant de lui conserver la plus grande longueur d'intestin possible de manière à éviter le syndrome dit "du grêle court". Le chirurgien devra également s'efforcer de conserver la valvule de Bauhin, véritable barrière empêchant la colonisation rétrograde de l'intestin grêle par la flore colique. Dans la majorité des cas une résection anastomose de la zone atrétique sera effectuée. Cette anastomose sera parfois rendue compliquée par la disparité de calibre entre l'anse d'amont et celle d'aval nécessitant des artifices techniques allant du modelage à la plicature d'amont à la réalisation d'un long trait de refend en aval. Parfois, le chirurgien pourra être amené à ne réaliser qu'une dérivation digestive en cas d'enfant très fragile ou devant un tableau de péritonite ou d'atrésies multiples. Le rétablissement de continuité sera alors effectué dans un second temps au bout de quelques semaines.

II.1.6. Conséquences des atrésies intestinales

Grâce aux progrès de la réanimation néonatale et de la prise en charge chirurgicale, la mortalité des enfants opérés d'une atrésie jéjuno-iléale isolée a diminué. Elle se situait à plus de 50% au début des années 1970 ⁽⁶⁾, entre 15 et 20% ^(13, 34, 35) à la fin des années 1980 et elle est inférieure à 10% pour les séries les plus récentes ^(1, 3, 29).

La morbidité actuelle des atrésies intestinales est consécutive à deux problèmes. Le premier est celui du "grêle court". En effet, parmi les causes de syndrome du grêle court, les atrésies intestinales arrivent en seconde position

derrière les entérocolites ulcéronécrosantes (ECUN)⁽³⁶⁾ (Tableau 1). Certains de ces patients n'auront pas d'autres alternatives thérapeutiques qu'une nutrition parentérale prolongée suivie d'une transplantation intestinale.

	USA	CANADA	FRANCE	REVUE INTERNATIONALE
Atrésie	30	30	39	23
Volvulus	10	10	24	24
Laparoschisis	17	12	14	14
ECUN	43	35	14	27

Tableau 1 : Répartition des causes d'intestin grêle court. : les atrésies intestinales arrivent en seconde position après les ECUN. D'après Goulet et al⁽³⁶⁾.

Le second problème, non encore résolu, ne se situe pas au stade du diagnostic prénatal ou du traitement chirurgical mais lors de la phase de réalimentation de ces enfants. En effet, chez 20 à 30 % des patients, il est impossible d'obtenir l'acquisition rapide d'une autonomie digestive complète⁽⁸⁾. La prise de conscience de ses troubles fonctionnels date de la première moitié des années 1970, à partir du moment où les améliorations des techniques chirurgicales ont autorisé une survie conséquente⁽⁵⁾. Ces anomalies nécessitent une nutrition parentérale prolongée et une longue hospitalisation qui est émaillée d'une morbidité élevée. Au premier plan, on note les complications infectieuses^(10, 37) à point de départ digestif

(translocations bactériennes) ou à partir de la voie centrale. La nutrition parentérale prolongée avec les complications hépatiques qu'elle engendre participe également à cette morbidité⁽³⁸⁾.

En l'absence d'étiologie précise, le traitement reste symptomatique. Dans les grandes lignes, il consiste à « irriguer » le tube digestif en augmentant les apports très progressivement en privilégiant le lait de mère ou les hydrolysats. Parfois, une nouvelle intervention est proposée de manière à vérifier la perméabilité mécanique de l'anastomose voire afin de dériver ces patients afin de diminuer la pullulation microbienne responsable des translocations bactériennes. Dans la majorité des cas, aucun obstacle mécanique n'est individualisé et l'occlusion est dite fonctionnelle⁽³⁹⁾. Ainsi, tout se passe comme si l'intestin n'avait ni la capacité d'absorber les aliments, ni la capacité d'assurer le transport de ces aliments. Ce n'est qu'au bout d'une durée indéterminée qu'il sera alors possible, en l'absence de complications, de sevrer l'enfant de la nutrition parentérale.

II.1.7. Histologie de l'intestin de part et d'autre de l'atrésie chez l'Homme

Les études des pièces opératoires de nouveau-nés concernant les conséquences histologiques et fonctionnelles de l'atrésie de part et d'autre de l'occlusion sont rares, et leurs résultats peu reproductibles. Deux zones d'intérêt ont été plus particulièrement étudiées, l'épithélium impliqué dans le processus d'absorption et le plexus myentérique impliqué dans la motricité intestinale. Au niveau de l'épithélium, une étude en microscopie optique, a montré une hypertrophie villositaire avec des villosités tortueuses et emmêlées aussi bien en amont qu'en aval

de l'atrésie⁽⁴⁰⁾. Cette même équipe, n'a pas confirmé ces données en utilisant la microscopie électronique⁽⁴¹⁾. Au niveau de la musculature, il a été rapporté un épaissement variable en amont de l'atrésie avec une distension telle que le péristaltisme y est inefficace⁽⁶⁾.

Deux études^(42, 43) ont montré une diminution du nombre et de l'activité cholinergique des ganglions myentériques en amont près de l'atrésie, alors que plus à distance (plus en amont) le nombre et l'activité étaient renforcés. Les auteurs ont postulé un épuisement des neuromédiateurs dans la zone immédiatement juxta atrétique secondaire soit à la lutte contre l'obstacle soit à l'ischémie induite par la distension⁽⁴³⁾ qui est maximale à cet endroit. Sur le plan enzymatique, il a été décrit des diminutions de l'activité lactasique⁽⁴⁴⁾ en amont et à un degré moindre en aval de l'atrésie ce qui pouvait être à l'origine de troubles de l'absorption.

Plus récemment l'équipe de Ozguner⁽⁴⁵⁾ a étudié des pièces de résection d'atrésies jéjuno-iléales à 2 et 4 cm en amont de l'atrésie et à 1 et 2 cm en aval avec des techniques d'histologie conventionnelle par coloration hématoxyline Eosine Safran (HES), et en immunohistochimie en utilisant la synaptophysine, un marqueur neuronal que nous détaillerons ultérieurement. En amont, ont été mis en évidence en juxta-atrétique une désorganisation musculaire ainsi que des ganglions nerveux irréguliers, aspects se normalisant à 4 cm plus en amont. Ces anomalies étaient présentes tant sur le versant mésentérique, que sur le versant anti-mésentérique. En aval, outre l'aspect désorganisé en juxta-atrétique, aucune anomalie remarquable n'était notée. Khen et al.⁽⁴⁶⁾ ont mis en évidence, sur des prélèvements opératoires des anomalies de développement en aval de l'atrésie. Ainsi, il n'existe pas d'avantage de critères histologiques que de critères cliniques permettant de prévoir et d'anticiper la survenue des troubles fonctionnels post-opératoires.

II.2. Apport des modèles expérimentaux animaux d'obstruction prénatale du tube digestif

Du fait de la diversité des résultats obtenus sur les prélèvements humains et de l'absence de conclusion aidant à mieux comprendre ces troubles fonctionnels, plusieurs équipes ont tenté de reproduire sur des modèles animaux une obstruction prénatale du tube digestif à différents stades de l'organogenèse. Ils ont alors étudié l'histologie du tube digestif en amont et en aval de l'obstacle en orientant leurs études soit vers le versant épithélial soit vers le versant de la motricité intestinale. D'autres auteurs, se sont intéressés aux conséquences d'une obstruction totale ou chronique partielle de l'intestin, sans prendre en considération la survenue anténatale de l'évènement. Nous allons tenter de synthétiser tous ces travaux dans les pages suivantes en présentant les avancées obtenues selon le type d'animal.

II.2.1. Chez le mouton

Plusieurs auteurs ont créé des occlusions intestinales entre le 50^e et le 100^e jour de gestation (pour un terme normal de 145 jours), soit par des procédés réalisant une ischémie partielle mésentérique^(41, 43) (atrésie vraie), soit par ligature complète d'une anse grêle^(47, 48). A la naissance, les modifications étaient observées en amont et en aval de l'occlusion en utilisant les techniques suivantes: histologie en microscopie optique et électronique, immunohistochimie avec l'étude de l'activité acétylcholinestérasique des plexus myentériques et étude de l'activité ATPasique au

niveau musculaire et au niveau de la bordure en brosse. L'ultra-structure de l'épithélium intestinal a été retrouvée perturbée, ainsi que l'activité acétylcholinestérasique au niveau des plexus myentériques, les occlusions d'origine ischémique provoquant des lésions plus importantes que les occlusions de type mécanique. Dans une autre étude⁽⁴⁹⁾, toujours menée chez le mouton, des occlusions prénatales ont été réalisées par ischémie mésentérique, puis les agneaux ont été opérés de manière à lever l'obstacle. L'étude myoélectrique de l'intestin en amont de l'obstacle a montré une chute de l'activité des contractions musculaires de 5% et surtout une activité nulle en aval de l'obstacle, comparé à des animaux témoins. Un modèle d'interruption de la circulation du liquide amniotique⁽⁵⁰⁾ dans le tube digestif par ligature de l'oesophage cervical vers le 60^e jour de gestation a montré le rôle trophique du liquide amniotique dégluti dans le développement intestinal.

II.2.2. Chez l'embryon de poulet

L'étude de la muqueuse intestinale (microscopie optique et électronique) chez des embryons occlus au 12^e jour après la fécondation (pour une éclosion normale vers le 20^e jour) sont identiques à celles décrites chez le mouton⁽⁵¹⁾ avec une désorganisation des villosités et un élargissement de la distance inter-villositaire. En s'intéressant au SNE, une autre équipe⁽⁵²⁾ a effectué des atrésies par section à E11 puis étudié les conséquences à E13 (48 h d'obstruction). Il n'a pas été noté de différence histologique entre l'amont et l'aval. L'étude immunohistochimique des fibres musculaires lisses et de marqueurs des cellules nerveuses a montré une hypertrophie de ces fibres. Aucune anomalie, notamment à type d'hypotrophie ou de rétraction n'a été visualisée en aval.

II.2.3. Chez le rat

Une première équipe⁽¹⁹⁾, a effectué des occlusions intestinales foetales entre le 16^e et le 20^e jour de gestation (pour un terme normal à 22 jours). Ces auteurs n'ont pas trouvé de modification de la structure histologique, mais des modifications de l'activité enzymatique de la bordure en brosse. Une seconde équipe⁽⁵³⁾, a réalisé un modèle d'occlusion colique partielle chez le rat nouveau-né, à la recherche de modifications du nombre et de la fonction des cellules ganglionnaires myentériques. Aucune modification n'a été notée. L'absence de modification a été attribuée au caractère post-natal de la réalisation de l'occlusion.

II.2.4. Chez le lapin

Un modèle de ligature oesophagienne^(54, 55) de réalisation pré-natale a été développé. Les conséquences de cette absence de digestion anténale ont été étudiées au niveau de la bordure en brosse de l'épithélium. Ce modèle ne peut pas être complètement transposé aux modèles d'atrésie intestinale même en n'étudiant que le segment d'aval. En effet, la dénutrition induite sur tout le fœtus est telle qu'elle intéresse aussi les viscères dont l'intestin grêle. Ainsi, les modifications de structure intestinales mise en évidence sous d'avantage le fait de la dénutrition que de l'absence de circulation du liquide amniotique.

II.3. Embryologie-Histologie de l'intestin grêle

Avant de décrire plus spécifiquement le développement de l'épithélium et du SNE de l'intestin grêle, il nous a paru opportun de rappeler brièvement le développement embryonnaire général de l'intestin ainsi que son histologie normale chez l'Homme et chez le rat.

II.3.1. Rappel embryologique

La compréhension de l'anatomie de l'appareil gastro-intestinal est facilitée par la compréhension de son développement. L'assise épithéliale du tractus gastro-intestinal est dérivée du feuillet endodermique. La formation du tube digestif endodermique est sous la dépendance des plicatures transversales et longitudinales de l'embryon qui réalisent ainsi la délimitation de l'embryon (5^e SA). Une fois incorporé dans l'embryon, ce feuillet endoblastique va former l'intestin primitif. Outre l'assise épithéliale du tube digestif et de l'appareil respiratoire, l'endoderme est également à l'origine des cellules parenchymateuses du foie et du pancréas, de la thyroïde, des parathyroïdes et de l'épithélium de la muqueuse vésicale. Dans le même temps, au moment de la gastrulation, le feuillet splanchnique de la lame latérale mésodermique s'accolé à l'endoderme. Ce mésoderme splanchnique va donner naissance au tissu conjonctif, au muscle lisse et au péritoine viscéral de l'intestin. Il va également servir de tissu de soutien à la migration des cellules de la crête neurale, en exprimant, comme nous le verrons ultérieurement de nombreux facteurs trophiques. Une fois constituée, l'ébauche intestinale primitive peut être arbitrairement divisée en trois parties : l'intestin antérieur, l'intestin moyen et l'intestin postérieur. C'est l'intestin moyen⁽⁵⁶⁾ qui, étant à l'origine du segment de tube digestif

allant de la seconde moitié du duodénum à la fin du deuxième tiers du colon transverse, nous concerne ici (Fig. 2). Ce segment intestinal est vascularisé par l'artère mésentérique supérieure.

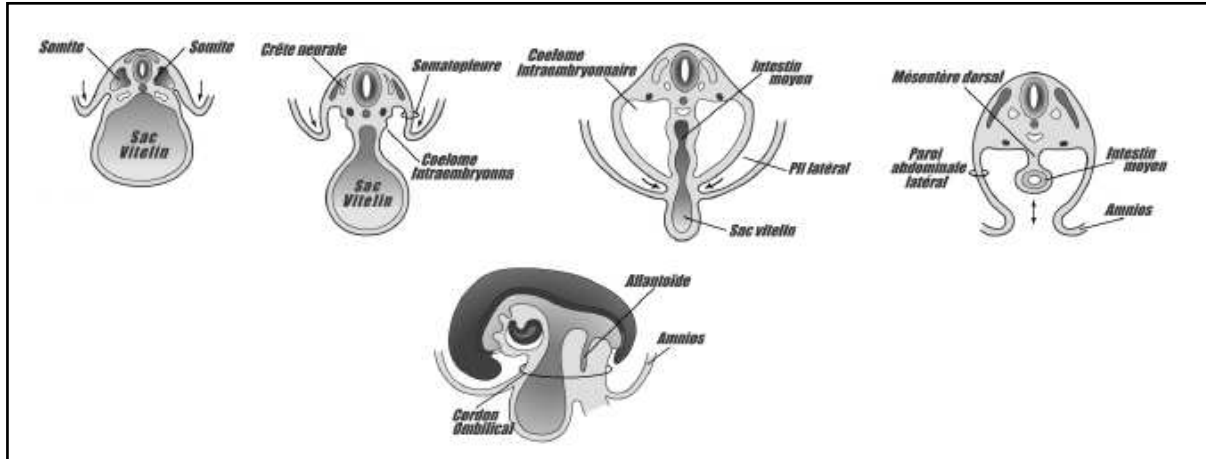


Fig. 2 : Schéma illustrant la formation de l'intestin moyen à l'aide de sections transversales d'embryons effectuées au cours de la 6^e SA.

II.3.2. Rappel de histologie normale de l'intestin grêle mature

Nous allons décrire l'histologie conventionnelle de l'intestin grêle, description qui permettra de mieux appréhender la finalité du développement embryonnaire de l'intestin.

II.3.2.A. Fonctions du tube digestif

Le tube digestif (TD) exerce essentiellement 3 types de fonctions : des fonctions digestives, des fonctions immunitaires et des fonctions endocrines. Les fonctions digestives sont assurées par les 3 constituants majeurs de la paroi digestive : (i) l'épithélium de revêtement qui participe au transit des aliments et à

l'absorption des nutriments, (ii) les glandes exocrines du TD qui protègent et lubrifient les parois du TD et participent à la dégradation des aliments, (iii) la musculature lisse du TD qui permet la progression et le brassage mécanique des aliments. Les organes lymphoïdes du TD assurent les fonctions immunitaires. Les fonctions endocrines sont assurées par les cellules endocrines disséminées dans l'épithélium du TD et qui sécrètent des hormones digestives (Fig. 3)

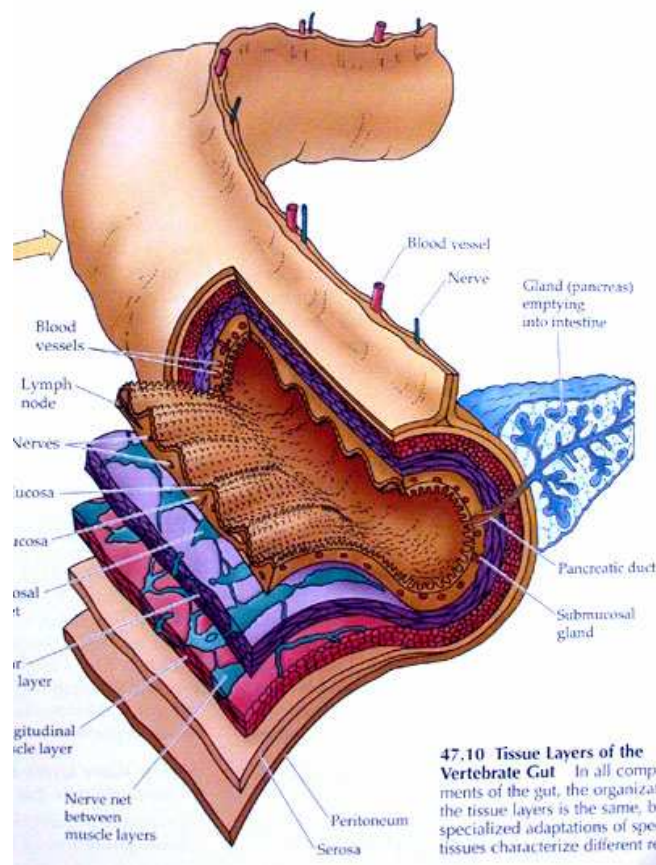


Fig. 3 : représentation histologique de l'intestin grêle mettant en évidence les différentes tuniques concentriques.

II.3.2.B.L'épithélium

Il s'agit d'un épithélium d'absorption prismatique simple constitué d'entérocytes et accueillant des cellules glandulaires isolées, les cellules calciformes et des cellules neuro-endocrines.

(1) Les entérocytes

Ils présentent une différenciation de leur pôle apical sous forme de microvillosités s'organisant en plateau strié. La fonction des entérocytes est l'absorption digestive des nutriments (c'est-à-dire des glucides, des protides, et des lipides). De nombreuses enzymes sont présentes soit dans la membrane plasmique des microvillosités, soit dans le glycocalyx qui les recouvre. Ces enzymes vont permettre d'achever l'hydrolyse des protides en acides aminés qui seront pris en charge par des transporteurs spécifiques de la membrane plasmique apicale.

(2) Les cellules calciformes

Ce sont des cellules glandulaires à sécrétion muqueuse participant à la lubrification du tube digestif.

(3) Les cellules neuro-endocrines

Elles sont aussi groupées sous le terme générique de cellules entérochromaffines (nommées ainsi parce qu'elles ont une localisation entérique i.e intestinales et sont visibles en microscopie optique à l'aide d'une réaction chromaffine). Les cellules endocrines du TD sont dispersées dans l'ensemble de l'épithélium digestif mais sont particulièrement nombreuses au niveau de l'intestin grêle et de l'appendice. Elles présentent un pôle basal renflé reposant sur la lame basale de l'épithélium et un pôle apical effilé qui peut atteindre ou non la lumière du

TD. Leur cytoplasme est caractérisé par la présence de granulations arrondies, regroupées au pôle basal de la cellule et qui sont les structures chromaffines reconnues en microscopie optique. Le produit de sécrétion des cellules entérochromaffines est de nature hormonal, est déversé dans les capillaires sanguins et agit ainsi sur des cibles situées à distance tel que le pancréas, la vésicule biliaire ou le cerveau. Le type d'hormone sécrétée dépend de la localisation des cellules au sein du TD et comprend notamment la gastrine, la sérotonine et la cholécystokinine.

(4) L'organisation de l'épithélium au niveau de l'intestin grêle

Les entérocytes sont beaucoup plus abondants que les cellules caliciformes et leur plateau strié constitue le dernier niveau d'un dispositif complexe d'amplification de la surface d'absorption. Ce dispositif comprend : i) les anses intestinales : replis de l'intestin, ii) les valvules conniventes : plis transversaux permanents de la muqueuse et de la musculaire muqueuse, avec un axe sous-muqueux, iii) les villosités intestinales : expansions en doigt de gant de la muqueuse présentant un axe conjonctif qui contient des cellules musculaires lisses et des vaisseaux sanguins et lymphatiques, iv) les microvillosités du plateau strié des entérocytes.

II.3.2.C. La musculature du tube digestif

La musculature du TD assure la motricité digestive et comporte deux tuniques. La musculature est une tunique épaisse située entre l'adventice et la sous-muqueuse. Elle comprend une couche interne de fibres musculaires circulaires et une couche externe de fibres musculaires longitudinales. Ces deux couches

entourent le plexus nerveux myentérique. La musculaire muqueuse est au contraire une tunique mince localisée entre la muqueuse et la sous-muqueuse.

II.3.2.D.L'innervation

On distingue une innervation intrinsèque et une innervation extrinsèque.

(1) L'innervation intrinsèque

Ces cellules nerveuses sont organisées en réseaux de cellules interconnectées appelés plexus qui présentent une activité automatique, spontanée. Elle sont organisées en plexus : constitué du plexus myentérique (plexus d'Auerbach) et du plexus sous-muqueux (plexus de Meissner)⁽⁵⁷⁾. Le plexus sous-muqueux a été divisé par certains auteurs en 3 sous-plexus : le plexus interne sous-muqueux (le plexus de Meissner), directement sous la musculature muqueuse, le plexus sous-muqueux extérieur directement au contact de la couche musculaire circulaire (plexus de Schabadash ou de Henlé) et un plexus intermédiaire localisé entre ces deux plexi⁽⁵⁸⁾. Pour d'autres, il serait également possible d'individualiser un plexus muqueux, le plexus d'Isawa. Elle régule, nous le verrons plus en détail ultérieurement la sécrétion glandulaire, l'état de vasodilatation ou de vasoconstriction des vaisseaux sanguins ainsi que la contractilité de la musculature lisse de l'intestin.

(2) L'innervation extrinsèque

Elle dépend du système nerveux végétatif (ou système nerveux autonome) dont les cellules nerveuses sont localisées au niveau des plexus abdominaux. Les fibres nerveuses issues de ces plexus font synapse au niveaux des plexus nerveux de l'innervation intrinsèque et contrôlent leur activité. Ainsi les fibres sympathiques

envoient des influx inhibiteurs et les fibres parasympathiques envoient des influx excitateurs. Le système nerveux autonome répond lui-même à une régulation dépendant de centres supérieurs localisés notamment au niveau de l'hypothalamus. Cette riche innervation digestive explique les liens étroits entre les émotions, le stress et certains dysfonctionnements de l'appareil digestif.

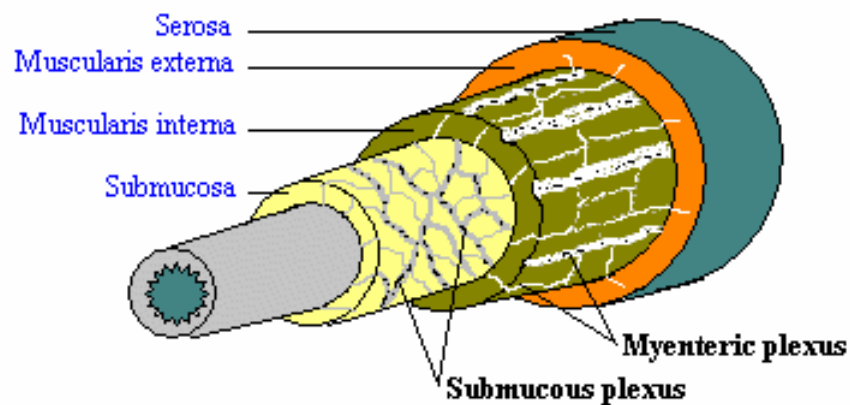


Fig. 4 : Localisation des 2 principaux plexus intestinaux, le plexus myentérique (Auerbach) et le plexus sous-muqueux (Meissner).

II.3.2.E. La vascularisation

Nous l'avons vu dans la partie embryologique, c'est l'artère mésentérique supérieure qui perfuse l'intestin grêle. Au niveau de la paroi du TD, des artères perforantes pénètrent dans la paroi de l'intestin grêle, se dirigent vers la muqueuse ou elle se divisent en artérioles puis en capillaires. De ce réseau capillaire partent des veinules qui fusionnent en veines dans la sous-muqueuse et traversent la musculature et l'adventice.

II.3.2.F. Les vaisseaux lymphatiques

La circulation lymphatique de l'intestin grêle est caractérisée par la présence au sein de chaque villosité intestinale d'un capillaire lymphatique en cul de sac nommé le chylifère central. Cette circulation est anastomosée au réseau lymphatique qui se draine dans les follicules lymphoïdes du TD.

II.4. Développement histologique des différentes structures

Nous allons maintenant tenter de décrire les mécanismes impliqués tant au niveau épithélial qu'au niveau neuromusculaire permettant d'aboutir aux structures que nous venons de présenter. En effet pour mettre en évidence d'éventuelles anomalies induites par une interruption anté-natale du tube digestif, il faut d'abord connaître le développement normal de ces structures.

II.4.1. Développement épithélial

II.4.1.A. Chez l'Homme

L'épithélium intestinal se développe à partir de l'endoderme. Chez l'homme, jusqu'à la 8^e SA, l'intestin primitif est un tube plein qui va progressivement se perméabiliser selon un gradient cranio-caudal. Les premières villosités apparaissent au niveau du duodénum à partir de la 10^e SA et au niveau de l'iléon terminal à 16 SA. Parallèlement, l'ébauche épithéliale qui est pluristratifiée à 10 SA se transforme en un épithélium cylindrique monostratifié à 14 SA.

II.4.1.B. Chez le rat

Chez le rat, la différenciation de l'intestin grêle survient relativement tardivement au cours des 22 jours de gestation⁽⁵⁹⁾. La muqueuse duodénale, aux alentours du 15^e jour de gestation est composée de cellules relativement indifférenciées, stratifiées en 2 ou 3 couches dérivant de l'endoderme, qui entourent une lumière étroite. Durant les 2 ou 3 jours suivants (J16-J17) la lumière s'agrandit et l'épithélium comporte entre 4 et 8 épaisseurs de cellules. Au 19^e jour, il existe des villosités bien formées, reposant sur une seule couche de cellules épithéliales encore capables de se diviser⁽⁶⁰⁾. Cependant, le développement au niveau des cryptes est incomplet avec la persistance d'un épithélium stratifié dans la région inter-villeuse. Les villosités sont la résultante de la confluence de petites lumières secondaires qui apparaissent à J17 et J18 au sein de longs complexes de jonction qui se forment entre des cellules adjacentes de l'épithélium stratifié⁽⁶¹⁾.

II.4.1.C. Molécules impliquées dans le développement épithélial

Cette différenciation tissulaire résulte d'interactions entre d'une part les cellules d'origine endodermique et d'autre part entre l'endoderme et le mésenchyme intestinal à travers des récepteurs d'adhésion⁽⁶²⁻⁶⁶⁾:

1/ les cadhérines⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾ (en particulier la E-cadhérine) présentes aux faces basolatérales des cellules entérocytaires, permettent à travers des interactions homophiliques l'assemblage des cellules épithéliales et la formation de jonctions intercellulaires (desmosomes et jonctions adhérentes),

2/ les intégrines^(67, 70, 71), (en particulier $\alpha 6\beta 4$) sont des protéines transmembranaires qui en interagissant avec les protéines de la matrice

extracellulaire (MEC), contribuent à l'ancrage des cellules épithéliales dans la membrane basale et à leur différenciation,

3/ les laminines^(62, 67, 71) dont la laminine de type 1, sont des composants de la MEC concentrés au niveau de la membrane basale des cellules épithéliales et endothéliales. Elles se fixent sur l'intégrine $\alpha 6\beta 4$. En leur absence⁽⁷²⁾, il n'y a pas de formation de la membrane basale, ni de différenciation fonctionnelle des entérocytes.

D'autres molécules participant à la différenciation entérocytaire, témoignent de la présence d'une bordure en brosse organisée et fonctionnelle:

- la villine⁽⁷³⁾, une protéine du cytosquelette de la surface épithéliale, est nécessaire à l'organisation de la bordure en brosse de la surface épithéliale,
- la lactase^(74, 75), enzyme digestive principale de la bordure en brosse (son rôle est de digérer le lait) dont l'apparition est sous le double contrôle de la villine et des laminines.

II.4.2. Développement du système nerveux entérique

Le SNE est, nous l'avons vu avec les modèles expérimentaux, une des cibles potentielles d'étude des répercussions d'une obstruction anténatale du tube digestif sur la motricité intestinale. Il s'avère qu'il s'agit d'une structure qui parallèlement à notre thématique de recherche est l'objet de très nombreuses études avec près de 300 publications rapportées au SNE en 2007 (source : enteric nervous system, Pubmed du 1/01/2007 au 31/12/2007). En effet, le SNE présente plusieurs particularités : un mode de développement embryonnaire original, une relative autonomie par rapport au SNC et enfin une implication dans diverses maladies de

l'enfant et de l'adulte (de la maladie de Hirschsprung au colon irritable en passant par la maladie de Crohn) à l'origine de recherches pharmacologiques très avancées. Nous nous proposons de décrire dans une première partie, les grandes lignes du développement du SNE, puis dans une seconde partie, nous nous intéresserons aux mécanismes de contrôle du SNE, une fois sa mise en place terminée. En effet, en revenant à notre thématique de recherche, une interruption prénatale du tube digestif, peut potentiellement interférer avec ces deux étapes. Il est donc important de connaître l'agencement normal de ces étapes si l'on veut tenter d'en déceler les anomalies dans le cadre de notre thématique.

II.4.2.A. Migration des cellules de la crête neurale et formation du système nerveux entérique.

Pour former le SNE mature, il est admis que les précurseurs des neurones entériques migrent vers l'ébauche intestinale pour s'y répartir en essaimant uniformément tout le long de l'intestin. Ces cellules doivent également, tout en augmentant leur nombre, subir des différenciations successives afin de pouvoir se différencier en de nombreux sous-types de neurones et de cellules gliales matures⁽⁷⁶⁾. Ces cellules, vont se regrouper en ganglions nerveux reliés les uns aux autres. Ces ganglions, localisés entre les couches musculaires de la paroi intestinale, sont eux même regroupés au sein de deux plexi, le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux. Du fait de la grande distance à parcourir (colonisation de toute la longueur de l'intestin primitif) et du fait de la durée relativement longue pour y parvenir, les progéniteurs du SNE, une sous-population des cellules de la crête neurale (CCN), vont devoir savoir « réagir » face à différents challenges et à différentes priorités et ceci au bon moment et au bon endroit. De nombreuses

équipes essayent d'identifier les signaux cellulaires qui contrôlent la migration, la survie, la prolifération, la différenciation et les interactions cellulaires entre les progéniteurs du SNE. C'est ce que nous allons tenter de décrire à partir des données de la littérature.

II.4.2.B.Colonisation du tube digestif par les cellules de la crête neurale.

Les CCN sont des cellules totipotentes qui, après avoir quitté la crête neurale, vont migrer le long de voies déterminées pour donner naissance à une grande variété de types cellulaires dont les neurones et les cellules gliales du SNE⁽⁷⁷⁾. C'est Mme le Pr Nicole Le Douarin qui, à la fin des années 1960, a montré que les précurseurs des cellules du SNE dérivent de la crête neurale. La progression des CCN a été mise en évidence grâce à la création d'un système de chimère caille-poulet, où il était à l'origine possible de suivre les cellules de caille greffée sur l'embryon de poulet simplement grâce à leur différence de forme et de couleur. Aujourd'hui, les CCN peuvent être identifiées par immuno-marquage⁽⁷⁸⁾. Ainsi il a été montré que les CCN à l'origine des cellules du SNE dérivent d'une partie de la crête neurale adjacente aux somites 1-7, la crête neurale vagale. Un contingent plus distal à destination de l'intestin postérieur a été mis en évidence vers la 28^e paire de somites. Cette migration des CCN s'opère dans un premier temps de manière dorso-ventrale en s'éloignant du tube neural pour rejoindre la partie antérieure de l'intestin primitif avant de le coloniser en entier selon un gradient rostro-caudal. Ainsi, la totalité du tube digestif est colonisée par les CCN au 8,5^e jour post fécondation (E8,5) chez le poulet, et au 14^e jour embryonnaire (E14) chez la souris. Chez l'Homme, ces cellules atteignent l'intestin postérieur vers la 7,5^e semaine du

développement (9,5 SA). Ces cellules initialement éparses vont se regrouper pour former les ganglions nerveux, toujours selon ce gradient rostrocaudal avec d'abord le plexus myentérique. Le plexus sous-muqueux est, quant à lui, constitué 2 à 3 semaines plus tard à partir de cellules qui vont migrer du plexus myentérique selon un trajet centripète à travers la couche musculaire.

Jusqu'à présent, cette migration cellulaire était suivie de manière statique et séquentielle sur des coupes histologiques ou des whole-mount d'embryons fixés. Des études récentes ont permis de suivre de manière dynamique la migration des CCN⁽⁷⁹⁾. Les cellules n'ont pas un déplacement homogène et linéaire mais, au contraire, elles opèrent de fréquents changements de direction et des changements de vitesse de migration remettant en cause le dogme de cellules programmées pour rejoindre telle ou telle destination de manière autonome. En effet, ces données suggèrent que la migration de ces CCN se ferait également sous le contrôle des interactions cellulaires avec le micro-environnement et le tissu de soutien⁽⁸⁰⁾. Il a même été possible de calculer la vitesse de migration de ces cellules qui vont de 10-14 $\mu\text{m h}^{-1}$ chez le poulet⁽⁸¹⁾ à 35-45 $\mu\text{m h}^{-1}$ chez la souris⁽⁸²⁾. Ainsi, plus la vitesse de migration d'une cellule est élevée, plus sa destination finale est éloignée⁽⁸⁰⁾.

II.4.3. Voies de régulation de la migration des cellules de la crête neurale dans l'ébauche intestinale.

La formation du SNE est sous la dépendance de l'expression d'un grand nombre de gènes interagissant à différents niveaux pour contrôler les étapes du développement. Ces différentes étapes sont soumises à une double contrainte, chronologique (au bon moment) et spatiale (au bon endroit de la migration)⁽⁷⁷⁾. De

nombreuses molécules sont impliquées dans le développement du SNE. Il y a des voies de signalisation dont les voies de signalisation RET/GFR α 1/GDNF, endothelin receptor-B/endothelin-3, Netrines/DCC, des facteurs de transcription comme Phox2b, Sox10, Pax3, Mash1, Hox11L1 et Sip1, le système de signalisation hedgehog, les neurotrophines et les facteurs de croissance, les bone morphogenetic protein (BMP) dont BMP4, les molécules guidant la croissance axonales, et bien d'autres molécules encore inconnues. Notre but n'est pas de décrire de manière exhaustive tous les mécanismes impliqués dans le développement et la maturation du SNE. Nous avons porté notre attention sur certaines voies de régulation dont les descriptions étaient suffisamment avancées pour, peut être, y voir un intérêt potentiel concernant notre recherche.

II.4.3.A. Rôle des gènes Hox dans le développement de l'intestin embryonnaire

Les gènes homéobox sont un groupe de gènes de contrôle précoce du développement impliqués dans le positionnement et l'agencement des organes dans l'embryon. Ils interviennent en amont de la morphogenèse de l'intestin embryonnaire quand le mésoderme splanchnique rejoint l'endoderme, et que la migration et la maturation des CCN débutent⁽⁸³⁾. Les transcrits de Hox sont présents initialement dans tout le mésoderme du tube digestif, puis ils se limitent progressivement à la couche musculaire longitudinale. Hox a un très fort rôle inducteur puisque il a été montré que l'expression ectopique de Hoxd13 dans du mésoderme d'intestin moyen (au lieu de sa présence habituelle dans l'intestin postérieur) entraîne la différenciation de l'endoderme sous-jacent en endoderme d'intestin postérieur. Ce rôle d'induction doit se faire par des voies de signalisations intercellulaires. Les CNN

se différentient en migrant mais aussi en arrivant au niveau de l'intestin. Durant leur cheminement, elles interagissent avec des facteurs environnementaux dont des facteurs de croissance et des éléments de la matrice extracellulaire (MEC) qui modifient irréversiblement les précurseurs et contribuent à la détermination de leur destin. Deux voies de signalisation sont absolument nécessaires pour assurer la colonisation complète de l'intestin par les CCN : elles sont sous le contrôle de RET et de l'endothélin receptor B (EDNRB).

II.4.3.B. Voies de signalisation

Deux voies de signalisation sont absolument nécessaires pour assurer la colonisation complète de l'intestin par les CCN. Elle font intervenir le complexe RET/GFR α 1/GDNF et celui de l'endothélin receptor-B (EDNRB)/endothélin-3(EDN3). Une troisième voie, NETRIN/DCC, participe à la constitution du plexus sous-muqueux.

(1) Le récepteur tyrosine kinase RET

Le récepteur tyrosine kinase RET est activé par son ligand, le Glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) par l'intermédiaire de son co-récepteur GFR α 1. RET est exprimé dans le SNE et le rein en développement⁽⁷⁷⁾. Des souris dont le gène RET a été inactivé (knock-out pour ce gène) expriment un phénotype d'aganglionose pan-intestinale avec une agénésie rénale létale dans les 24 premières heures de vie. Ceci montre que GDNF a un rôle clé durant la formation du SNE. Il participe au maintien de la survie, à la prolifération des neurones précurseurs du SNE et à leur différenciation en neurones entériques. Les activités trophiques de

GDNF permet qu'il y ait suffisamment de cellules précurseurs pour coloniser toute la longueur du tube digestif et que ces cellules soient restées suffisamment immatures pour pouvoir se différencier. Il a été montré que GDNF était exprimé aussi par des cellules ne dérivant pas des crêtes neurales⁽⁸³⁾. Ces cellules auraient un rôle chimiotactique, mitogène et cytotrophique pour les CCN. Ainsi, pour certains, GDNF serait la force motrice principale, responsable de la migration des CCN⁽⁷⁶⁾. La voie de signalisation de RET, outre son rôle essentiel dans la survie cellulaire, le chimiotactisme, la prolifération et la différenciation aurait un rôle pro-apoptotique dans le développement. En effet, RET aurait un double rôle « de vie et de mort » : en présence de son ligand, il va induire des signaux favorisant la survie cellulaire mais en l'absence du ligand, il va induire des signaux (passivement) en faveur de la mort cellulaire. Il existe des Ac anti-RET disponibles permettant de visualiser en immunohistochimie les cellules de SNE à un stade précoce de leur maturation.

(2) Le complexe EDNRB/EDN3

Le complexe EDNRB/EDN3 est également une voie de signalisation capitale pour le développement du SNE. Il jouerait un rôle pour maintenir les CCN dans un état immature, indifférencié, leur permettant d'effectuer leur migration jusqu'à leur terme normal le long du tube digestif. En effet, si la différenciation survenait trop précocement, peu de cellules seraient capables d'atteindre le rectum. Le récepteur de l'endothéline B (EDNRB) est localisé dans la membrane plasmique des précurseurs des neurones entériques et des mélanocytes. Il peut être activé par chacune des 3 endothélines identifiées (EDN1, EDN2, EDN3), mais seulement EDN3 est connue pour être impliquée dans le développement du SNE. EDN3 est synthétisée par les cellules mésenchymateuses adjacentes aux CCN lorsque elles

colonisent l'intestin et la peau. EDN3 est exprimé à un taux élevé au niveau de l'iléon terminal. L'absence de EDNRB/EDN3 induit une aganglionose et des défauts cutanés (piebaldisme). EDN3 produit par le mésenchyme de l'intestin se lie à EDNRB des CCN entériques pour directement moduler le comportement cellulaire. La voie de signalisation EDNRB/EDN3 a également comme rôle d'induire des modifications de l'expression de neurotransmetteurs et une diminution des neurones du plexus sous-muqueux et des cellules de Cajal. Le facteur de transcription Sox10 est indispensable à la différenciation en cellules gliales entériques⁽⁸⁴⁾. En agissant avec EDNRB, il a été montré qu'il pouvait moduler la pénétrance et le phénotype des aganglionoses obtenues.

Ces deux voies majeures de signalisation, RET et EDNRB, auraient également un rôle en postnatal dans le maintien du SNE après la naissance. En effet, chez des souris hétérozygotes en RET, la diminution de la production de RET aboutit à la réduction de la taille des neurones et du nombre de fibres nerveuses au sein de la paroi intestinale. Ces voies de signalisation ne sont pas tout à fait indépendantes puisqu'elles peuvent avoir des actions synergiques⁽⁸⁴⁾.

(3) La voie de signalisation NETRIN/DCC

En plus d'obtenir l'acquisition d'un phénotype correct, les neurones et la glie du SNE doivent atteindre la bonne destination dans l'intestin. Initialement les CCN prennent des chemins superposables aux autres CCN à destination d'autres sites. Puis elles vont migrer à la surface de l'intestin primitif jusqu'à leur destination, le plexus myentérique ou le plexus sous-muqueux. Comment les cellules « décident-elles » au bon moment d'aller prendre un chemin à angle droit vers la sous

muqueuse pour coloniser le plexus sous-muqueux ? Ce virage se ferait sous l'influence de la présence des nétrines (appartenant à la famille des laminines) secrétées par la muqueuse gastro-intestinale⁽⁸³⁾. Les CCN expriment des récepteurs de la nétrine, le DCC (deleted in colorectal cancer). L'expression de ce récepteur est maximale au niveau où les cellules prennent le virage pour plonger vers le plexus sous-muqueux⁽⁸⁵⁾.

(4) La voie activée par Sonic hedgehog (Shh)

Sonic hedgehog (Shh) est une molécule de signalisation qui joue un rôle phare dans le développement spatial de l'intestin⁽⁸⁴⁾. Shh régule la prolifération et la différenciation des CCN et module, comme nous l'avons vu plus haut, la réponse des CCN à GDNF.

(5) Les Bone morphogenetic proteines (BMP)

Les Bone morphogenetic proteines (BMPs) influencent de nombreux processus du développement sous l'influence de Shh. Des transcrits de BMP-2 et BMP-4 peuvent être détectés dans l'intestin au moment de la différenciation neuronale⁽⁸⁴⁾. Les BMP auraient un rôle freinateur limitant la taille du SNE. Ainsi les voies de signalisation des BMP réguleraient à la fois le nombre de neurones mais aussi leur différenciation cellulaire⁽⁸⁶⁾.

II.4.4. Maturation neuronale

Ayant migré, les CCN vont se différencier en neuroblastes, puis ces neuroblastes vont se transformer en neurones matures, phénomène qui se poursuit bien après la naissance sous l'influence de facteurs alimentaires. La colonisation de l'intestin de souris, commence entre E9 et E9,5. Des neurones différenciés sont présents dans l'intestin antérieur à E12 et atteignent le colon terminal entre E14 et E15⁽⁸⁴⁾.

Chez l'homme⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾, les neuroblastes migrent le long de la couche musculaire interne pour former le plexus myentérique d'Auerbach à 11 SA. Le plexus sous-muqueux de Meissner apparaît plus tard vers le 3^e mois de grossesse et se forme à partir des neuroblastes qui migrent à travers la musculature interne. A la fin du 2^e trimestre, on assiste à la maturation de certains neuroblastes dont le nombre par plexus augmente jusqu'au 8^e mois puis reste stable jusqu'à la naissance alors que la surface de chaque plexus continue à croître.

Vannucchi et al.⁽⁹⁰⁾ ont étudié chez le rat la maturation du SNE par l'intermédiaire d'un anticorps développé contre la choline-acétyltransférase présente au sein des neurones cholinergiques. Quelques neurones positifs sont individualisés à partir de E18 dans l'intestin grêle. Ils sont visibles dans le colon au moment de la naissance. Il s'agit de neurones faiblement colorés avec un gros noyau entouré d'un fin anneau de cytoplasme. Ils sont arrangés en courtes rangées de quelques cellules. Durant l'allaitement (qui dure environ un mois chez le rat), un plus grand nombre de cellules sont marquées et le marquage devient plus intense. Les cellules se regroupent pour former des ganglions composés de 5 à 7 cellules. A J3 et J5 (post-natal), les cellules ont encore un gros noyau mais un cytoplasme plus rare. Il n'y a aucun marquage dans le plexus sous-muqueux à cette date. A J15, les

neurones du plexus myentérique ont un cytoplasme plus abondant avec un noyau plus petit et une ébauche de coloration est visible au niveau du plexus sous-muqueux de l'iléon et du colon. A J21, date du début de sevrage, les cellules marquées du plexus myentérique ont une forme irrégulière et sont principalement visibles dans le plexus myentérique regroupées en ganglions constitués de 3 à 5 neurones. Par contre, les cellules positives du plexus sous-muqueux sont encore immatures, rondes avec un gros noyau.

Chez les rats devenus adultes (âgés de 3 mois), l'aspect est identique à ce qui est vu à 3 semaines avec en plus l'apparition de fibres nerveuses marquées très intensément qui cheminent parallèlement à la couche musculaire longitudinale externe. Des fibres nerveuses sont également visibles entre les deux plexus ganglionnaires. Dans le plexus sous-muqueux, les ganglions étaient de plus petite taille puisque composés de 2 ou 3 cellules marquées. Ainsi, la différenciation du SNE n'est pas terminée à la naissance. Elle se poursuit après celle-ci, certainement sous l'influence de facteurs exogènes alimentaires.

Les différentes étapes du développement du SNE chez le rat, suivent la même chronologie que chez l'Homme, et on peut considérer que la fin du premier trimestre et le début du second trimestre de grossesse chez l'Homme (fin de l'organogenèse) peuvent être comparés au 10^e jour de gestation sur les 22 jours de celle du rat⁽⁹¹⁾.

II.4.5. Architecture interneuronale

Nous nous proposons d'appréhender dans ce paragraphe, les relations du SNE avec le SNC, puis nous détaillerons les différentes attributions des neurones du système nerveux entérique. Enfin, nous décrivons l'unité élémentaire du réflexe

intestinal primaire, le neurone intrinsèque primaire afférent de l'intestin. En effet, il nous semble possible qu'une atrésie intestinale puisse modifier ces différentes composantes structurelles.

II.4.5.A. Relations entre le système nerveux central et le système nerveux entérique

Bien que le SNE puisse évoluer de manière autonome, il garde de nombreuses connections avec le SNC. Un réseau de fibres afférentes au SNC apporte des informations sensibles du SNE au SNC où la fonction réflexe intestinale est coordonnée et analysée pour une réponse adaptée. Ces fibres apportent aussi des informations sensorielles intestinales (comme la sensation de faim, la satiété, la douleur d'une distension intestinale) (Fig. 5).

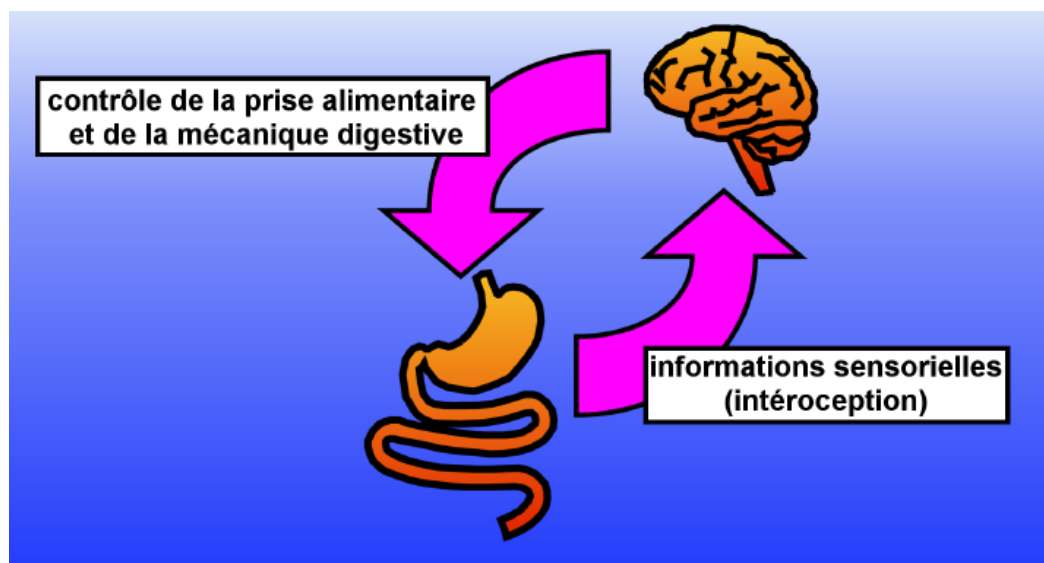


Fig 5 : L'axe tube digestif cerveau, principe de fonctionnement. Le système nerveux central s'informe des événements ayant lieu en périphérie via les systèmes de la viscérosensibilité ou intéroception, en réponse il peut moduler l'ingestion ou certains paramètres de la digestion.

Ces fibres suivent différentes voies en dehors du tube digestif pour rejoindre le SNC : la partie proximale du tube digestif est prise en charge par des fibres vagales, la partie distale par des fibres pelviennes. Entre ces 2 extrémités intestinales, ce sont les nerfs splanchniques qui font le relais. Il s'agit d'un système moins élaboré que le système vagal ou pelvien car la partie médiane de l'intestin est moins soumise à des sensations de distension ou de douleurs que les extrémités (Fig. 6).

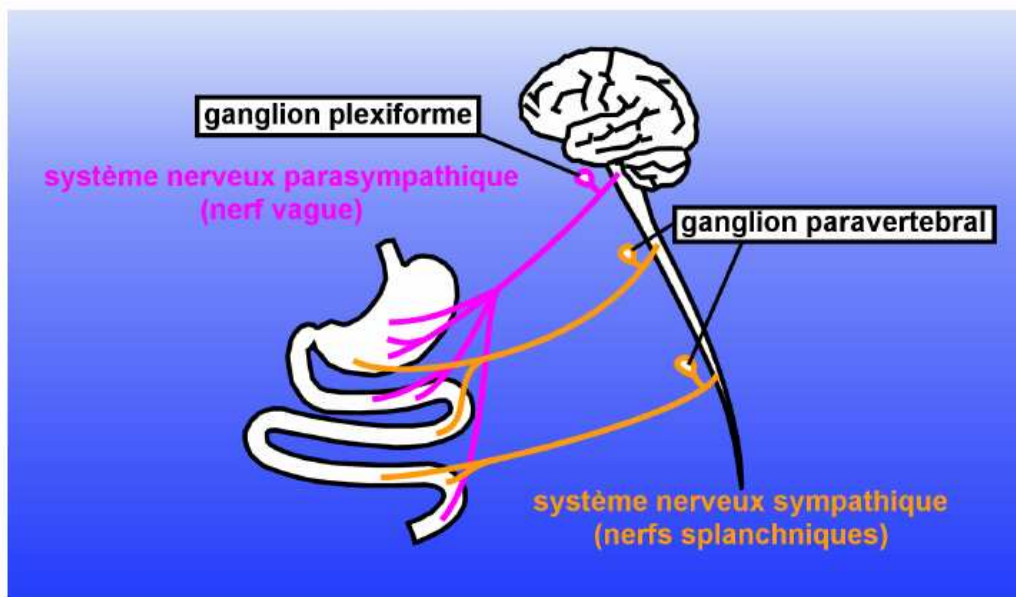


Fig. 6 : L'axe tube digestif-cerveau, surveillance du tube digestif par le système nerveux autonome : Deux composantes du système nerveux autonome relient le tube digestif au système nerveux central. Une première innervation sympathique implique les différents nerfs splanchniques. L'innervation parasympathique est principalement le fait du nerf vague.

Les fibres afférentes naissent de trois localisations au sein de la paroi intestinale⁽⁹²⁾ (Fig. 7):

- une population naît de la séreuse et court le long du mésentère en compagnie des vaisseaux sanguins et lymphatiques.

- une autre est issue de la couche musculaire externe, en établissant des connections avec le plexus myentérique,
- le troisième contingent, naît de la lamina propria, situation privilégiée d'où il peut détecter le matériel absorbé par les cellules de la muqueuse intestinale ou ce qui est synthétisé par les neuro-endocrines.

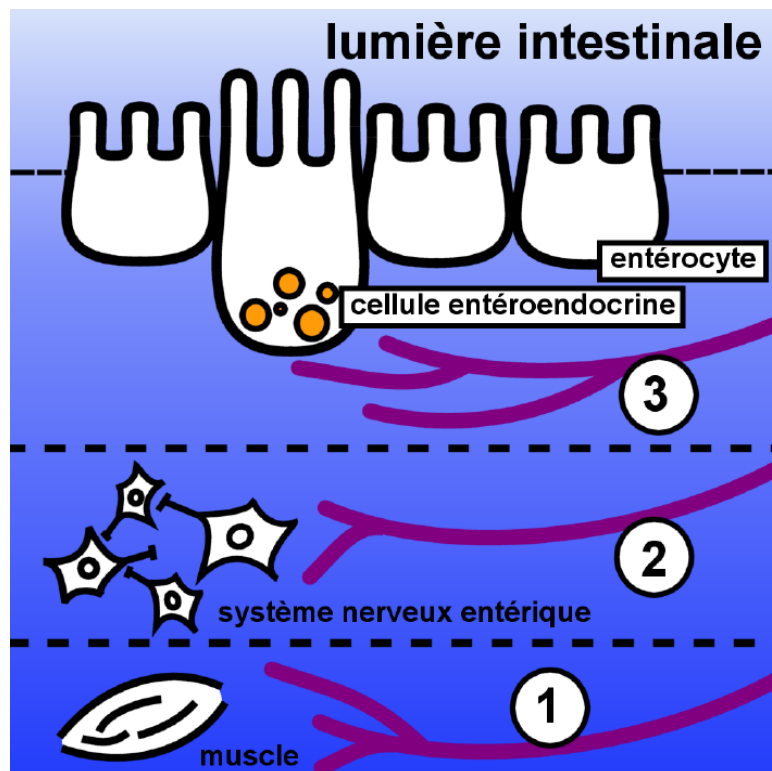


Fig. 7 : Les modalités de l'innervation de l'intestin par le nerf vague. (1)

Le nerf vague innerve les muscles circulaires et longitudinaux situés autour de l'intestin. (2) Le nerf vague établit des connexions avec le système nerveux entérique. (3) Des terminaisons libres s'étendent jusque dans le voisinage proche des cellules entéro-endocrines juste sous la muqueuse intestinale.

Ces 3 types d'afférences sont soumises, chacune à leur niveau, à des stimulations mécaniques ou chimiques. Au niveau de la séreuse, la stimulation

survient quand le mésentère est étiré ce qui se produit rarement et tardivement uniquement en alerte pour des distensions très importantes, le plus souvent pré-perforatives. Au niveau du contingent musculaire externe, la réponse sera obtenue pour des stimulations d'intensités physiologiques. Au niveau de la muqueuse, le stimulus n'est pas la distension ou la contraction pariétale, mais la déformation mécanique de la muqueuse en réponse au matériel contenu dans la lumière intestinale par l'intermédiaire des cellules neuro-endocrines.

II.4.5.B. Organisation interne du système nerveux entérique

De nombreux types de neurones, différents par leur morphologie et leur fonction, sont présents au sein du SNE. Leur nombre est identique à celui de la moelle épinière et est évalué à 10^8 cellules regroupées dans les 2 principaux plexus⁽⁸⁴⁾. La plupart des neurotransmetteurs exprimés par le SNC sont présents dans les neurones du SNE. Plus de 16 populations cellulaires neuronales ont été identifiées et classées selon leur morphologie, leur contenu en neuro-transmetteur ou en fonction de leurs propriétés électrophysiologiques⁽⁷⁷⁾.

Le rôle du SNE est de réguler la motilité réflexe intestinale, de coordonner les processus de sécrétion et d'absorption, de contrôler le débit sanguin et enfin de moduler les fonctions immunes et endocrines intestinales. A la différence de l'innervation des autres organes, le SNE présente une indépendance considérable vis-à-vis du SNC le rendant capable de générer une activité réflexe en l'absence de stimulations cérébrales ou médullaires. Cette activité autonome est rendue possible par la présence de circuits interneuronaux locaux constitués de neurones sensitifs, de neurones intrinsèques afférents primaires (que nous détaillerons plus loin), d'interneurones ascendants et descendants et de motoneurones excitateurs et

inhibiteurs. Ces derniers sont localisés dans le plexus myentérique et innervent les couches musculaires longitudinales et circulaires. Dans l'intestin grêle de cochon d'inde, les motoneurones entériques inhibiteurs à destination de la couche musculaire représentent environ 12% et les motoneurones excitateurs 10% du nombre total des neurones du plexus myentérique⁽⁹³⁾. Les interneurones et les motoneurones ont les mêmes propriétés de base : ce sont tous des S-neurones avec une prédominance des potentiels synaptiques excitateurs rapides (EPSPs)(fast excitatory synaptic potentials) et ils sont uni-axonaux. Les neurones intrinsèques sensitifs afférents primaires sont des AH/Dogiel type II neurones c'est à dire multi-axonaux, avec un potentiel d'action lié au Calcium, et généralement suivi par un potentiel prolongé après hyperpolarisation⁽⁹³⁾.

Ces neurones, nous l'avons vu s'organisent en plexus, reliés aux ganglions sympathiques et au système nerveux central⁽⁹⁴⁾. Classiquement, le plexus myentérique est considéré comme le régulateur de l'activité musculaire intestinale (contraction/relaxation). Cependant, certains neurones du PM, vont se diriger vers la muqueuse sans action directe sur la musculature. De même, il est classiquement décrit que le plexus sous-muqueux de Meissner régule les fonctions de la muqueuse avec en particulier la sécrétion d'électrolytes. Cette action n'est pas non plus univoque, car certains neurones du plexus sous-muqueux innervent la couche musculaire interne. Ainsi, il n'y a pas de réseaux cloisonnés mais des interactions entre les différents systèmes⁽⁵⁷⁾ grâce à un réseau de fibres nerveuses reliant chaque ganglion entre eux, mais aussi avec ceux des autres plexi⁽⁹⁵⁾.

II.4.5.C. Les neurones intrinsèques primaires afférents

(1) Définition

Une classe particulière de neurones, spécifiques du SNE a été identifiée : les neurones intrinsèques primaires afférents de l'intestin (IPANs ; intrinsic primary afferent neurones). Ce sont des neurones hautement différenciés qui transmettent de l'information sur l'état de l'intestin en convertissant des stimuli mécaniques et chimiques qui reflètent la tension de la paroi abdominale et la nature chimique de son contenu. Ils sont connectés avec des interneurones et des motoneurones dans l'intestin. Ils représentent le premier neurone du circuit réflexe intrinsèque entérique qui influence la motilité, la sécrétion et le débit sanguin, les 3 rôles principaux du SNE⁽⁹⁶⁾. Classiquement dans le système nerveux, on décrit deux types de neurones afférents : les neurones afférents primaires qui transmettent une information sur un état sans qu'intervienne la notion de sensation et des neurones afférents sensitifs qui transmettent des sensations comme la douleur ou la chaleur. Les IPANs ont la particularité d'assurer ces deux fonctions. Ils ont également un rôle efférent en sécrétant des transmetteurs vers l'épithélium. Le corps cellulaire de ces neurones reçoit également des synapses excitatrices, ce qui en fait des interneurones (Fig. 8).

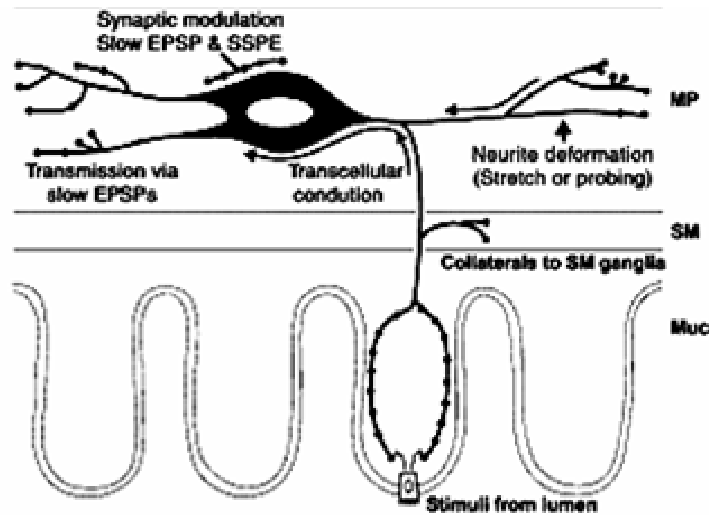


Fig. 8 : représentation schématique d'un neurone afférent primaire (**IPAN**) : ses ramifications se dirigent vers la muqueuse (**Muc**), le plexus sous-muqueux (**SM**) et le plexus myentérique (**MP**).

(2) Rôle des IPANs

Les IPANS, pour déclencher les réflexes entériques (c'est-à-dire être capables de coder les stimuli sensoriels, d'intégrer l'information et d'innervé de manière motrice le muscle et la muqueuse) répondent à des stimuli qui doivent avoir un certain seuil. Comme un potentiel d'action, la réponse nerveuse est proportionnelle à l'intensité du stimulus puis va passer un seuil déclencheur et donner une réponse nerveuse. En deçà de ce seuil, ou si le stimulus n'est pas le bon, ces neurones ont un niveau d'activité très bas. Ils sont sensibles aux phénomènes de distorsion mécanique de la muqueuse. Ils jouent parfois un rôle de nocicepteurs en déclenchant sous l'effet de stimuli nocifs des réponses protectrices. La réponse (exemple: la diarrhée) peut durer plusieurs jours à la différence des réponses nerveuses des autres nerfs qui dans ce contexte de stimuli nociceptifs ne se prolongent pas.

(3) Facteurs stimulant les IPANs

Le SNE régule, nous l'avons vu, le débit sanguin entérique, les activités de contraction et de relâchement musculaire ainsi que les activités de sécrétion épithéliale des phases de digestions et des phases inter-prandiales. Cette régulation est soumise aux contrôles sympathiques et parasympathiques (dont les neurones sont localisés en dehors du tube digestif) et aux stimuli en provenance du tube digestif. Ces stimuli, reçus par les IPANs, sont de 2 ordres, mécaniques ou chimiques (Fig. 9).

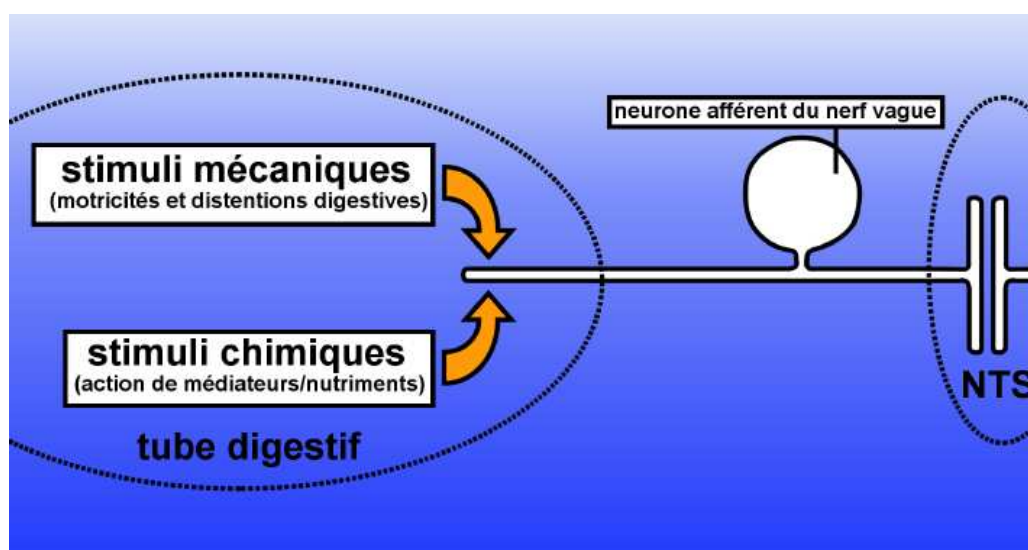


Fig. 9 : Contrôle du tube digestif par le nerf vague. Les informations transmises vers le noyau du tractus solitaire (NTS) ont deux origines différentes (1) une d'origine mécanique relatives à la distension gastrique ou aux mouvements de l'intestin (2) une origine chimique générée par les médiateurs comme la CCK à partir des cellules neuro-endocrines.

Les neurones entériques ont la particularité d'être directement exposés aux contraintes mécaniques qu'ils régulent ce qui est assez rare⁽⁸⁴⁾. En effet, en dehors du SNE, les neurones transmettent des informations nociceptives, mais habituellement ils n'y sont pas directement confrontés. Ces contraintes s'appliquent alternativement soit directement sur les neurones soit à partir des cellules entéro-endocrines qui jouent le rôle de mécano-capteurs (Fig .10).

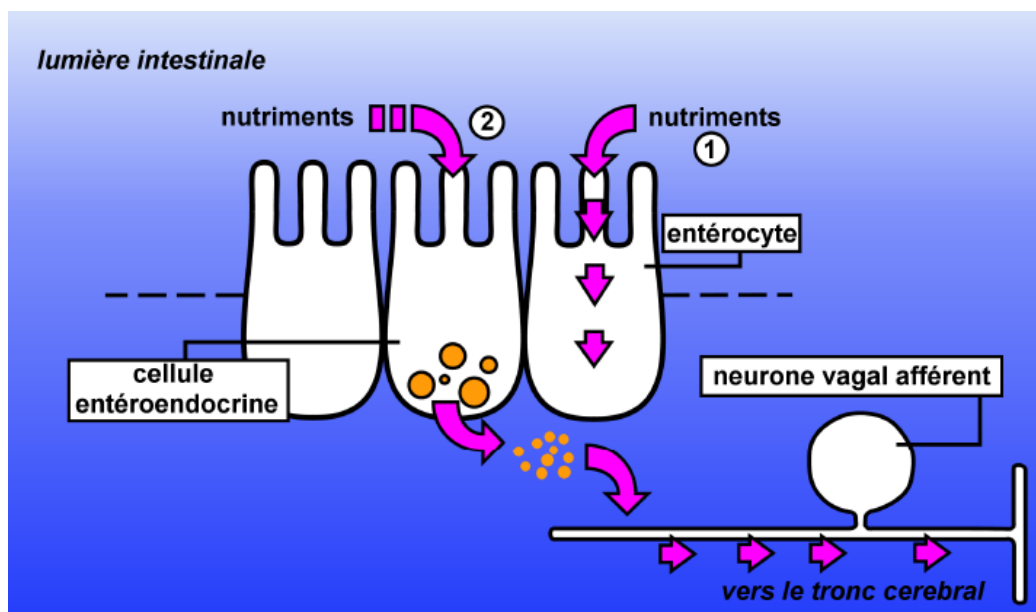


Fig. 10 : Les cellules neuroendocrines à l'interface entre la lumière intestinale et le SNE. 1) Au cours de leur passage dans l'intestin les nutriments sont absorbés à travers lamuqueuse intestinale. 2) De surcroît, les nutriments sont détectés et déclenchent la libération de médiateurs dans les cellules entéroendocrines. Ces médiateurs influencent l'activité du nerf vague et signalent ainsi au cerveau la présence spécifique de nutriments.

Les axones terminaux sont en contact étroit mais ne traversent pas la membrane basale et sont dans une position idéale pour détecter les substances,

(nutriments ou médiateurs) sécrétées par les cellules neuro-endocrines ou les cellules de la lamina propria dont les plaquettes, les leucocytes, les lymphocytes, les macrophages, les cellules gliales, les fibroblastes et les cellules des vaisseaux sanguins. Les cellules neuroendocrines⁽⁹⁷⁾ sont les candidates à ce rôle de mécanorécepteur car elles sont connues pour synthétiser des médiateurs paracrines en fonction du contenu de la lumière intestinale. Les mécanismes exacts restent cependant inconnus (Fig.11).

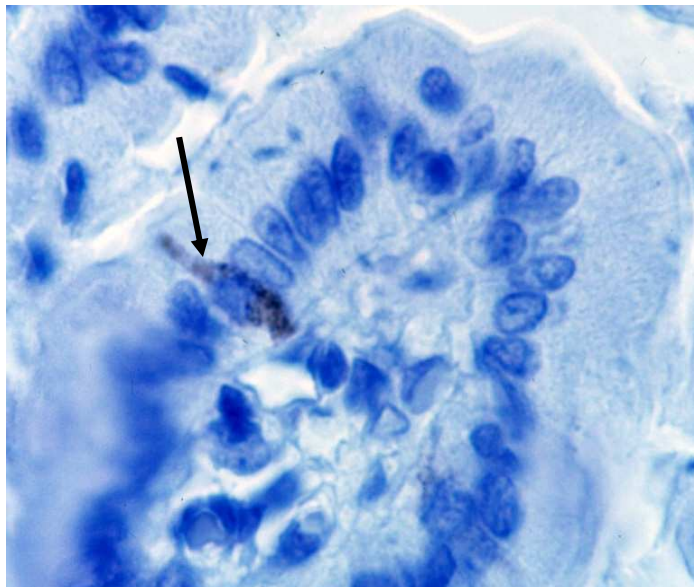


Fig. 11 : vue en microscopie optique d'une cellule neuro-endocrine d'intestin grêle de rat à E21. (Ac anti-synaptophysine X1250).

Ainsi, ces IPAN ont des caractéristiques propres et sont à différencier des interneurons et des motoneurons. Ainsi, l'atrésie, en supprimant la circulation du bol alimentaire en aval, doit interférer avec les influx reçus par les IPAN, avec peut être une action sur les autres neurones du SNE.

II.4.5.D. Les neuromédiateurs

Il est difficile d'attribuer à un type de neurones un type de neuromédiateur en particulier. En effet, un des éléments de la plasticité neuronale est la capacité qu'ont les neurones de modifier leurs neuro-transmetteurs en fonction des stimuli qui les affectent⁽⁹⁸⁾. La plupart de ces médiateurs sont utilisés comme marqueurs immunohistochimiques du SNE.

(1) Les motoneurones excitateurs

Les tachykinines (TK) sont des cotransmetteurs qui agissent avec l'acétylcholine (ACh) des motoneurone excitateurs⁽⁹³⁾.

(2) Les motoneurones inhibiteurs

Ces neurones utilisent eux aussi de multiples transmetteurs, en fonction de la localisation intestinale. On note ainsi la présence en tant que médiateurs de la transmission neuromusculaire inhibitrice de l'ATP, du NO (oxyde d'azote), du VIP (vasoactive intestinal peptide) et de PACAP (pituitary adenylyl cyclase activating peptide). Le VIP est neuroprotecteur du SNE et du SNC⁽⁹⁸⁾. Cet effet serait médié par un grand nombre de cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, TNF- α) des chémokines et des facteurs de croissance comme la neurotrophine-3.

(3) Activation des motoneurones de la couche musculaire circulaire interne

On différencie les motoneurones excitateurs et les inhibiteurs.

(a) L'activation des motoneurones excitateurs du muscle circulaire

L'activation de ces motoneurones excitateurs induit une dépolarisation (c'est-à-dire un potentiel de jonction excitateur EJP) et une contraction du muscle lisse. La réponse est médiée par ACh et Tk. Les faibles niveaux de stimulation activent préférentiellement la composante cholinergique de la transmission qui est médiée par les cellules interstitielles de Cajal (ICC) ; des hauts niveaux de stimulation activent les voies des TK, qui sont inhibées par les récepteurs antagonistes NK1 et NK2 suggérant un rôle pour à la fois la substance P et la neurokinine A. Les récepteurs NK2 sont localisés au niveau des cellules musculaires lisses alors que les NK1 sont sur les ICC suggérant une transmission vers le muscle lisse à la fois directe et indirecte via les ICC intra-musculaires⁽⁹⁹⁾.

(b) L'activation des motoneurones inhibiteurs du muscle circulaire

L'activation des motoneurones inhibiteurs entraîne une hyperpolarisation (c'est à dire un potentiel de jonction inhibiteur IJP) et une relaxation du muscle lisse. Dans de nombreuses espèces, le IJP implique à la fois une composante rapide et une lente. Le rapide est médiée par l'ATP ou le NO, alors que la composante lente est médiée par le NO, le VIP, ou le PACAP en fonction des espèces.

(4) L'innervation de la couche musculaire longitudinale

Elle est moins connue. La majorité des neurones sont cholinergiques et contiennent aussi des TK. Ils n'ont pas de projection préférentielle le long de l'intestin

à la différence des neurones du muscle circulaire. Ils sont aussi innervés par des neurones moteurs inhibiteurs qui contiennent du VIP et du NO.

(5) Les interneurones

(a) Les interneurones ascendants :

Les interneurones ascendants sont, chez le cochon d'inde, immunoréactifs pour la choline acétyltransférase (ChAT), la calrétinine et la substance P.

(b) Les interneurones descendants

Il y a chez le cochon d'Inde au moins trois classes d'interneurones descendants, chacun avec ses caractéristiques d'entrée et de sortie. Les interneurones immunoréactifs pour NOS, VIP, gastrin-releasing peptide (GRP) reçoivent leur stimulation de neurones sensitifs locaux ; d'autres interneurones immunoréactifs pour Nos et des interneurones immunoréactifs pour la somatostatine (SOM).

(6) Neurotransmetteurs cholinergiques

L'innervation cholinergique est la composante excitatrice la plus importante du SNE chez les mammifères. L'acétylcholine (Ach) est le plus abondant des neurotransmetteurs de la paroi du tube digestif⁽⁹⁰⁾. Les neurones cholinergiques, sont médiateurs de la contraction musculaire, participent à la régulation locale de circuits excitateurs et inhibiteurs et sont impliqués dans le contrôle du transport de l'eau et des électrolytes à travers l'épithélium. A noter également qu'un pourcentage variable des neurones cholinergiques du plexus myentérique et du plexus sous-muqueux

contiennent d'autres neurotransmetteurs (neuropeptides) qui ont une activité excitatrice.

II.4.6. Les cellules gliales

Ces cellules dérivent de la crête neurale, mais, à la différence des cellules de Schwann, n'ont pas de membrane basale et ne produisent pas de collagène. Ces cellules peuvent être marquées à l'aide d'anticorps dirigé contre la GFAP (gliary fibrillary acidic protein). Il s'agit d'une protéine de type filament intermédiaire spécifiquement exprimé par les cellules gliales⁽¹⁰⁰⁾.

Ce tissu de soutien glial entourant les cellules nerveuses, est indispensables à leur intégrité ainsi qu'à celle, plus étonnamment, des cellules de la barrière épithéliale⁽¹⁰¹⁾.

II.4.7. Les cellules interstitielles de Cajal

Il a été décrit des cellules situées au niveau du plexus myentérique, ne dérivant pas de la crête neurale⁽¹⁰²⁾. Ce sont les cellules de Cajal, qui auraient un rôle de pacemaker au niveau de la contraction des fibres musculaires digestives, à l'origine d'ondes lentes spontanées. Ces cellules se répartissent en faisceaux, en contact étroit avec les ganglions et les fibres nerveuses du plexus myentérique. Elles expriment le récepteur c-Kit, de type tyrosine kinase. On peut les détecter à l'aide d'un anticorps spécifique à partir de la 15^e SA chez l'Homme⁽¹⁰³⁾. Le proto-oncogène C-kit code pour un récepteur membranaire à activité tyrosine-kinase. Initialement utilisé comme marqueur des mastocytes, il semble également être un marqueur fiable des cellules de Cajal. L'absence de ces cellules entraîne une désorganisation

de l'activité péristaltique intestinale⁽¹⁰⁴⁾. Bien que ne dérivant pas des cellules de la crête neurale, leur apparition est contemporaine du développement des tuniques neuromusculaires dans l'intestin.

II.4.8. Développement des couches musculaires

Chez l'Homme⁽¹⁰⁵⁾, les couches musculaires se développent à partir du mésenchyme dès la 8^e SA. Après 10 SA, la couche circulaire interne s'étend tout le long du futur intestin grêle alors que la couche externe commence à apparaître. La musculature muqueuse se développe à partir d'îlots mésenchymateux près de la base des cryptes entre 19 et 21 SA. Chez le rat⁽¹⁰⁶⁾, la différenciation musculaire a été étudiée grâce au marquage de l'isoforme alpha de l'actine musculaire lisse (Smooth muscle actine ou SMA). Elle débute au 15^e jour de gestation pour la couche interne et au 17^e jour pour la couche externe.

II.5. Techniques d'étude du SNE

II.5.1. Techniques histologiques

Nous venons de décrire un grand nombre de cellules, de neuromédiateurs impliqués dans le développement et le fonctionnement normal du tube digestif. Certaines de ces molécules sont utilisées en routine comme marqueurs cellulaires. D'autres molécules, ayant parfois des fonctions peu connues, sont cependant utilisées depuis longtemps comme marqueurs cellulaires. Le but de ce chapitre est de décrire les nombreuses molécules utilisées dans la littérature pour identifier et suivre les éléments de la maturation neuronale, en présentant rapidement leurs avantages et leurs inconvénients.

II.5.1.A. Coloration par Hématoxyline-éosine-safran (HES)

Les colorations standard type HES peuvent permettre de voir les plexus ganglionnaires. Cependant la coloration HES apporte de nombreux faux négatifs, en ne permettant pas de voir des ganglions immatures. Il ne s'agit donc pas d'un outil performant pour étudier le SNE⁽¹⁰⁷⁾.

II.5.1.B. L'acétylcholinestérase

Chez la souris mature, les cellules cholinergiques représentent 60% des neurones myentériques de l'intestin grêle⁽¹⁰⁸⁾. Le marquage par l'acétylcholinestérase permet de repérer à la fois les corps cellulaires des neurones, mais aussi les fibres nerveuses. L'acétylcholinestérase est un marqueur d'avantage « positif » que « négatif »⁽¹⁰⁷⁾. En effet, il permet de visualiser plus facilement une prolifération anormale et une hypertrophie des fibres nerveuses dans la sous-muqueuse, la musculaire muqueuse et la lamina propria alors qu'il peut y avoir des faux-négatifs car une absence de ganglions peut en fait être due au délai que mettent certaines fibres de la lamina propria durant les premières semaines de vie à exprimer ce marqueur.

II.5.1.C. Coloration de NADPH-diaphorase et NO-synthase

(1) La NADPH diaphorase

Certains corps de cellules neuronales peuvent être visualisés par la NADPH diaphorase. L'enzyme est présente dans un sous-groupe de neurones entériques. Son expression coïncide avec l'immunomarquage de la NO synthase⁽¹⁰⁹⁾. Une co-localisation avec l'immunomarquage par VIP a été observée dans quasiment tous les

corps cellulaires des neurones qui expriment la NADPH diaphorase. Dans l'intestin et le pancréas de rat, une partie des neurones positifs pour NPY et VIP expriment une activité NADPH diaphorase. Ainsi, d'un point de vue fonctionnel, ce sont les neurones inhibiteurs avec un rôle de relâchement musculaire qui sont marqués par NADPH diaphorase⁽⁵²⁾. Son expression est vue pour la première fois au niveau de l'ébauche stomacale à E13. A la naissance son expression est mise en évidence au niveau intestinal dans les neurones des plexus myentériques et sous-muqueux et au sein des fibres nerveuses qui traversent la couche musculaire interne⁽¹¹⁰⁾. Son utilisation est plus fine que PGP9,5 quand il s'agit de compter les corps cellulaires de neurones.

(2) La NO-synthase

L'activité de la NOS (l'enzyme qui catalyse la synthèse de NO) se superpose à celle de la NADPH diaphorase. Le NO est un neuromédiateur non-adrénergique, non-cholinergique (NANC), avec un rôle de relaxation des fibres musculaires lisses. Le NO est mis en évidence dans le plexus myentérique de l'œsophage de rat chez des fœtus mais aussi des adultes et est galement visible dans le plexus sous-muqueux⁽⁹¹⁾.

II.5.1.D. Anticorps anti-Gap-43

Il s'agit d'une protéine GAP-43 (growth associated protein-43) mise en évidence lors de la croissance neuronale. Cette protéine est synthétisée par les cellules dérivées de la crête neurale avant qu'elles ne terminent leur programme de différenciation terminale⁽¹¹⁰⁾. Lors de la différenciation neuronale, quand le neuroblaste immature perd sa forme ronde et émet ses prolongements, GAP-43 est

fortement exprimé au niveau des cônes qui sont à l'origine des futurs axones. Cette protéine intervient aussi lors de processus de réparation neuronale. Des cellules qui expriment GAP-43 sont visualisées à partir de E12 (de manière un peu plus abondante que NC-1 au niveau de l'intestin antérieur chez le rat⁽¹¹⁰⁾). Elle semble donc être un bon marqueur de la différenciation neuronale en particulier au niveau du système nerveux entérique⁽¹¹¹⁾.

II.5.1.E. Anticorps anti-PGP 9.5

PGP 9.5 est une protéine neuronale⁽¹¹²⁾ qui permet d'obtenir un excellent marquage des structures nerveuses dont les neuroblastes du système nerveux central et des nerfs périphériques. Son rôle exact n'est pas connu. Elle permet également de marquer les cellules neuro-endocrines mais n'est pas exprimée par les cellules gliales. Son marquage se superpose globalement à celui de la Neuron Specific Enolase (NSE). Environ 80% des neurones du plexus myentérique sont marquées par cet AC ce qui en fait un marqueur général fiable du SNE. Au cours de la différenciation neuronale, PGP 9,5 est exprimée avant que des marqueurs plus spécifiques de la différenciation fonctionnelle neuronale (neurotransmetteurs) n'apparaissent.

II.5.1.F. Protéine Tau (map-5)

Les microtubules, un des constituants majeur des neurones sont constituées de tubulines et d'un ensemble de protéines appelées les microtubules associated proteins (MAPs). Ces MAP régulent l'assemblage et la stabilité des micro-tubules, véritable squelette neuronal responsable de la plasticité et de la morphologie des

axones. Des études immunohistochimiques avec des AC monoclonaux spécifiques de ces MAPs ont montré qu'elles étaient présentes le long des microtubules avec des concentrations différentes selon les cellules et dans des parties différentes d'une même cellule. Ces concentrations se modifient avec l'âge.

La protéine Tau appartient à la famille des MAP. Elle est d'avantage connue pour son rôle dans la maladie d'Alzheimer où elle s'accumule sous une forme anormale phosphorylée. En dehors de ce fait, cette protéine Tau est mise en évidence dans les axones des neurones des ganglions sensitifs du système nerveux sympathique des rats nouveau-nés et adultes⁽¹¹³⁾. L'immuno-marquage de cette protéine donne d'excellents détails du corps cellulaire des neurones mais aussi du cytosquelette des ramifications nerveuses au sein du SNE⁽¹⁰⁷⁾. Il n'y a pas de marquage des cellules gliales, ni des cellules musculaires, ni des autres éléments cellulaires intestinaux non neuronaux. Chez l'Homme, il y a un immuno-marquage intense des axones et des dendrites du plexus myentérique. Le marquage est plus faible au niveau du plexus sous-muqueux.

II.5.1.G. La Synaptophysine

La synaptophysine P38 est une protéine de membrane (pesant 38 kD) des vésicules pré-synaptiques des neurones différenciés⁽¹¹⁴⁾. Elle est visualisée dès la 10^e SA chez l'Homme et est visible continuellement durant le développement. Précocement, on obtient un marquage cytoplasmique diffus des neuroblastes indifférenciés, marquage qui sur des spécimens plus âgés prend une forme plus punctiforme en regard des neurones, aspect qui est compatible avec celui des vésicules axonales⁽¹⁰⁹⁾. Le marquage est moins intense que pour le PGP9,5. La

synaptophysine est également visible au niveau des cellules entéro-endocrines et des tumeurs neuro-endocrines.

II.5.1.H. La Synapsine 1

La Synapsine 1 appartient à la famille des synapsines, qui sont des phosphoprotéines des vésicules synaptiques. Elles jouent un rôle dans la régulation de la sécrétion des neurotransmetteurs et dans la formation des synapses. C'est à ce titre qu'elle est utilisée comme régulateur de la maturation synaptique au niveau des jonctions neuro-musculaires⁽¹¹⁵⁾. Elle apparaît au moment de l'apparition des premières synapses⁽¹¹⁶⁾, et serait impliquée dans l'élongation des axones et la synaptogenèse⁽¹¹⁷⁾.

II.5.1.I. L'anticorps anti-NC-1 mAb = HNK1

Les cellules de la crête neurale (CCN) avant qu'elles ne se différencient vers la lignée neuronale ou la lignée gliale peuvent être détectées avec un AC anti-NC-1⁽¹¹⁸⁾. Le marquage est stable dans le temps et est encore présent à l'âge adulte.

II.5.1.J. Les neurofilaments

Différents types de neurofilaments sont utilisés comme immuno-marqueurs du SNE (160 kDa, 200 kDa). Ils sont exprimés par ⁽¹¹⁹⁾ les corps cellulaires des neurones mais aussi les fibres nerveuses. Ils sont soit utilisés individuellement soit regroupés.

II.5.1.K. La Tyrosine Hydroxylase

La Tyrosine hydroxylase est l'enzyme limitante de la chaîne de synthèse des catécholamines⁽¹²⁰⁾. C'est un marqueur des nerfs du système nerveux sympathique⁽⁹¹⁾. Elle est visible au niveaux des les plexus myentériques et sous muqueux, surtout au niveau des rameaux nerveux.

II.5.1.L. La Neuron-specific enolase (NSE)

Il s'agit d'un enzyme de la voie énergétique glycolytique, utilisée par les neurones et les cellules neuroendocrines. Son marquage se superpose à celui de la protéine Tau ce qui en fait un marqueur neuronal général⁽¹⁰⁷⁾. Il est également retrouvé au niveau des cellules endocrines.

II.5.1.M. Les neuropeptides

(1) La Met-Enképhaline

C'est un neurotransmetteur excitateur du système NANC, présent au niveau des fibres musculaires de la couche interne et à un degré moins de la couche externe⁽¹²¹⁾. Le plexus myentérique contient des cellules marquées intensément par ce marqueur⁽¹⁰⁹⁾.

(2) La Protéine S100

C'est un marqueur des cellules gliales, des cellules épendymaires du cerveau, des nerfs périphériques, des cellules de Schwann, des mélanocytes et des cellules de Langerhans de la peau. Le marquage est augmenté dans les neurites en

croissance⁽¹²⁰⁾. Cette protéine est distribuée intensément dans toutes les tuniques intestinales y compris au niveau des petites fibres au sein des faisceaux musculaires et de l'épithélium⁽¹⁰⁹⁾.

(3) La Chromogranine A

Il s'agit d'une glycoprotéine de 50 kD, associée à la production des granules neurosécrétoires par les cellules neuroendocrines. C'est donc un marqueur quasi-exclusif des cellules neuroendocrines.

(4) La Substance P

La substance P est un marqueur des neurones excitateurs⁽⁵²⁾ du système NANC. Elle est mise en évidence dès E18 au niveau de l'intestin chez le rat.

(5) Le Calcitonin gene related peptide (CGRP ou Bombesin)

Son marquage est visualisé chez le rat au niveau de l'estomac dès E12, au niveau des neurones en croissance, mais pas au niveau des corps cellulaires des neurones⁽¹¹⁰⁾. Visible aussi au niveau des vaisseaux mésentériques⁽¹⁰⁹⁾. Son rôle serait un neurotransmetteur excitateur du système NANC⁽¹²¹⁾. Présent dans l'estomac du rat à E18 mais pas plus en aval. Visualisé à la fois au niveau du plexus myentérique et des cellules neuro-endocrines⁽¹¹⁰⁾.

(6) Le Vasointestinal peptide (VIP)

Le VIP qui est un neurotransmetteur inhibiteur des neurones NANC.⁽¹²¹⁾ peut servir de marqueur. Il est visualisé au niveau de l'intestin antérieur du rat à E20 et dans tout l'intestin après la naissance⁽¹¹⁰⁾ et est surtout exprimé au niveau des plexus myentériques⁽⁹¹⁾.

(7) La Galanine

Ce neuropeptide est visible dès E18 dans l'intestin⁽¹¹⁰⁾. Il aurait un rôle inhibiteur du péristaltisme et est souvent co-localisé avec VIP⁽⁹¹⁾.

(8) Le Neuropeptide Y (NPY)

Le NPY est visualisé au niveau de l'intestin antérieur à E13. Au niveau du pancréas, les cellules qui expriment NPY ne vont pas se différencier en neuroblastes mais en cellules neuroendocrines. Il y a une co-expression du NPY et de NC-1 dans les neurones du SNE⁽¹¹⁰⁾. Par rapport au VIP et à la Galanine, NPY est visualisé autour des vaisseaux de la sous-muqueuse, des fibres nerveuses de la lamina propria et des faisceaux musculaires et à un degré moindre au niveau des plexus myentériques⁽¹²²⁾.

II.5.2. Marqueurs de l'apoptose neuronale du SNE

L'apoptose est la forme la plus fréquente de mort cellulaire des eucaryotes. Ce processus physiologique est, entre autres, impliqué dans le développement embryonnaire des tissus de l'organisme et dans le développement

du système nerveux⁽¹²³⁾. L'utilisation de kits de détection disponibles pour le rat permet de rechercher des perturbations de ce phénomène d'apoptose (ralentissement ou accélération) induites par l'obstruction au niveau des neuroblastes potentiellement à destination des plexus myentériques.

II.5.3. *Whole-mount* préparation

IL s'agit d'une technique histologique d'étude de l'intestin. Nous avons vu que l'intestin était constitué de tuniques concentriques. Cette technique est basée sur cette constatation et consiste à obtenir, après avoir pelé en bloc la muqueuse et la sous-muqueuse, à minutieusement séparer la couche musculaire interne de la longitudinale sur laquelle s'adosse le plexus myentérique⁽¹²⁴⁾. On obtient ainsi une vision en 2 dimensions de tout le réseau myentérique avec les connections nerveuses et les ganglions nerveux (Fig. 12).

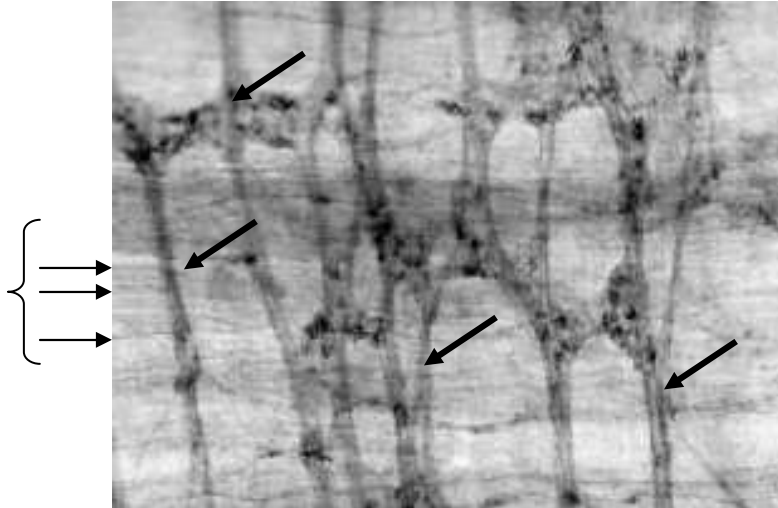


Fig. 12 *Whole-mount* préparation du plexus myentérique d'enfant prématuré à 26 SA. Les flèches séparées montrent les fibres nerveuses avec en arrière plan (flèches dans l'accolade) les fibres musculaires externes. (Coloration histochimique à la NADPH-diaphorase, X100)(Image issue de l'article de Nemeth et al.⁽¹²⁵⁾).

Cette technique à la différence des classiques coupes transversales permet une meilleure appréhension de la répartition spatiale des fibres nerveuses ainsi qu'une bonne appréciation de la densité des ganglions nerveux. Elle est cependant sujette à des biais de dissection. En effet, l'appréciation d'une « bonne » dissection est subjective. Bien qu'une publication suggère son utilisation en routine clinique⁽¹²⁶⁾, cette technique reste à notre connaissance principalement utilisée dans le domaine expérimental.

II.5.4. Capture d'images

Les progrès réalisés dans la capture et l'analyse des images ont été appliqués à l'analyse des prélèvements histologiques. En effet, il est devenu pratiquement indispensable de fournir des résultats quantitatifs pour tous les types d'études. Les études histologiques ne dérogent pas à la règle et même si l'étude singulière reste le principe fondamental, affirmer ses résultats à l'aide de données quantitatives est souhaitable. Les dispositifs d'analyse d'images peuvent par exemple permettre de quantifier la surface occupée par telle ou telle type de cellule⁽⁹¹⁾. Il faut au préalable identifier la cellule par un marquage la différenciant des tissus environnant. C'est là que de nombreux biais peuvent intervenir. Il faut en effet que le seuil de marquage choisi soit constant pour tous les échantillons examinés et que donc tous les échantillons aient eu strictement le même processus de marquage.

II.5.5. Electrophysiologie

La finalité de la mise en place du SNE est la motricité intestinale. Les techniques électrophysiologiques permettent l'étude de cette motricité intestinale. Les ondes péristaltiques peuvent parcourir des distances très variables, soit de quelques centimètres à 0.5 cm/s, soit au contraire de grandes distances (on parle de rush) de 5 cm/s sur 2 à 3 m chez le cheval. Le sens de propagation est généralement oral-aboral mais il existe de nombreuses contractions antipéristaltiques.

II.5.5.A. Enregistrements de la motricité intestinale

La survenue des contractions intestinales se fait selon une organisation temporelle bien précise. L'activité myoélectrique peut être enregistrée par électromyographie en plaçant des électrodes dans la paroi intestinale. Le premier type d'activité qui est enregistré est appelé onde lente (OL).

Il s'agit de variations de potentiel survenant de façon rythmique sur l'ensemble de l'intestin grêle. Cette activité a pour origine les cellules de Cajal et la fréquence présente un gradient duodéno-iléal avec une fréquence duodénale de 16-19/min et de 12-15/min au niveau iléal. Toutes les zones de l'intestin peuvent générer ces OL mais les zones en amont jouent le rôle de pacemaker vis-à-vis des segments situés en aval. Ces OL sont générées en permanence, que l'animal soit à jeun ou non, et elles n'ont aucun rôle mécanique. Elles sont nécessaires à l'apparition des potentiels de pointe qui sont à l'origine des activités mécaniques. Pour un segment intestinal donné, et selon la fréquence de survenue de ces potentiels de pointe par rapport aux OL, on va distinguer trois niveaux d'activité : le repos, l'activité irrégulière et l'activité régulière, encore appelées Phase I, II et III. Pour la Phase III, toutes les OL sont

suivies de potentiels de pointe et elles sont associées à une contraction intestinale. Ces contractions forment des ondes péristaltiques et se déplacent sur quelques dizaines de centimètres (chien) et jusqu'à 1 ou 2 m chez le porc et le cheval. Sur un même segment de l'intestin, ces trois types d'activité se succèdent au cours du temps pour former un complexe moteur migrant qui se déplace progressivement tout le long de l'intestin.

Ainsi, dans le cadre de notre problématique, ces techniques pourraient permettre d'analyser d'éventuelles anomalies induites par les atrésies. Peu d'études ont cependant été effectuées avec cet outil, probablement en rapport avec les difficultés de mise en œuvre⁽³⁹⁾. Ainsi, d'autres techniques ont été développées grâce à la miniaturisation des instruments de mesure.

II.5.5.B. Enregistrement de l'activité spontanée des afférences vagales à partir d'une préparation isolée de l'intestin.

Nous avons vu que les afférences vagales faisaient le lien entre le SNE et le SNC. Il peut être également pertinent d'étudier les influx transportés par le nerf vague au décours de diverses sollicitations digestives. Ces études sont possibles, y compris chez le petit animal. Elles consistent à isoler in vivo un segment intestinal⁽¹²⁷⁾ en prenant garde à respecter l'innervation et la vascularisation (Fig. 13). Différentes stimulations intra-luminales sont alors possible, mécaniques (dilatations à l'aide de ballonnets⁽¹²⁸⁾), injection de substances alimentaires.

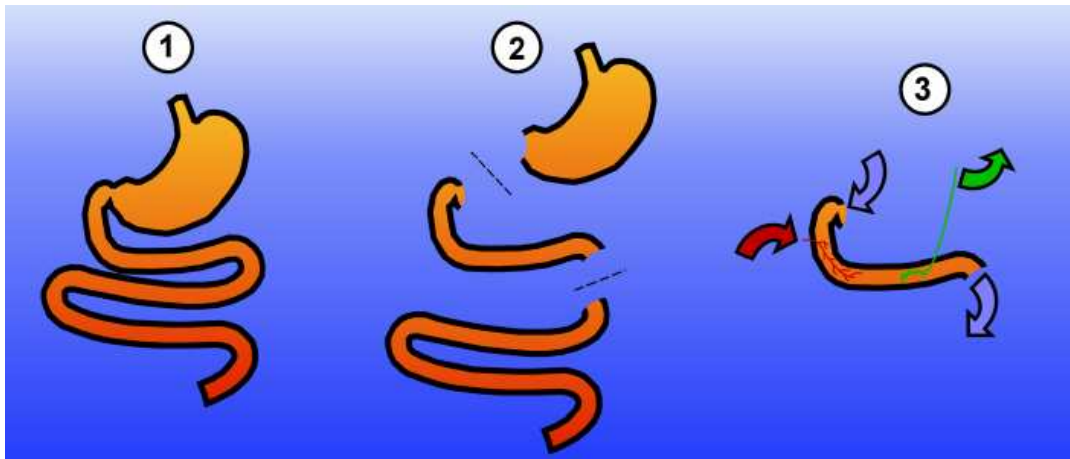


Figure 13: Préparation électrophysiologique: 1, une section du tube digestif, allant de l'oesophage jusqu'au jéjunum est sortie de l'animal puis placée dans du liquide physiologique. 2, Après avoir identifié le nerf vague, seul le jéjunum est conservé. 3, deux canules (flèches bleues) permettent d'injecter des solutions dans la lumière intestinale. Une canule intra-artérielle (flèche rouge) permet d'injecter des substances dans la circulation sanguine pendant que l'activité spontanée du nerf vague est enregistrée grâce à une électrode (flèche verte).

II.6. Synthèse et Objectifs du travail

Le développement et le fonctionnement du système entérique, on le voit, sont complexes, tant par le nombre des acteurs que par leurs interactions entre eux. C'est dans ce cadre histofonctionnel et dans une perspective résolument clinique que s'inscrit notre travail de thèse qui va être présenté dans la 2^e Partie.

En effet, notre démarche est résolument clinique car ce sont les chirurgiens pédiatres qui, étant en première ligne, ont remis en cause leurs techniques chirurgicales pensant qu'elles pouvaient être responsables des troubles fonctionnels post-opératoires présentés par les enfants. Cependant, les modifications techniques

qui ont été élaborées, même si elles servent encore aujourd'hui de références techniques, n'ont pas permis de résoudre complètement ces problèmes. Les différentes problématiques ont alors également été prises en main par d'autres chercheurs, impliqués dans l'étude du développement embryonnaire intestinal. En effet, la difficulté de cette thématique est renforcée par deux éléments. D'une part, les mécanismes du développement normal de l'intestin grêle ne sont pas encore complètement connus et d'autre part, l'atrésie quand elle survient, survient par définition sur une structure en pleine croissance et en pleine différenciation. Ceci a laissé la porte ouverte à de nombreuses hypothèses de travail.

Ainsi, au sein des nombreuses voies de recherches explorées, 4 anomalies principales seraient en cause dans la genèse des troubles fonctionnels post-opératoires des atrésies du grêle: le segment d'amont, le segment d'aval, l'épithélium digestif et le système nerveux entérique. On a donc vu apparaître des auteurs, véritables thuriféraires du segment d'amont, d'autres, moins nombreux, apôtres du segment d'aval. De même, d'autres auteurs se sont focalisés avec véhémence sur le versant épithélial (minoritaires) et d'autres sur le versant neuromusculaire (Fig. 14).

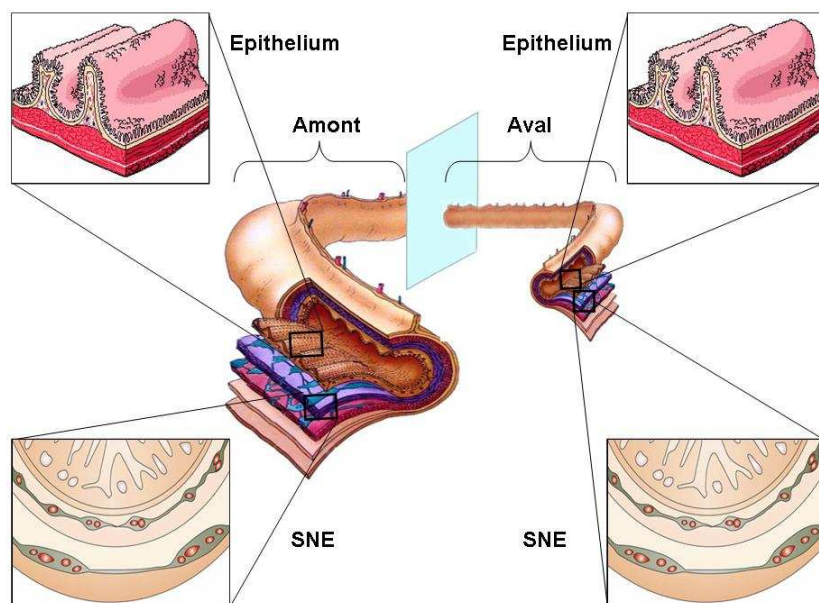


Fig. 14 : Hypothèses sur les mécanismes des conséquences des atrésies. Les retentissements des atrésies intestinales pourraient être provoqués par différents mécanismes que nous avons schématisés dans cette figure. Des atteintes préférentielles des segments d'amont et/ou d'aval, avec des atteintes de l'épithélium et/ou du SNE. Il existe des partisans pour chacune de ces 4 hypothèses.

Au vu de la littérature et en relation avec les expériences cliniques, il ne nous a pas été possible de choisir notre camp parmi ces 4 candidats, aucun ne dégageant une vérité bien établie; de plus, ces 4 hypothèses ne sont pas exclusives les unes des autres. Le but de notre étude a donc été de tenter de mieux définir, à partir des 4 pistes actuelles, les mécanismes à l'origine des troubles fonctionnels présentés par les patients en post-opératoire. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur la création de 2 modèles animaux d'atrésies intestinales assez différentes chez le rat, qui nous ont permis de réduire progressivement le nombre

des hypothèses candidates et d'apporter quelques réponses que nous espérons intéressantes.

Partie Expérimentale et Publications

III. Partie Expérimentale et Publications

III.1. Présentation synoptique des études

Comme nous venons de le voir dans la partie bibliographique, le problème des troubles fonctionnels post-opératoires rencontré chez les nouveaux-nés opérés d'atrésies intestinales est probablement la conséquence d'anomalies induites par l'atrésie qui affectent les segments d'amont et/ou d'aval au niveau épithélial et/ou au niveau neuromusculaire.

En essayant de mettre à jour ce qui, dans une atrésie intestinale, serait susceptible de générer ces atteintes (amont/aval ; épithélium/SNE), on peut isoler 3 facteurs principaux, (i) le mécanisme intrinsèque responsable de l'atrésie (ischémique, génétique...), (ii) les conséquences mécaniques de l'obstruction induite par l'atrésie (dilatation d'amont, absence de passage du liquide amniotique en aval), et (iii) la survenue anté-natale de cet obstruction (accident survenant sur des tissus en pleine différenciation à la différence d'une occlusion tumorale chez l'adulte).

Pour tenter de répondre à nos questions, il nous a paru nécessaire de contrôler l'un de ces facteurs. Par la création de modèles animaux d'atrésies intestinales, nous avons pu contrôler les modifications induites par la modification de ce paramètre. Nous avons alors réalisé plusieurs études qui sont d'abord présentées de façon synthétique puis de façon détaillée ci-dessous (Fig. 15).

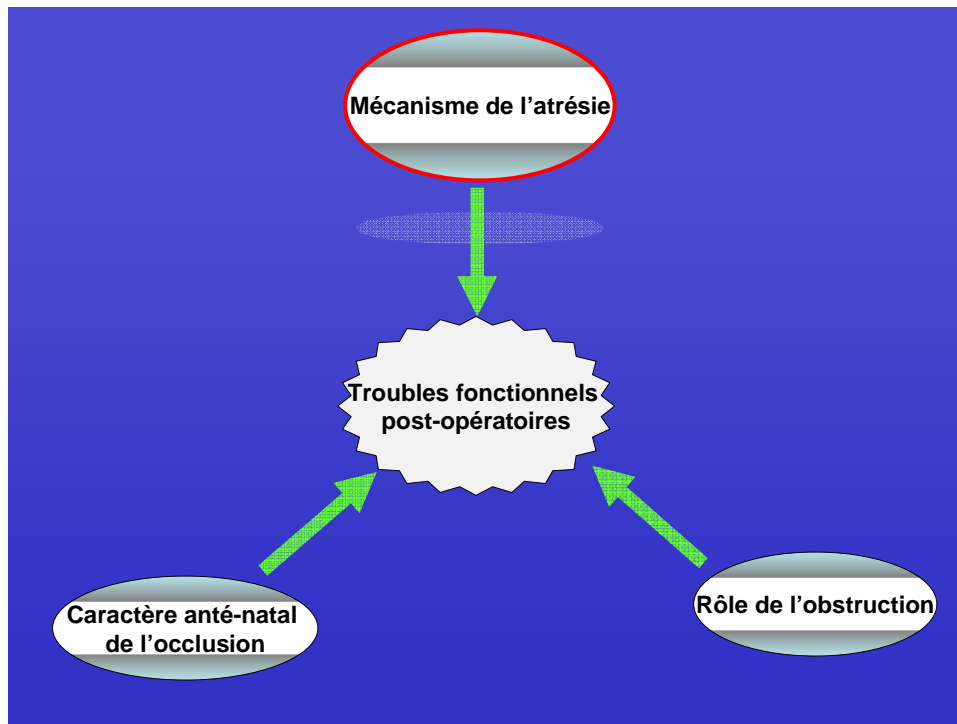


Fig.15: Trois facteurs principaux sont à l'origine des troubles fonctionnels post-opératoires rencontrés au décours d'une atrésie intestinale.

En tentant par la création de modèles animaux d'obstruction anté-natale du tube digestif, de contrôler le mécanisme de l'atrésie, nous avons pu contrôler les modifications induites par la modification de ce paramètre.

III.1.1. Première étude

Dans une première étude, nous avons développé un modèle animal d'obstruction anté-natale de l'intestin grêle chez le fœtus de rat en effectuant une ligature de l'intestin, mécanisme « minimaliste » de réalisation de l'obstruction en regard des autres étiologies potentielles (ischémiques, tératogéniques). Nous avons alors étudié sans parti pris, les éventuelles répercussions de cette obstruction

anténatale en amont et en aval de l'obstruction et en nous intéressant, comme dans la littérature, au versant épithélial et au versant neuro-musculaire.

III.1.2. Seconde étude

La première étude nous a permis de réduire notre champ d'investigation. En effet, nous avons mis en évidence que l'obstruction réalisée engendrait des conséquences plutôt au niveau du SNE et plutôt en regard du segment d'aval. Nous avons alors concentré nos forces sur le SNE et avons alors entrepris d'étudier la cinétique d'expression normale de marqueurs neuromusculaires d'intérêt au sein de l'intestin en développement, dans le but d'utiliser ultérieurement ces données dans un contexte pathologique.

III.1.3. Troisième étude

Nous avons alors développé un second modèle d'atrésies intestinales chez le rat, à l'opposé du premier. Ce second modèle nous a permis d'obtenir une des formes les plus paroxystiques des atrésies intestinales, à savoir, des segments d'intestin suspendus le long du tube digestif, sans aucune continuité avec l'amont, ni avec l'aval. Nous avons également montré que nous obtenions un spectre d'atrésies comparables en de nombreux points à celle obtenues chez l'homme, les atrésies intestinales multiples.

III.1.4. Quatrième étude

L'étude du développement du SNE au sein de ces îlots digestifs nous semblait en effet complémentaire du premier modèle « minimaliste » qui avait démontré des anomalies du segment d'aval. En effet, le premier modèle nous a suggéré la présence d'anomalies du segment post-atrétique. L'étude de ce second modèle, a permis de confirmer que des anomalies du SNE étaient présentes dans ces segments d'aval. Un second enseignement démontré par cette étude est le rôle de la vascularisation mésentérique dans le développement du SNE.

III.1.5. Cinquième étude

Enfin, dans une dernière étude, nous avons eu la possibilité sur des prélèvements intestinaux humains de mettre en évidence l'immatunité du SNE des enfants prématurés par rapport aux enfants nés à terme, immaturité que nous avons retrouvée sur nos modèles expérimentaux.

Ainsi, pour tenter de répondre à la question initiale qui était de savoir par quel mécanisme la survenue d'une atrésie était responsable des troubles fonctionnels post-opératoires, nous avons mis en évidence sur deux modèles expérimentaux d'obstruction intestinale anténatale une altération du SNE des segments post-atrétiques.

III.2. Mise au point du modèle chirurgical d'obstruction intestinale par ligature anténatale de l'intestin

III.2.1. Présentation du modèle

Comme nous l'avons vu lors de l'étude bibliographique des modèles expérimentaux d'occlusions intestinales, peu d'études ont eu la possibilité de tester les molécules impliquées dans la différenciation intestinale épithéliale ou neuromusculaire. En effet, sur les modèles de gros animaux, peu de réactifs d'immunohistochimie sont disponibles à la différence des modèles tels que le rat ou la souris. Le rat nous paraissait être un animal adapté à l'étude de notre thématique. En effet, il s'agit d'un animal peu coûteux, ayant de nombreux fœtus à chaque portée, une durée de gestation courte et pour lequel de nombreux marqueurs de différenciation étaient disponibles. Un seul article dans la littérature mentionnait la création d'un modèle animal d'occlusion intestinale ischémique chez le rat⁽¹⁹⁾. L'article n'étant pas centré sur la description de la technique chirurgicale, il a fallu mettre au point le développement du modèle avant d'obtenir les premiers fragments d'intestin exploitables pour l'étude. Cette étude a été réalisée conformément aux règles sur l'expérimentation animale fixées par le décret n087-848 du 19 octobre 1987 et ses arrêtés d'application.

La première étape a consisté à obtenir des rates dont la datation de la gestation était fiable. Pour cela nous avons constitué notre propre élevage et c'est la réalisation de frottis vaginaux quotidiens qui, en montrant les spermatozoïdes,

témoignait de la fécondation (Fig.16). Cette technique nous a permis d'obtenir des rates gestantes avec une précision de datation de la fécondation de moins de 24 heures.

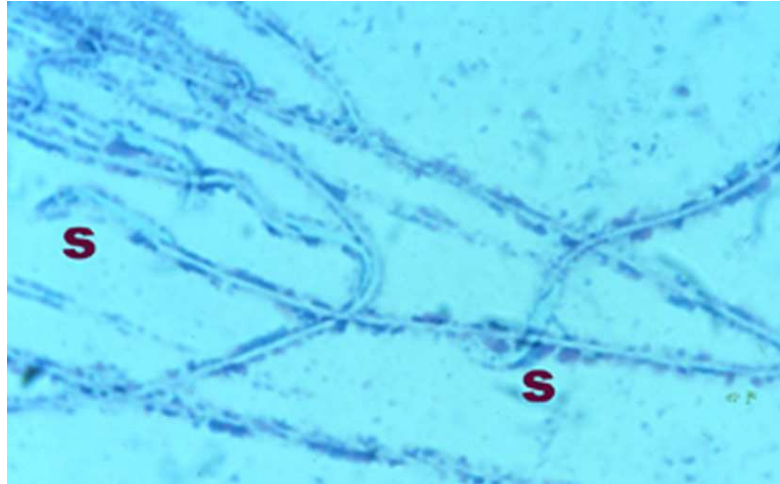


Fig.16: frottis du bouchon vaginal de rate fécondée. Les spermatozoïdes de rats (S) sont facilement reconnaissables à leur tête crochue. (contre-coloré au bleu de Méthylène X 250).

L'obtention des premiers fœtus vivants occlus a été rendue possible grâce à l'utilisation de techniques microchirurgicales sous microscope à fort grossissement et grâce à un abord strictement intra-utérin des fœtus. La technique est décrite dans le détail de sa réalisation dans l'article soumis que l'on peut trouver ci-après. En quelques mots, ce modèle permet d'opérer des fœtus de rat âgés de E16 à E20. Une ligature était effectuée, sans coagulation ni atteinte des vaisseaux mésentériques. Les fœtus étaient prélevés à E21 (pour une gestation normale de 22 j) pour éviter tout cannibalisme des ratons par la mère. Ce modèle, qui nécessite une phase d'apprentissage, nous a permis d'obtenir un pourcentage d'animaux inclus de 35%, ce qui est très honorable en regard des autres modèles animaux dont le poulet (20%

environ des animaux opérés sont inclus). L'intervention ultérieure d'un second opérateur (Dr Frédérique Sauvat), capable de réaliser à son tour la technique a définitivement établi la validation de la reproductibilité du modèle.

L'étude macroscopique et histologique des prélèvements intestinaux des animaux occlus montrait des aspects comparables à ceux décrits dans la littérature, chez l'Homme et chez les différents modèles expérimentaux. La réalisation d'une ligature, geste aux conséquences locales limitées, nous autorise à considérer les résultats obtenus comme étant la conséquence de la réalisation de l'interruption anténatale du tube digestif.

III.2.2. Article

Nous insérons, l'article concernant cette étude qui est en cours de soumission au Journal of Surgical Research.

A new rat model of prenatal bowel obstruction: development and early assessment.

Fourcade LM, Mousseau Y, Sauvat F, Khen-Dunlop N, Cerf-Bensussan N, Sarnacki S, Sturtz FG.

Pediatric Surgery Department, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Hôpital de la Mère et de L'enfant, Limoges, France. laurent.fourcade@chu-limoges.fr

J Pediatr Surg. 2010 Mar;45(3):499-506.

[doi:10.1016/j.jpedsurg.2009.07.031](https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2009.07.031)

Abstract :

PURPOSE : Although intestinal motility disorders often complicate the postoperative surgical management of newborns with congenital intestinal atresia, their pathogenesis remains unclear. Animal models of prenatal intestinal obstruction have been mainly developed in the lamb and the chicken. Despite new insights brought by these models, they have one or more limitations, such as high fetal mortality rates, high costs, long gestation periods, and an insufficient number of fetuses per litter. Moreover, some species are phylogenetically distant from mammals. **METHODS :** We developed a reproducible model of prenatal intestinal obstruction in the rat to study the histologic changes induced by the obstruction. We report, the technical devices and the first assessment of this atresia model in a didactic way to allow other researchers to easily reproduce the model. **RESULTS :** Prenatal intestinal obstructions in this study fulfilled all the macroscopic and histologic criteria usually listed by other models of prenatal intestinal obstruction that have been developed in other species. Furthermore with our model, we obtained a high success rate at a low cost. **CONCLUSIONS :** We presented in this study a reproducible model of prenatal intestinal obstruction in the rat with the macroscopical and histologic features of prenatal intestinal obstruction.

III.2.3. Conclusions de cette étude

La réalisation de ce modèle d'obstruction anté-natale chez le rat a ouvert de nombreuses perspectives d'études. En effet, il peut permettre d'étudier les conséquences des obstructions réalisées à différentes périodes, y compris à des phases précoces du développement intestinal du rat (E16 - E17). D'autres part, grâce aux nombreux réactifs immuno-histochimiques disponibles, il peut permettre d'étudier au niveau des segments intestinaux pré- et post atrétiques d'éventuelles modifications induites par l'atrésie au niveau épithélial et neuro-musculaires. C'est ce que nous allons décrire dans la prochaine étude.

III.3. Utilisation du modèle d'atrésie par ligature pour l'étude de la différenciation épithéliale et neuromusculaire

III.3.1. Recherche des effets d'une obstruction intestinale anténatale sur la différenciation épithéliale

Plusieurs auteurs ont suggéré que l'épithélium intestinal pouvait être impliqué dans la genèse des troubles que nous étudions ^(19, 51, 129). Il nous a semblé pertinent d'étudier sur les prélèvements d'intestin occlus pré- et post-atrétique l'expression de molécules impliquées dans la différenciation épithéliale. Pour ce faire, nous avons utilisé en immuno-histochimie plusieurs anticorps (AC) : un AC anti-laminine, molécule impliquée dans la différenciation de la matrice extracellulaire à la base des entérocytes ; des AC anti-villine et anti-lactase, molécules impliquées dans la

différenciation fonctionnelle apicale de la bordure en brosse entérocytaire et la phalloïdine témoin du développement du cytosquelette des entérocytes.

III.3.1.A. Matériels et Méthodes

Les prélèvements intestinaux ont été effectués selon la technique décrite dans le chapitre précédent. Cette étude a été effectuée à partir des prélèvements inclus en paraffine et à partir de blocs congelés.

(1) Technique d'immunohistochimie sur coupes congelées non fixées

La première étape, a été de maîtriser la technique de réalisation de coupes transversales à partir des blocs congelés selon les étapes suivantes:

- réalisation de coupes de 6 μm d'épaisseur au cryostat (Leitz) à - 20°C,
- recueil des coupes sur des lames de verre super-frost (évite le décollement intempestif de la coupe),
- contrôle de l'orientation des fragments en effectuant régulièrement une coloration de contrôle à l'hématoxyline de Harris,
- séchage à l'air durant 2 heures,
- emballage dans du papier d'aluminium et conservation à -20°C.

Au moment de leur utilisation pour le marquage, les lames étaient sorties du congélateur et placées en chambre humide après avoir cerclé le pourtour des coupes avec une pointe de diamant, de manière à bien repérer le fragment microscopique. Toutes les dilutions des AC ont été effectuées dans du PBS-BSA à 1% (albumine sérique bovine).

(2) Marquage de l'actine polymérisée à la phalloïdine couplée à la rhodamine

La phalloïdine-RITC des laboratoires Sigma (réf. P5157) a été utilisée. C'est une phallotoxine rendue fluorescente par son couplage à un fluorochrome, la rhodamine. Nous avons ensuite procédé aux étapes suivantes:

- Fixation de la lame en paraformaldéhyde (PFA) à 4% durant 20 mn à température ambiante, rinçage 2 fois 1 mn en PBS,

- Bain de NH₄Cl 50 mM durant 5 mn dilué dans du PBS (diminue la fluorescence non spécifique induite par la fixation en PFA), rinçage 2 fois 1 mn en PBS.

- Perméabilisation au triton (triton 100 X SIGMA) dilué à 0.3% dans du PBS durant 10 mn. Le triton est un détergent qui assure la rupture des membranes plasmiques pour que la phalloïdine pénètre la cellule et puisse se fixer sur les filaments d'actine,

- Rinçage 2 fois 1 min en PBS, essuyage du pourtour des coupes,

- Application de 50 µl par lame d'une solution de phalloïdine diluée au 1/200ème durant 30 mn en chambre humide (précautions de manipulation), rinçage 2 fois 1 min en PBS.

- Montage des lames dans une solution composée de 12,5mg de Dabco (Sigma, réf D2522) dissout dans 500 µl de Mowiol (Calbiochem, réf475904) préparée extemporanément,

- Conservation des lames dans du papier d'aluminium à - 4°C à l'abri de la lumière, - Les lames sont lues au microscope à fluorescence à une longueur d'onde excitatrice pour la rhodamine (lumière verte).

(3) Coloration avec l'AC anti-lactase

Cet Ac de souris anti-rat a été aimablement fourni par Madame Kedinge (INSERM

U381, Strasbourg) et utilisé selon la procédure suivante:

- Fixation du prélèvement en PFA à 1 % à température ambiante durant 10mn, suivi de rinçage 2 fois 1 min en PBS. Le marquage par la technique d'immunoperoxydase indirecte a compris quatre étapes:

(a) Application de l'AC primaire

Dilution de l'AC anti-lactase au 1/100^e, séchage du pourtour des coupes et application de 50 µl de la solution au 1/100^{ème} sur chaque coupe durant 1 heure à température ambiante en chambre humide afin d'éviter la dessiccation de la coupe et l'évaporation de l'AC, suivi d'un rinçage de 2 fois 1 min en PBS (élimination des AC fixés de manière non spécifique).

(b) Application du deuxième AC

Application du deuxième AC de rat anti-souris biotinylé (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc réf.415-065-100) avec 50 µl d'une solution au 1/200^{ème} durant 30 mn dans la chambre humide et rinçage 2 fois 1 min en PBS.

(c) Application du complexe marqué

Application du complexe Streptavidin-biotinylated horseradish peroxydase (Réf RPNI05I, Amersham) 50 µl d'une solution au 1/20^{ème} durant 30 mn sous une chambre humide avec rinçage 2 fois 1 min en PBS.

(d) Révélation de la peroxydase

Préparation extemporanée de la solution de révélation, à base d'ABC (9 éthyl-3 aminocarbazol, Aldrich-chemie) (précautions de manipulation car produit mutagène).

Ainsi, 10 mg d'ABC étaient mélangés avec 2,2 ml de N,N-diméthyl-formamid (Aldrich-chemie) et 50 ml de tampon acétate 0,1 M puis filtration et activation par 50 µl d'eau oxygénée suivi de l'immersion des lames durant 2 à 3 mn jusqu'à ce que l'intensité de la coloration ait été jugée satisfaisante. La réaction est stoppée en passant les lames sous l'eau.

Réalisation d'une post-fixation en formaldéhyde-acétate (20 ml de formaldéhyde 40% avec 100 ml d'eau et 100 ml de tampon acétate 0,1 M) durant 10 mn et rinçage 2 fois 1 min en PBS. Contre coloration à l'hématoxyline de Harris et montage de la lame dans une solution de glycérine de Kaiser (Laboratoires Merck).

(4) Coloration avec l'AC anti-villine

Il s'agit d'un AC monoclonal de souris contre la villine de porc, aimablement fourni par Madame le Dr Sylvie Robine (Institut Curie, Paris). A partir d'une solution-mère dosée à 10 mg/ml, il s'utilise dilué au 1 /1000^{ème} selon le même protocole que l'AC anti-lactase (cf ci-dessus)

(a) Coloration avec l'AC anti-laminine 1

Il s'agit d'un Ac polyclonal de lapin (AC 6-8S) extrait de la tumeur EHS produit par Madame Simon-Assmann et aimablement fourni par Madame Kedingler. Aucune fixation de l'échantillon n'a été nécessaire. Application directe de 50 µl d'une solution

au 1/200^{ème} de l'AC primaire sur la coupe durant une heure, à température ambiante, en chambre humide puis rinçage 2 fois 1 min en PBS.

Application du second AC de cochon anti-lapin (réf Dako P0217) directement couplé à la peroxydase dilué au 1/50^{ème} avec 10% de sérum de rat non immun (50 µl par lame) durant 30 min en chambre humide et rinçage 2 fois 1 min en PBS et immersion dans la solution de révélation à l'ABC (cf technique de l'AC anti-lactase).

III.3.1.B. Résultats

(1) AC anti-laminine type 1

(a) Animaux témoins

A E17 (Fig. 17A), il y a un marquage linéaire et continu de la membrane basale située à la base de l'épithélium pluristratifié, qui respecte l'épithélium. On note aussi un marquage irrégulier au niveau des vaisseaux du chorion, et au niveau de la couche musculaire. Cet aspect est retrouvé aux dates plus tardives (Fig. 17B), avec un marquage de la membrane basale qui suit le contour des villosités dès leur apparition à E19. Dans le chorion, les marquages vasculaires sont mieux individualisés.

(b) Animaux occlus

Il n'a pas été noté de modification du marquage observé avec l'AC anti-laminine chez les animaux inclus dans le protocole. Ce résultat a été constaté pour toutes les durées d'occlusions (y compris les plus longues, 96 h), et pour tous les prélèvements qu'ils soient en amont ou en aval de l'occlusion.

(2) Avec l'AC anti-villine

(a) Animaux témoins

A E17 on note un discret marquage à l'apex des cellules de l'épithélium pluristratifié en contact avec la lumière digestive (Fig. 17C). Puis, le marquage se renforce en restant toujours à l'apex de ces cellules qui deviennent des entérocytes. A E21 (Fig. 17D), il borde toute la surface de l'épithélium y compris au niveau des cryptes.

(b) Animaux occlus

Aucune modification du marquage de la villine n'a été mise en évidence par rapport aux animaux témoins décrits précédemment

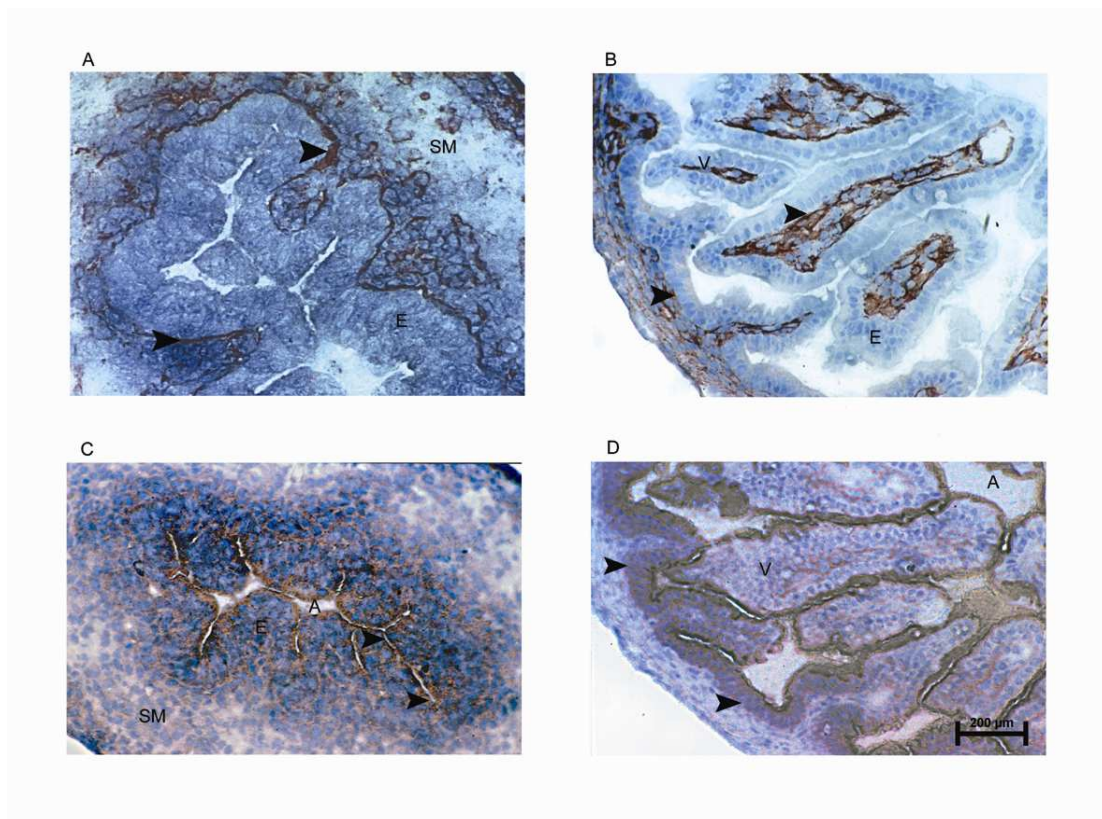


Fig. 17 : colorations avec la Laminine et la Villine de l'intestin de fœtus de rats à E17 et E21 (A: Laminine à E17, B: Laminin à E21, C: Villin à E17, D: Villin à E21). Sm : sous muqueuse ; E : épithélium ; V : villosité ; A : apex des villosités. (x250 – contre-coloration à l'hématoxylin)).

(3) Avec l'AC anti-lactase

(a) Animaux témoins

Le marquage par l'AC anti-lactase commence à apparaître chez certains foetus à E18. Il est constant chez tous les animaux prélevés à E19 et est localisé à la surface des entérocytes sous forme d'un liseré continu rappelant l'aspect observé avec l'AC anti-villine.

(b) Animaux occlus

Aucune modification du marquage de la lactase n'a été mise en évidence notamment en ce qui concerne sa répartition entre les segments prélevés en amont de l'occlusion et ceux prélevés en aval quelle que soit la date de l'occlusion.

(4) Avec l'AC anti-phalloïdine

(a) Animaux témoins

A E17, un très faible marquage est observé à l'apex des cellules de la couche superficielle de l'épithélium pluristratifié. A E18, les cellules marquées ont une forme hexagonale et à partir de E19 le marquage révèle les microvillosités de la bordure en brosse et leur zone d'insertion, le plateau terminal. A E21, la surface épithéliale a un aspect en nid d'abeille, avec des structures régulières et hexagonales. Un renforcement du marquage est également présent sur les faces latérales des entérocytes contiguës.

(b) Animaux occlus

Aucune modification de l'architecture et de la cohésion des entérocytes n'a été observée chez les animaux occlus aussi bien en amont qu'en aval de l'occlusion et ce quelle que soit la durée de l'occlusion.

III.3.1.C. Interprétation de cette étude

Dans le groupe des foetus occlus, aucune anomalie de marquage des 4 molécules attestant de la différenciation de l'épithélium digestif (Laminine type 1, Villine, Lactase, Phalloïdine) n'a pu être mise en évidence, y compris pour la laminine qui joue pourtant un rôle prépondérant dans l'organisation tissulaire durant cette période.

La faible durée de l'occlusion et son faible retentissement mécanique pourraient peut-être expliquer cette absence de modification qui concorde avec l'absence d'anomalie histologique de l'épithélium. L'utilisation de ces marqueurs dans un modèle d'occlusion intestinale chez le gros animal où la durée d'occlusion et le retentissement histologique sont plus importants, permettrait peut-être de détecter des modifications à l'origine d'anomalies ultrastructurales.

En ce qui concerne la répartition de la lactase, nous n'avons pas observé de différence d'expression entre l'amont et l'aval, et entre les animaux opérés et occlus. Dans la littérature, l'utilisation de dosages quantitatifs de l'activité lactasique chez l'homme⁽⁴⁴⁾, et chez le rat⁽¹⁹⁾ (occlusion par ischémie mésentérique), montre une baisse d'activité en amont des occlusions. Cette différence avec nos résultats peut s'expliquer soit par le caractère moins quantitatif de la méthode immuno-histochimique que nous avons utilisée, soit par un plus grand retentissement des occlusions induites par une ischémie mésentérique.

La structure hexagonale des entérocytes, étudiée par l'intermédiaire de l'actine polymérisée, n'a pas non plus été modifiée au niveau de la bordure en brosse et sur les faces latérales intercellulaires. On peut donc penser que les systèmes de jonction impliquant l'actine (jonctions adhérentes), que nous n'avons pas pu étudier directement, ne sont pas modifiés.

III.3.2. Recherche des effets d'une obstruction intestinale anté-natale sur la différenciation intestinale neuro-musculaire

De la même manière que nous avons pu étudier des marqueurs épithéliaux, nous avons effectué sur notre modèle une étude immunohistochimique d'un marqueur de la différenciation neuronale (la synaptophysine) et d'un marqueur de la différenciation musculaire lisse (α smooth muscle actin, SMA).

Nous avons effectué cette étude sur des fœtus opérés à E18, période clé de l'apparition du développement du SNE et des couches musculaires lisses intestinales. Cette étude est résumée dans l'article présenté ci-dessous.

III.3.2.A. Article (soumis à *Pediatric Research*)

Myenteric plexus alterations downstream from a prenatal intestinal obstruction in a rat model.

Fourcade L, Mousseau Y, Jaubert F, Sturtz FG.

Pediatric Surgery Department, CHU Limoges, France. laurent.fourcade@chu-limoges.fr

Neuroscience Letters

Volume 461, Issue 2, 11 September 2009, Pages 126-130

[doi:10.1016/j.neulet.2009.06.009](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.009)

Abstract

The enteric nervous system maturation occurs during embryonic life and continues after birth. Some prenatal events on the digestive tract such as intestinal atresia have been shown to dramatically alter this maturation. Thus, we developed a fetal rat model of intestinal atresia by surgically obstructing the small bowel at embryonic day E18. Fetuses were removed at day E21, and small bowels sections were examined by immuno-histochemistry. Synaptophysin and smooth muscle actin staining was used to define the cellular aspect. Labeling revealed marked alterations of the myenteric plexus in the lower extremity of the occluded small bowel. At day E21, the myenteric plexus of the lower part and the 2 muscle layers surrounding it, retained the staining pattern observed at day E17. This cellular pattern was classified as: immature (aspect at day E17) vs. mature (aspect of day E21) by 3 pathologists not familiar with the study. The number of samples with an immature cellular pattern at the lower end of the occluded bowel was different from that observed for the upper end (Mac Nemar test, $p < 0.008$). Our study suggests that a prenatal obstruction induces a maturation delay of the myenteric plexus downstream of the obstruction. This might be important for pediatric purposes.

III.3.3. Interprétation et perspectives pour la suite du travail

Nota bene : Pour la clarté de l'exposé dans notre article, nous n'avons pas présenté tous les résultats que nous avons obtenus. En effet, nous n'avons pas décrit dans l'article que l'intervention a été réalisée également à E19 et E20 et, de manière surprenante, même à ces dates tardives où la durée minimale d'occlusion est de 24 h nous avons également obtenu des perturbations nettes du SNE.

III.4. Cinétique d'expression des marqueurs neuromusculaires au sein de l'intestin grêle en développement

Les résultats préliminaires précédents nous ont montré qu'une occlusion mécanique de survenue anténatale semblait avoir des répercussions sur la différenciation du SNE au niveau du segment d'aval. De ce fait, nous avons délibérément orienté la suite de notre travail vers l'étude du SNE. Cependant, l'étude précédente a mis en évidence l'absence de référentiel décrivant finement la chronologie de la différenciation du SNE chez le rat. Ainsi, devant un contexte pathologique, comme celui d'une obstruction intestinale anténatale, l'analyse des modifications éventuelles induites par cette obstruction était rendue difficile. Souhaitant poursuivre nos travaux avec le rat comme modèle expérimental, il nous a semblé nécessaire, de connaître plus précisément la chronologie du développement

normal du SNE chez cet animal. En effet, peu d'études ont fait état de l'immuno-marquage normal de marqueurs de la différenciation du SNE. C'est le but de l'étude suivante.

Le SNE dérive principalement du contingent vagal des CCN (du moins pour l'intestin moyen qui nous concerne ici) qui vont coloniser le tube digestif en migrant de manière cranio-caudale. Ces cellules atteignent chez le rat, d'abord l'intestin antérieur à E9,5 puis l'intestin postérieur à E14.5. Durant la migration et lors de leur arrivée à destination, ces cellules sont des neurones immatures peu différenciés. Le développement et la maturation neuronale sont sous le contrôle de protéines qui ont des rôles spécifiques et différents mais qui ont comme objectif commun de favoriser la croissance axonale et la différenciation neuronale. GAP-43 (Growth associated protein-43) est une protéine exprimée à des niveaux élevés par les neurones en développement et par les neurones en cours de régénération au moment de la croissance axonale. Elle a été reconnue comme étant impliquée dans la croissance des cônes et des neurites en extension qui sont les précurseurs des axones définitifs. La protéine Tau participe à la régulation de l'assemblage des micro-tubules en étant impliquée dans de nombreuses activités métaboliques comme le transport axonal et la croissance des axones. Synaptophysin (Sy) est un marqueur de la différenciation et du développement neuronal présent dans les vésicules présynaptiques et est impliqué dans la neuro-transmission. Nous avons étudiés la chronologie d'apparition de ces marqueurs au cours du développement embryonnaire du rat, de E14 à la fin du sevrage des rats nouveau-nés, au niveau du jéjunum.

III.4.1. Matériels et méthodes

III.4.1.A. Animaux

Cette étude a été menée sur des rats Sprague-Dawley. Le jéjunum a été prélevé sur des foetus aux dates suivantes, E14, E17, E19, E21 et des nouveau-nés aux dates post-natales (J), J1, J5, J10, J13 et J39. La date de la gestation était assurée par la présence de spermatozoïdes ou par la présence du bouchon vaginal post-coïtal (E0). Quatre animaux ont été inclus dans chaque date. Les prélèvements étaient fixés dans du liquide de Boin durant 6 heures avant d'être inclus en paraffine. Avant que les techniques immunohistochimiques ne soient réalisées sur les prélèvements, la bonne qualité et la bonne orientation des prélèvements (strictement transversale) était réalisée par marquage à l'HES.

III.4.1.B. Etudes immunohistochimiques

Les coupes en paraffine de 5 µm d'épaisseur fixées dans le liquide de Boin étaient d'abord plongées 20 min dans une solution d'hydrogène peroxydase à 0.3% diluée dans du méthanol pour bloquer l'activité peroxydasique endogène. Le marquage immuno-histochimique était alors réalisé en utilisant comme méthode de révélation le complexe avidin-biotin-peroxydase (ABC). Un AC monoclonal de souris anti-synaptophysine (dilution 1/5), un AC polyclonal de lapin anti-Tau (dilution 1/400) et un AC monoclonal de souris anti-GAP-43 (dilution 1/100).ont été utilisés. Nous avons également utilisé un AC monoclonal anti-SMA (1/50) comme marqueur des cellules musculaires lisses dans le but de délimiter le lieu du plexus myentérique. Un AC monoclonal de souris anti-PGP9.5 (protein gene product 9.5) dilué au 1/20 a été utilisé comme marqueur neuronal pour s'assurer de l'origine nerveuse des cellules

avant leur différenciation. L'antisérum est resté au contact des coupes avec une incubation de 12 heures à 4°C. Le second AC biotinylé dilué dans du PBS à 1/400^e est laissé en incubation pendant 1 heure puis le complexe avidin-biotin-peroxydase est laissé 30 min à température ambiante. L'activité peroxydasique est révélée par la diaminobenzidine et l'hydrogène peroxydase. Toutes les coupes sont ensuite contre colorées par l'hématoxyline et étudiées par microscopie optique.

III.4.1.C. Analyse quantitative de l'immunoréactivité des marqueurs neuronaux spécifiques

L'image des coupes immunohistochimiques a été enregistrée par une caméra CCD couplée à un microscope optique, relié à un ordinateur. L'image était alors projetée sur l'écran de l'ordinateur avant d'être analysée par un logiciel d'analyseur d'images (Immuno 4 image analyser, Alcatel; Grenoble, France). Pour calculer l'intensité de l'immunomarquage des 5 AC, les surfaces marquées par la peroxydase étaient exprimées en pourcentage par rapport à la totalité du prélèvement jéjunal étudié par la caméra. Les résultats étaient exprimés en pourcentage de surface immuno-marquée par rapport au reste de la lame.

III.4.2. Résultats

III.4.2.A. Microscopie optique

L'étude des coupes en microscopie optique a montré un faible marquage avec tous les AC à partir de E14 (Fig 18, 19) excepté pour la synaptophysine dont le premier marquage est vu à E19 (Fig 20).

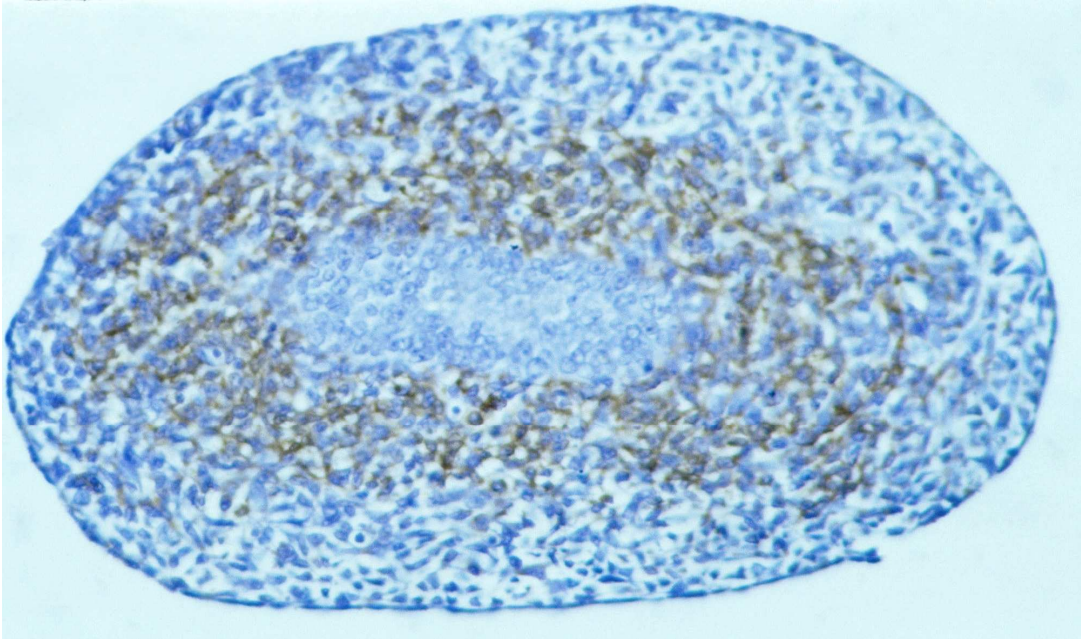


Figure 18: Coupe transversale de jejunum de rat à E14 montrant un mésenchyme lache coloré par la SMA (SMA immunomarquage X 600).

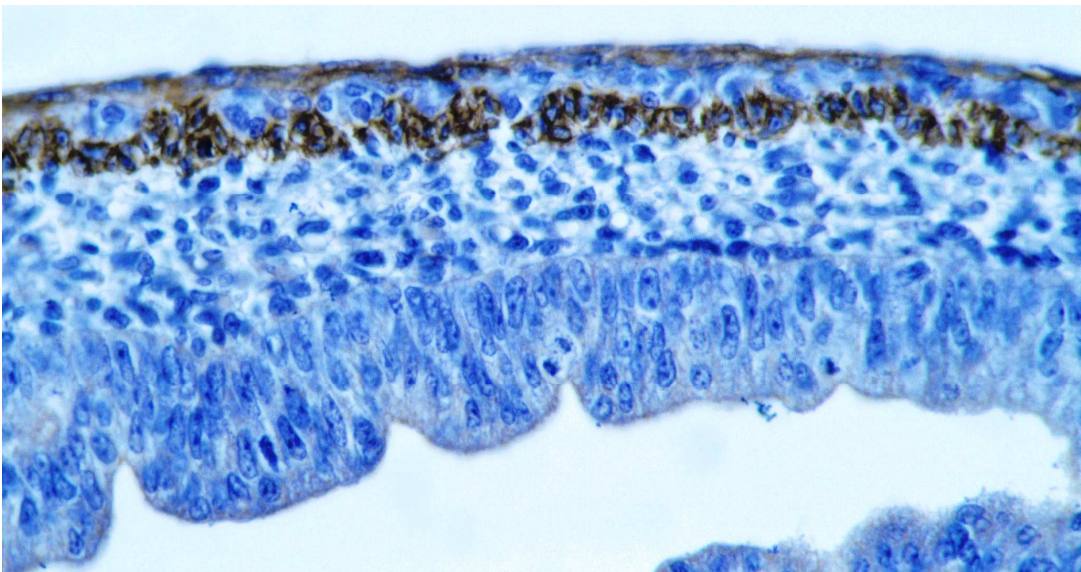


Figure 19: Coupe transversale de jéjunum de rat à E19. La place du futur plexus myentérique est visualisée entre les 2 couches musculaires lisses. (SMA immunomarquage X400)

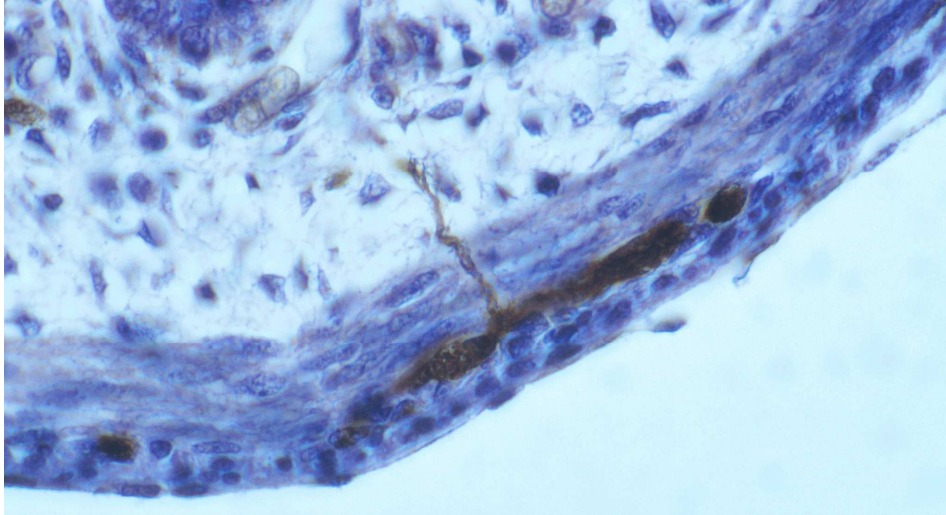


Figure 20: *Fibres nerveuses naissant d'un ganglion du plexus myentérique et se dirigeant vers la sous-muqueuse en traversant la couche musculaire interne. (synaptophysine X600)*

L'aspect du marquage était globalement le même pour tous les marqueurs neuronaux, à l'exception de PGP 9,5 et de la synaptophysine pour lesquels on retrouvait des fibres marquées dans la muqueuse (Fig 21).

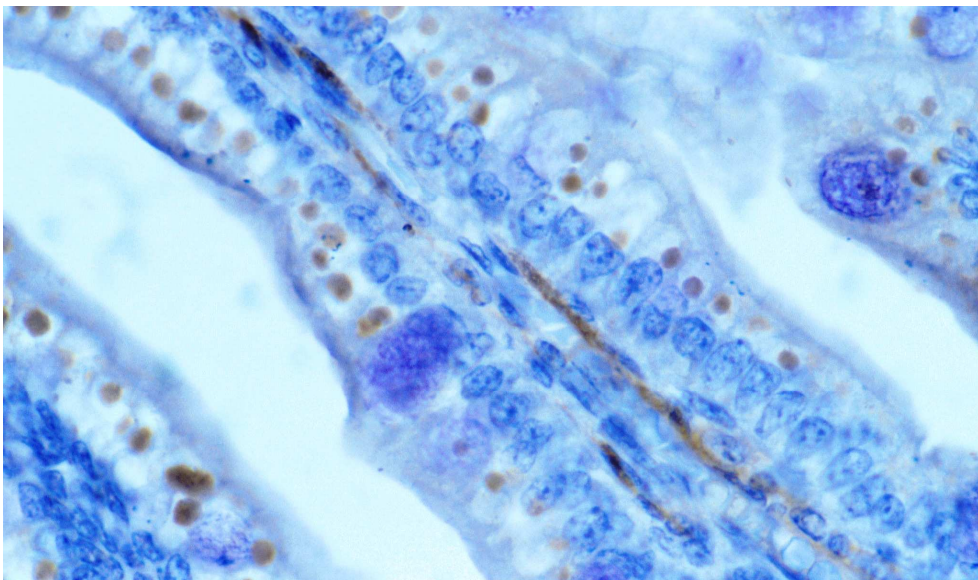


Figure 21: *Fibres nerveuses de la lamina propria positives pour la synaptophysine à J9 (synaptophysine immunomarquage X600)*

III.4.2.B. Analyse quantitative

Les courbes de l'immuno-marquage pour SMA, GAP-43 et TAU ont toutes un aspect identique à E17, avec un pic commun (Fig 22). La première visualisation de la synaptophysine se déroule à E19 et est précédée par un pic de Gap-43 de même que de Tau et de SMA. L'expression de la synaptophysine augmente après la naissance et cette augmentation se prolonge durant les 10 premiers jours après la naissance. La densité de l'immuno-marquage pour SMA et GAP-43 montre un pic commun à la naissance et à nouveau 6 jours après la naissance.

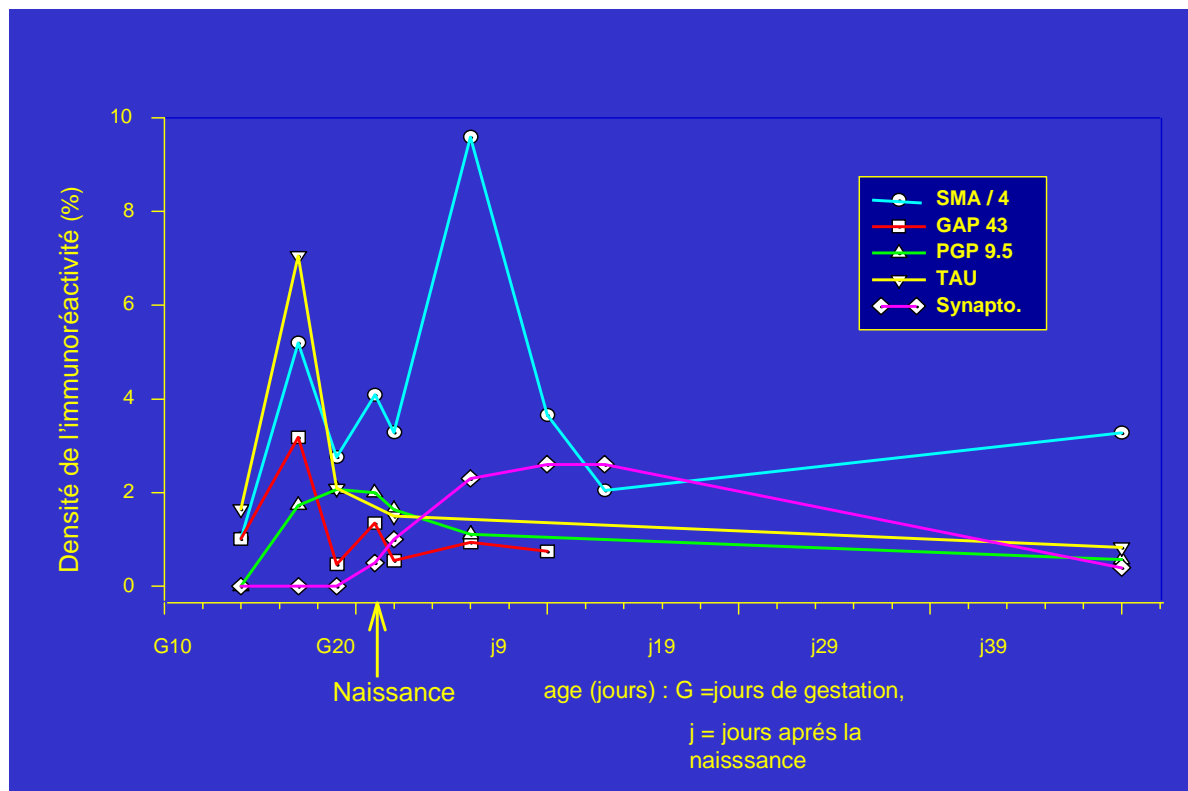


Figure 22 : chronologie d'apparition des marqueurs du SNE chez le rat.

III.4.3. Interprétation et perspectives par rapport à la suite du travail, utilisation ultérieure

Ce travail a permis de montrer pour la première fois la séquence chronologique d'expression de protéines impliquées dans la croissance des axones et des fibres nerveuses au sein du SNE. L'expression élevée de la protéine Tau (constituant des futurs axones) et de GAP-43 (constituant de l'ébauche des axones) comme préalable à l'apparition de la synaptophysine (marqueur des neurones fonctionnellement différenciés) suggère que Tau et Gap-43 jouent un rôle important dans la croissance axonale et donc de la différenciation des cellules du SNE du jéjunum de rat.

De manière à pouvoir utiliser ultérieurement un analyseur d'images, nous souhaitons travailler en coupes à paraffine dont notre maîtrise technique rendait des résultats plus fiables. Il a d'abord fallu mettre au point la technique d'immunomarquage de prélèvements intestinaux de fœtus de rats et de jeunes rats. Une fois des marquages obtenus, il a été possible d'étudier l'expression de ces marqueurs d'abord par un observateur puis de manière à obtenir des résultats quantifiables à l'aide d'un analyseur d'image. Cette technique pour être fiable nécessite d'étudier des lames dont les technique de marquage et de temps d'exposition au révélateur et à la contre coloration doivent être standardisés.

III.5. Développement d'un modèle d'atrésies intestinales multiples induites par l'injection d'adriamycine

III.5.1. Justification de la création de ce modèle

Les atrésies intestinales multiples sont une entité bien à part au sein de la famille des atrésies intestinales. Elles sont caractérisées par un pronostic vital catastrophique et par la présence d'une multitude de segments atrétiques dont certains sont complètement isolés et séparés du tube digestif sus et sous-jacent. La physiopathologie de ces anomalies n'est pas connue. Ces dernières années, a été développé un modèle animal expérimental chez le rat reproduisant la séquence malformative 'VACTERL', acronyme des différentes anomalies de ce syndrome (anomalies vertébrales, malformations ano-rectales, anomalies cardiaques, atrésies de l'œsophage avec fistule trachéo-oesophagienne, anomalies rénales et anomalies des membres). Dans ce modèle tératogénique, de l'adriamycine est injectée par voie intra-péritonéale à des rates gestantes. Des auteurs ont décrit l'apparition sporadique d'atrésies intestinales en plus des malformations que nous venons de décrire. Leurs recherches étant centrées sur les anomalies oesophagiennes et les anomalies cardiaques, ils n'ont pas détaillé plus avant les conditions d'obtention de ces atrésies intestinales ni les mécanismes menant à ces atrésies.

Toujours dans la démarche selon laquelle une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine des atrésies pourrait permettre de mieux appréhender les suites opératoires, nous avons mis au point les conditions d'obtentions d'atrésies intestinales dans ce modèle. Nous avons décrit ces atrésies et montré qu'elles

reproduisaient les atrésies intestinales multiples. Cette étude a fait l'objet d'une publication que nous présentons ci-dessous.

III.5.2. Article : “Multiple gastrointestinal atresias resulted from disturbed morphogenesis”

Multiple gastrointestinal atresias result from disturbed morphogenesis

L. Fourcade, H. Shima¹, E. Miyazaki¹ and P. Puri

Children's Research Centre, Our Lady's Hospital for Sick Children, Crumlin, Dublin 12, Ireland, IE

Pediatr Surg Int. 2001 Jul;17(5-6):361-4.

DOI:[10.1007/s003830000560](https://doi.org/10.1007/s003830000560)

Abstract : Multiple gastrointestinal atresias (MGA) have been reported to account for 6% to 32% of all intestinal atresias. Controversy exists regarding the pathogenesis. Many investigators believe MGA to be the result of multiple ischemic infarctions of the intestinal tract. However, some have suggested that MGA results from a malformative process early in fetal life. Prenatal exposure to adriamycin in a rat model has been reported to lead to a spectrum of tracheoesophageal and associated malformations of the gastrointestinal tract, including intestinal atresias, identical to these observed in humans. The aim of this study was to determine the incidence and histopathologic findings of MGA in order to understand the pathogenesis. Timed-pregnant Sprague-Dawley rats were injected with adriamycin (1.75mg/kg) in nine different gestational-day protocols. MGA was only seen in those rats who received adriamycin on gestational days 7, 8, and 9. The litters were recovered on day 21 by cesarean section. The digestive tracts (DT) of the fetuses were harvested for macroscopic and microscopic examination. Ten rats who received adriamycin on gestational days 7, 8, and 9 produced 87 newborns; 1 was damaged during dissection. DT anomalies occurred in 80 (93%) of the 86 newborns; 94% of these demonstrated MGA. There was a very high incidence of associated anomalies in newborns with MGA. Histologically, the blind-ending atresias showed different degrees of villous hyperplasia with or without intraluminal material. This is the first report demonstrating a high rate of occurrence of MGA in the adriamycin rat model. The injection of adriamycin early in gestation, the high incidence of associated malformations, and the anatomic and histologic findings in MGA indicate that MGA is a result of a malformative rather than an ischemic process.

III.5.3. Interprétation et Perspectives

La description des atrésies multiples obtenues dans ce modèle par injection d'adriamycine, a mis en évidence des segments intestinaux atrétiques suspendus, sans aucune continuité digestive ni avec le segment d'amont ni avec le segment d'aval. Nous avons montré dans le modèle d'atrésie intestinale mécanique (ligature) qu'il semblait que des anomalies de développement du SNE avaient été engendrée par cette ligature à type de retard de maturation du SNE. Ces anomalies ont été notées comme étant significatives sur le segment post-atrétique. Qu'en est-il de ces segments intestinaux suspendus, forme paroxystique d'atrésies intestinales ? Quelles sont les conséquences de telles anomalies anatomiques sur la différenciation du SNE ? C'est à ces questions que nous allons tenté de répondre dans l'étude suivante.

III.5.4. Conséquences des atrésies intestinales multiples précoces sur le développement du SNE de rat

Nous avons vu que les CCN étaient détectables au niveau de l'intestin antérieur à E9,5 et au niveau de l'intestin postérieur à E14 chez le rat. Les atrésies induites par l'adriamycine, le sont précocement durant la gestation (E7 à E9) reproduisant des images proches de celles observées chez l'Homme. Ainsi, d'un point de vue chronologique, il est probable que l'induction de ces atrésies interfère avec la maturation du SNE. Nous avons donc, en utilisant le même schéma expérimental que pour l'établissement de la chronologie de la différenciation du SNE, étudié la colonisation et la différenciation des CCN dans un contexte d'interruption précoce du tube digestif.

III.5.4.A. Matériels et méthodes

(1) Animaux

De l'adriamycine (Doxorubicin hydrochloride; David Bull Laboratories, Mulgrave, Australia) a été injectée par voie intra-péritonéale 3 jours consécutifs (E7, E8 et E9) à des rates gestantes de type Sprague-Dawley. Dans le groupe contrôle, du sérum physiologique stérile était injecté également par voie intra-péritonéale aux mêmes dates. La date précise de la gestation était assurée par la présence de spermatozoïdes ou par la présence du bouchon vaginal post-coïtal (E0). Les portées étaient extraites de l'utérus à E21 par césarienne sous anesthésie générale et divisés en 3 groupes :

- le groupe 1 (n = 5) : groupe contrôle
- le groupe 2 (n = 5) : fœtus ayant été soumis à l'adriamycine mais sans anomalie du tube digestif
- le groupe 3 (n = 16) : fœtus ayant été soumis à l'adriamycine avec prélèvement d'un intestin suspendu.

Le duodénum, le jéjunum et le colon étaient prélevés dans les trois groupes d'animaux.

(2) Etude immunohistochimique

Les prélèvements ont été fixés et le marquage immuno-histochimique a été effectué comme nous l'avons vu plus haut. Les mêmes AC anti-GAP-43, anti-Tau, et anti PGP9,5 ont été utilisés.

(3) Analyse quantitative de l'immunoréactivité

La même technique que précédemment a été utilisée, avec les mêmes règles de standardisation de la coloration par la peroxydase et de la contre-coloration à l'Hématoxyline de manière à assurer la reproductibilité des colorations.

(4) Statistiques

Les pourcentages de surfaces immunomarquées ont été comparés par analyse de variance (ANOVA). La différence entre les groupes était considérée comme significative si $p < 0,05$.

III.5.4.B. Résultats

Aucune atrésie intestinale n'a été mise en évidence dans les groupes 1 et 2. En revanche, de multiples atrésies intestinales ont été mises en évidence chez les 16 foetus du groupe 3. Ces atrésies formaient des segments de grêle imperforés et touchaient aussi bien l'œsophage, que le côlon et l'intestin grêle (Fig. 23).

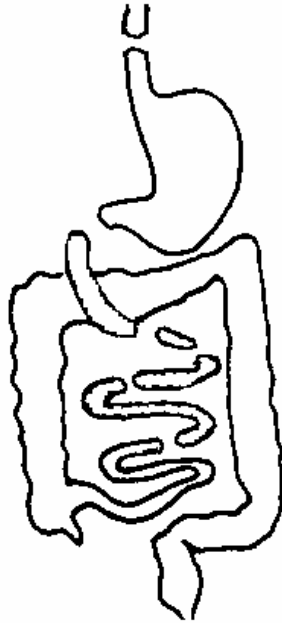


Figure 23: *Atrésies intestinales multiples chez les foetus du groupe 3. On notera la présence de segments intestinaux suspendus.*

(1) Coloration HES

Il n'a été noté aucune différence en coloration HES sur les différentes parties prélevées de l'intestin et ceci pour les animaux des 3 groupes.

(2) Etude immunohistochimique

Les immunomarquages par PGP 9,5, GAP-43 et Tau ont montré que le plexus myentérique était raréfié au niveau des prélèvements coliques des animaux du groupe 3 en comparaison de ceux des groupes 1 et 2. (Fig 24, 25).

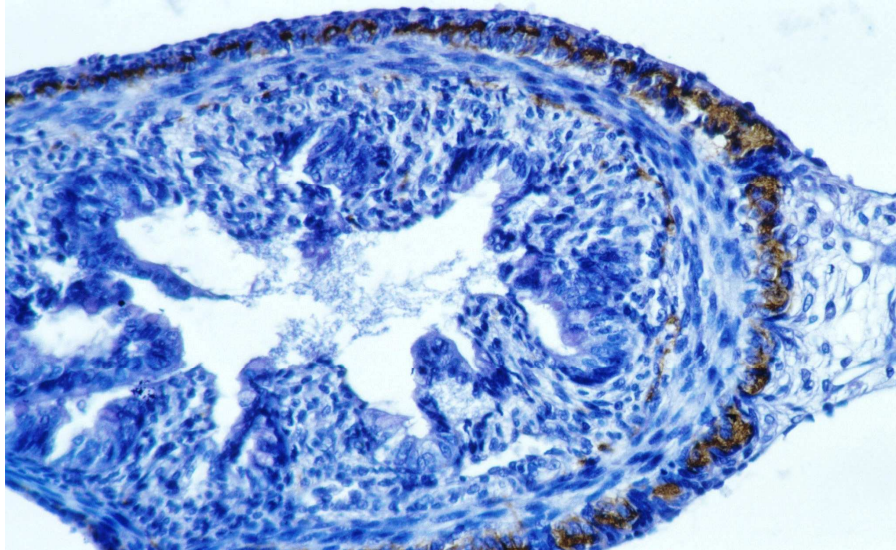


Fig.24 : coupe transversale de colon de rat normal (Groupe 1) à E21. On observe un plexus myentérique dense avec une faible coloration du plexus sous-muqueux. (immunomarquage par GAP-43 X250).

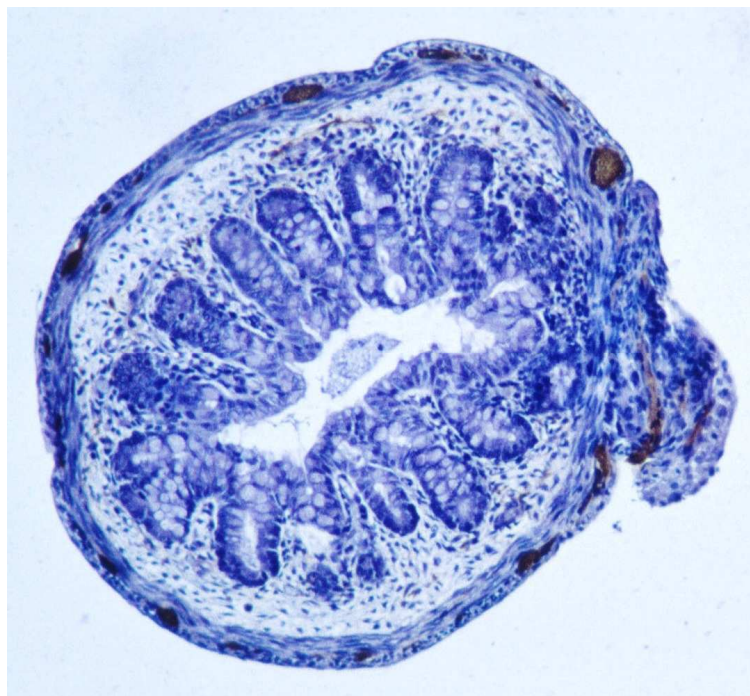


Fig.25 : coupe transversale de colon de rat avec des atrésies multiples (Groupe 3). On observe un plexus myentérique épars (immunohistochimie par GAP-43 X250).

(3) Analyse quantitative de l'immunomarquage

Il n'y avait pas de différence de marquage pour Tau, Gap-43 and PGP 9,5 au niveau du duodénum et ce pour les trois groupes (Fig 26).

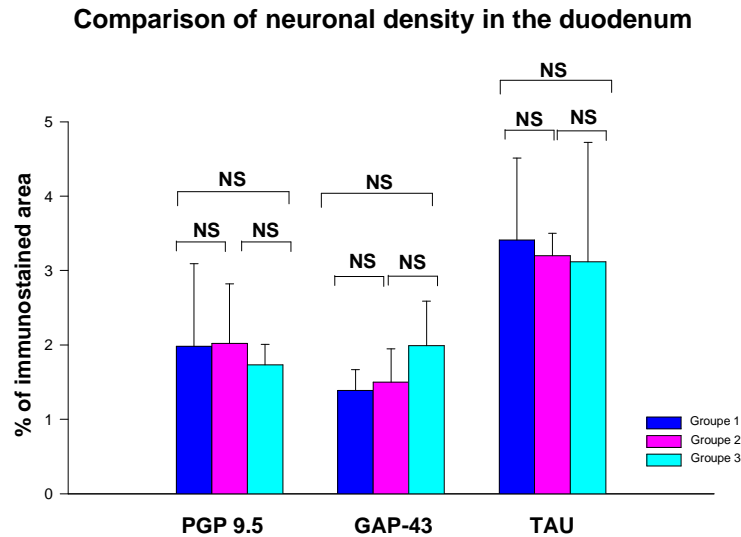


Fig.26 : Comparaison de la densité de l'immunomarquage entre les 3 groupes au niveau du duodénum. Aucune différence d'immunomarquage entre les 3 groupes n'a été mise en évidence.

Il y avait une baisse significative de l'immunomarquage de Tau ($p < 0.0001$) et de PGP 9,5 ($p < 0.05$) dans le jéjunum du groupe 3 en comparaison des groupes 1 et 2 (Fig. 27).

Comparison of neuronal density in the jejunum

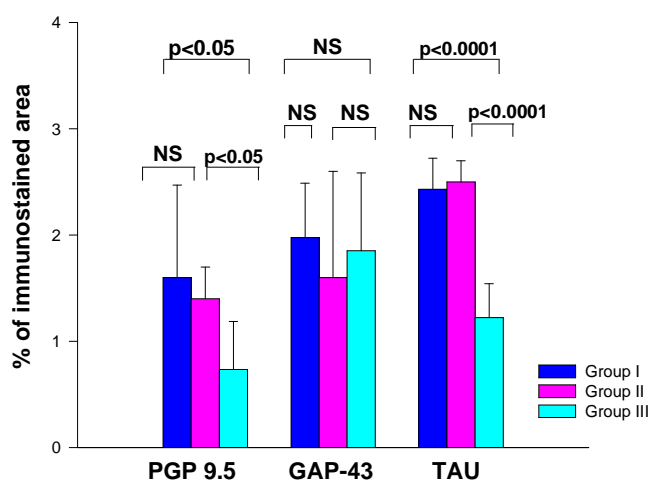


FIG.27 : comparaison de la densité de l'immunomarquage entre les 3 groupes au niveau du jéjunum. Une différence d'immunomarquage était visible pour TAU et PGP9,5.

L'immunomarquage du colon avec pour les 3 marqueurs était significativement diminué ($p<0.05$) dans le groupe 3 quand on le compare avec les groupes 1 et 2 (Fig. 28).

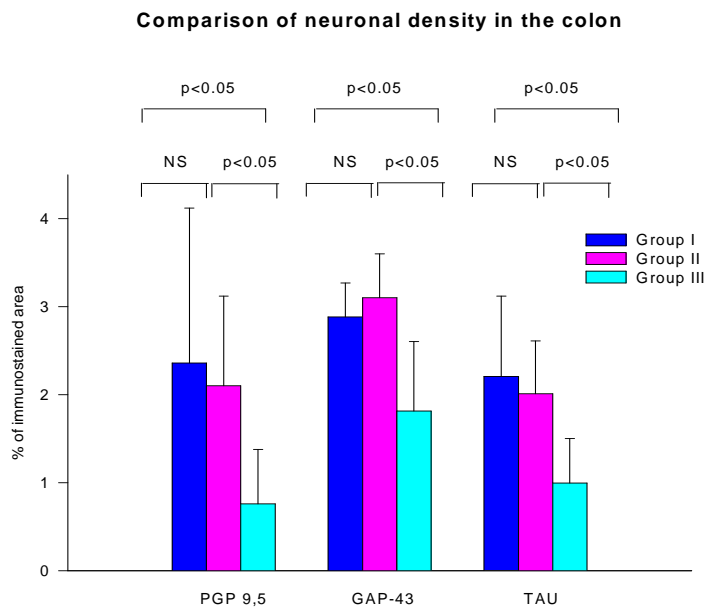


Fig.28 : comparaison de la densité de l'immunomarquage entre les 3 groupes au niveau du colon. Tous les marqueurs du groupe 3 présentaient une diminution significative par rapport aux marqueurs des groupes 1 et 2.

III.5.4.C. Conclusion

Nos résultats montrent qu'une rupture de continuité de l'intestin survenant précocement pendant l'organogenèse interfère avec la migration cranio-caudale des CCN au niveau du jéjunum et encore plus au niveau du côlon. En effet, le déficit en cellules marquées par PGP9.5 atteste du faible nombre de neuroblastes et le faible marquage par Tau, GAP43, atteste de leur défaut de maturation. La colonisation rétrograde par le contingent sacré semble incapable de combler le déficit en neuroblastes. Bien que les atrésies multiples soient rares chez les humains, ces données pourraient aider à mieux comprendre la physiopathologie des troubles

fonctionnels post-opératoires qui affectent 20% des patients après un traitement chirurgical d'atrésie intestinale.

III.6. Etude de la différenciation du plexus myentérique chez l'enfant prématuré et chez l'enfant à terme

III.6.1. Présentation de l'étude

Nous avons eu l'opportunité d'étudier des prélèvements intestinaux de nouveaux-nés à terme et prématurés. Les enfants prématurés présentent une plus grande fragilité intestinale que les enfants à terme, favorisant la survenue d'entérocolites ulcéro-nécrosantes (ECUN). De manière similaire aux anomalies du SNE que nous venons de montrer dans le contexte des atrésies intestinales, des troubles de la motricité intestinale ont été suspectées comme étant à l'origine de ces ECUN. L'étude a été réalisée sur des whole-mounts préparations permettant d'établir une bonne évaluation de la densité neuronale au sein de ces tissus.

Marked morphological differences in the myenteric plexus between the mesenteric and antimesenteric sides of small bowel in premature infants

Laszlo Nemeth, Laurent Fourcade and Prem Puri

Children's Research Centre, Our Lady's Hospital for Sick Children, Dublin, Ireland

Journal of Pediatric Surgery

Volume 35, Issue 5, May 2000, Pages 748-752

[doi:10.1053/jpsu.2000.6050](https://doi.org/10.1053/jpsu.2000.6050)

Abstract

Background : The gastrointestinal tract appears morphologically prepared for oral feeding by the end of the second trimester, but many of the physiological processes required for efficient enteral nutrition are not developed fully until 33 to 34 weeks' gestation. Myenteric plexus is well recognized as an important regulator of peristaltic activity. Whole-mount preparation technique produces a 3-dimensional picture to better show the neuronal networks branching and interconnections. The aim of this study was to investigate neurone density and morphology of the myenteric plexus in premature infants using whole-mount technique. **Methods:** Full-thickness small and large bowel specimens were collected at autopsy from 6 premature babies (gestational age, 26 to 32 weeks) who died without evidence of gastrointestinal disease. Whole-mount preparation of the myenteric plexus was made and stained with NADPH-diaphorase and Acetylcholinesterase (AChE) histochemistry. The stained myenteric network was measured with a computer image analysis system. Controls included 4 full-term babies who died of nongastrointestinal disease. **Results:** In premature infants there were striking differences in neuronal density of myenteric plexus in the mesenteric and antimesenteric border of small bowel. The differences in neuronal density in mesenteric and antimesenteric border of small bowel gradually became less striking as the gestation progressed with no differences evident at gestational age 32 weeks. **Conclusions:** This study shows for the first time that the neurone density of myenteric plexus is significantly higher in the mesenteric border of the small bowel compared with antimesenteric border in premature infants. The marked morphological differences observed in neurone density in the small bowel of premature infants may contribute to immature small bowel activity.

III.6.3. Interprétation et Perspectives

Les résultats de cette étude montrent une diminution de la densité neuronale sur les prélèvements des enfants prématurés en comparaison de ceux nés à terme. Ainsi, la survenue plus fréquente des ECUN dans le contexte de prématurité pourrait être liée à cette diminution de la densité neuronale dont une des conséquences est la survenue de translocations bactériennes par stagnation du bol alimentaire.

Cet aspect immature prédomine sur le versant anti-mésentérique des prélèvements issus de patients prématurés. Elle est due à la différence de débit perfusion qui est plus élevée sur le bord mésentérique. Cette différence, mésentérique / anti-mésentérique, n'est pas significative sur des prélèvements de patients nés à terme avec donc, un SNE dont la différenciation est plus avancée. Elle traduit donc la richesse en facteurs trophiques des apports mésentériques durant la période de différenciation chez ces enfants prématurés.

Partie Discussion et Perspectives

IV. Partie discussion et perspectives

Cette étude a été suggérée par une problématique clinique à laquelle se heurtent les chirurgiens pédiatres, les réanimateurs néonataux ainsi que les gastro-entérologues pédiatres. En effet, ces différents intervenants sont amenés à prendre en charge les troubles alimentaires que présentent les enfants opérés d'une atrésie intestinale. Même si certains patients ne présentent pas de problèmes, d'autres, incapables d'assimiler le lait qui leur est proposé ne doivent leur survie qu'à la nutrition parentérale. Cette dernière, même si elle est de plus en plus affinée, est responsable d'une morbidité non négligeable avec en premier lieu la survenue d'infections systémiques. Ainsi, est née une recherche spécifique sur cette thématique comme l'atteste le grand nombre de publications sur le sujet. C'est une, recherche qui se doit d'être transversale, mobilisant plusieurs acteurs, de l'expert en mécanismes fondamentaux du développement au chirurgien....

IV.1. Synthèse et rappel des résultats obtenus- originalité des modèles

L'analyse de la littérature publiée sur cette thématique a mis en exergue 4 composantes pouvant être considérées comme responsables des troubles digestifs post-opératoires : des anomalies du segment d'amont, des anomalies du segment d'aval, des anomalies concernant soit le versant épithélial, soit le versant neuromusculaire de l'intestin juxta-atrétique.

Les résultats du premier modèle expérimental (ligature) ont permis de réduire le champ des investigations en suggérant une implication du SNE plutôt que de

l'épithélium dans la genèse de ces anomalies. Concernant la localisation des anomalies par rapport à l'atrésie, amont et / ou aval, les deux modèles mis au point ont montré une convergence des résultats avec l'implication possible du segment d'aval dans la survenue des anomalies observées (Fig. 29). Outre ces résultats, le contrôle de la nature de l'agent responsable des obstructions (ligature vs. adriamycine), a permis de mettre en exergue les rôles complémentaires du liquide amniotique et de la perfusion mésentérique, dans le développement du tube digestif dans ces situations pathologiques. Ce rôle trophique de la perfusion mésentérique, a été confirmé sur des prélèvements d'intestins, indemnes d'atrésie, d'enfants prématurés et nés à terme.

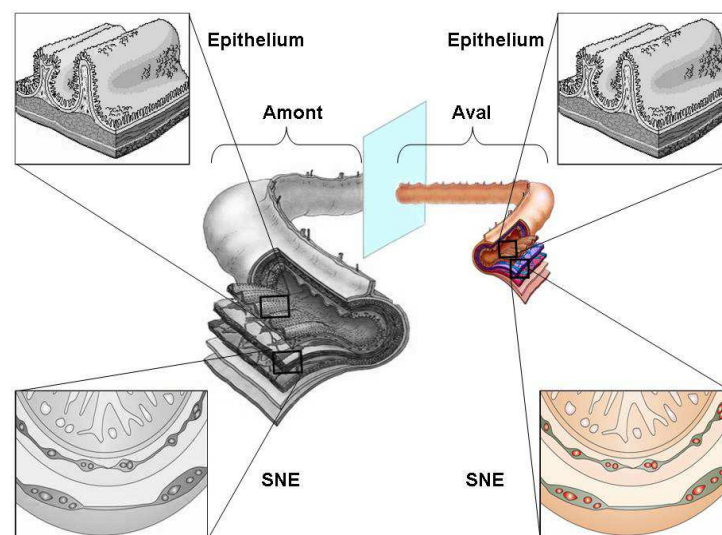


Fig. 29 : Mise en évidence d'anomalies du SNE au niveau du segment d'aval.

Ces résultats nous semblent originaux à double titre : d'une part, aucune étude n'avait jusqu'alors pu élaborer de modèle expérimental reproductible d'obstruction intestinale prénatale chez le petit mammifère et d'autre part, aucune étude n'avait pu aussi clairement démontrer la participation du SNE du segment d'aval dans la constitution des anomalies responsables des troubles de la motilité

intestinale dans le cadre des atrésies intestinales. Nous nous proposons maintenant de discuter de la validité, des limites et des perspectives ouvertes par ces résultats.

IV.2. Comparaison du modèle mécanique VS tératogénique

Cette étude a permis de mettre au point deux modèles animaux d'obstruction intestinale prénatale du tube digestif. Nous nous proposons de justifier le choix du rat comme modèle animal puis nous comparerons les résultats obtenus avec ces deux modèles en en dégagant les éléments novateurs.

IV.2.1. Choix du rat comme modèle animal

Les études effectuées chez l'Homme sur cette thématique sont rares et limitées. La compréhension des anomalies sur ces échantillons ne peut être que rétrospective. Pour des raisons éthiques évidentes, et en l'absence de modélisation du corps humain, l'utilisation d'un modèle animal s'impose. Ce choix est forcément réducteur et aucun modèle ne prétend reproduire avec exactitude ce qui se déroule chez l'être humain. Les modèles animaux décrits dans la littérature, au début de ce travail, ne nous semblaient pas permettre de pouvoir répondre à toutes les questions posées. Les travaux avaient essentiellement été entrepris sur des gros animaux (chien, brebis) ou chez le poulet. Ces modèles, malgré leurs limites, ont cependant permis de nombreuses avancées. Le rat est, avec la souris, l'animal de laboratoire le plus couramment utilisé dans le monde de la recherche. Du fait de la difficulté à effectuer des manipulations prénatales, ce modèle n'avait pas pu être développé

plus avant. Cependant, le rat présente de nombreux avantages. C'est un animal résistant, d'un coût d'achat et d'entretien réduit, appartenant à la classe des mammifères avec une durée de gestation courte (22 jours) et de nombreux fœtus à chaque portée. Il est possible d'opérer un fœtus sans mettre en péril le reste de la portée. Par ailleurs de nombreux réactifs lui sont consacrés dont une grande majorité sont également utilisables chez l'homme. Ainsi, du fait de ces nombreux avantages, notre choix s'est porté sur cet animal. Une fois les quelques contraintes techniques maintenant maîtrisées, cet animal nous paraît être un modèle animal pertinent dans ce contexte d'atrésies intestinale, en regard des autres modèles animaux d'obstruction prénatale du tube digestif. Il nous a en effet permis de répondre à la majorité des objectifs que nous nous étions fixés.

IV.2.2. Justification des deux méthodes d'obstruction prénatales utilisées

Les deux types de mécanisme à l'origine des obstructions sont à l'origine de résultats différents tant du point de vue des types d'obstructions constituées que des répercussions de ces obstructions sur le développement intestinal. Ces résultats suggèrent de nouvelles pistes diagnostiques voire thérapeutiques dans la prise en charge post-opératoire des patients opérés d'atrésies intestinales.

IV.2.2.A. Pose d'une ligature intestinale

Nous souhaitons pouvoir, dans un premier temps, utiliser une méthode d'obstruction qui interfère le moins possible avec le développement du tube digestif. Une telle méthode, en effet, permettrait de n'étudier que les conséquences de

l'obstruction sans interférence du mécanisme obstructif lui-même. La pose d'une ligature, en prenant garde à dévasculariser le moins possible l'intestin grêle, semblait pouvoir répondre à cet objectif. Nous avons démontré la faisabilité de cette technique à partir de E16, date de pleine différenciation intestinale avec l'anse intestinale primitive qui n'est toujours pas réintégrée. Cette technique nous a autorisé à imputer les résultats obtenus à la seule présence d'une obstruction prénatale.

IV.2.2.B. Injection d'adriamycine

Nous étions conscient en utilisant un agent tératogénique d'avoir une moins bonne maîtrise des évènements à l'origine des atrésies. De telles techniques nécessitent en effet de prendre en compte dans l'interprétation des résultats, non seulement les conséquences de l'obstruction sur le développement intestinal, mais aussi l'impact de l'agent causal sur ces résultats.

En contrepartie, ce modèle nous a permis d'obtenir un nouveau terrain d'investigations à travers des atrésies sévères, avec des fragments intestinaux suspendus le long de l'axe mésentérique totalement déconnectés du tube digestif environnant, entraînant donc un important retentissement sur le développement intestinal.

De plus, les atrésies que nous avons obtenues sont proches d'une forme rare d'atrésies, toujours létales, rencontrées chez l'Homme⁽¹³⁰⁾. Ces atrésies, n'ont que rarement été étudiées dans la littérature. Ce modèle, nous l'espérons, permettra peut être d'apporter de nouveaux éléments de compréhension permettant une meilleure prise en charge de ces patients.

IV.2.3. Etude des différences structurelles intestinales de part et d'autre de l'obstacle

IV.2.3.A. Localisation des anomalies du développement en aval des obstructions

Les pièces opératoires d'atrésies intestinales montrent habituellement un intestin d'amont spectaculairement dilaté, avec un intestin d'aval de petite taille paraissant, de prime abord, sans anomalie. De ce fait, l'intestin d'amont a naturellement été pressenti comme étant le responsable des troubles post-opératoires survenant chez les enfants opérés. Ainsi, peu d'équipes ont développé une recherche spécifique à l'encontre du segment d'aval. Il a été parfois décrit comme ayant un aspect immature⁽⁵²⁾, voire un aspect collabé de sa lumière du fait de l'absence du passage de liquide amniotique. Nous n'avons pas mis en évidence d'anomalies de développement du SNE ni de l'épithélium. Par contre, les deux modèles expérimentaux présentés, ont tous les deux mis en évidence des anomalies du développement du SNE et des couches musculaires en aval des obstructions et ce, malgré des mécanismes d'obstructions très différents.

IV.2.3.B. Les anomalies du développement intestinal intéressent le SNE et la musculature intestinale

Nous venons de voir que les deux modèles avaient démontré des résultats convergeant quant à la localisation des anomalies observées. Ils ont également tous les deux montrés, qu'une obstruction prénatale avait des répercussions sur le développement à la fois du SNE et de la musculature intestinale.

(1) *Ligature intestinale*

Avec la pose d'une ligature intestinale, nous avons pu mettre en évidence des modifications de l'architecture générale du plexus myentérique à l'aide de deux marqueurs du SNE (synaptophysine) et du muscle lisse (SMA). Ces modifications semblent aller dans le sens d'un retard de maturation du plexus myentérique en aval de l'obstruction, par rapport à l'amont. Une telle anomalie, pourrait en partie expliquer l'amélioration spontanée (sous couvert d'un soutien parentéral) que présentent les enfants opérés d'atrésie avec des troubles fonctionnels post-opératoires.

(2) *Adriamycine*

Avec l'adriamycine, en utilisant plusieurs marqueurs de la croissance et de la différenciation neuronale, nous avons également montré des perturbations de la densité de l'immuno-marquage en aval des atrésies, soit au niveau de segments isolés, soit au niveau du colon, largement « déconnecté » des stimulations d'amont. Bien sûr, l'agent causal n'est pas le même et le rôle exact de l'adriamycine n'est pas connu. Ici, plus le segment digestif est distal, plus nous avons une diminution de la densité de l'immunomarquage. Nous avons également obtenu sur des fragments très isolés, un plexus myentérique qui était très désorganisé, avec de très rares ganglions nerveux. Paradoxalement, ces rares ganglions présentaient une différenciation relativement évoluée.

IV.2.4. Pistes étiologiques Facteurs extrinsèques

Ces résultats sont probablement la conséquences de trois facteurs qui interfèrent avec le développement normal du SNE: (i) le liquide amniotique, (ii) le rôle direct de l'adriamycine et (III) la vascularisation mésentérique.

IV.2.4.A. Le liquide amniotique

Le rôle clé du liquide amniotique dans le développement du fœtus et de nombreux organes comme le poumon ou le tube digestif n'est plus à démontrer. Des auteurs ont étudié le retentissement de son interruption en réalisant une obstruction anténatale au niveau oesophagien. Ils ont démontré l'importance de son passage tant pour le développement de l'épithélium à son contact que pour éviter un retard de croissance intra-utérin entraînant une hypotrophie de tous les organes dont le tube digestif^(48, 55). Les fœtus que nous avons obtenus dans le modèle de ligature ne présentaient pas de RCIU. On peut donc penser que les anomalies observées en aval ne sont pas dues à une hypotrophie de l'intestin grêle.

Malgré des étiologies obstructives différentes, on retrouve un élément commun à ces deux modèles : il s'agit de l'absence de circulation de liquide amniotique en aval des obstacles. Cette absence a des répercussions rapides, puisque même chez des fœtus opérés tardivement (E20 sur 21) des anomalies de différenciation du SNE sont mises en évidence.

Nous avons vu dans la partie bibliographique que des signaux étaient émis par le bol alimentaire vers le premier relais nerveux les IPANs par l'interaction des cellules neuro-endocrines. Ces nerfs ont la particularité d'être soumis en direct à des stimulations mécaniques. On peut raisonnablement penser que l'absence de

passage de liquide amniotique fait disparaître les stimulations mécaniques intraluminales indispensables à la stimulation et à la maturation du SNE dans ce contexte de développement.

IV.2.4.B. Le rôle de l'adriamycine

Dans le modèle tératogénique, même si l'absence de liquide amniotique doit intervenir, il ne faut pas négliger le rôle l'adriamycine. En effet, les injections ont eu lieu à E 7-8-9, alors que le front de la vague de migration des CCN colonise le colon à E13. Même si la date réelle de constitution des atrésies n'est pas connue, l'adriamycine interfère certainement avec la migration normale des CCN entraînant une diminution de l'immunomarquage et une désorganisation de l'architecture du SNE.

IV.2.4.C. La perfusion mésentérique

Le seul élément permettant aux fragments intestinaux isolés de survivre et de poursuivre leur développement est la vascularisation mésentérique. Malgré toutes ces perturbations, un certain degré de différenciation du SNE est tout de même visible et ce, même sur des fragments complètement déconnectés du reste du tube digestif. Ce rôle de la vascularisation mésentérique dans le développement du SNE n'a que rarement été évoqué, la migration des CCN étant considérées comme un essentiellement sous le contrôle d'interactions loco-régionales.

Nous avons vu sur les prélèvements intestinaux d'enfants prématurés que des différences de densité neuronales étaient visibles au dépend du secteur anti-mésentérique, moins bien approvisionnés en facteurs de maturation apportés par la

vascularisation. De telles différences n'étaient pas significatives sur les prélèvements d'enfants nés à terme ce qui traduit l'existence d'une régulation de ces apports en fonction du degré de maturation de l'intestin. Ainsi, en ce qui concerne notre problématique, on peut suggérer que dans un contexte de SNE d'aval déjà altéré par l'absence de circulation du LA, les troubles de la vascularisation inhérents aux atrésies aggravent encore cette désorganisation du SNE. Du côté de l'amont où la maturation n'est pas perturbée par l'absence de liquide amniotique, les répercussions sont moindres (comme les prélèvements à terme étaient moins affectés par rapport aux prélèvements prématurés).

IV.3. Perspectives de recherche

Maintenant que les modèles expérimentaux sont bien définis et que nos résultats préliminaires semblent tous s'orienter vers un retard de maturation du SNE et des couches musculaires en aval des obstructions, il paraît possible d'aller plus avant dans les recherches déjà effectuées en utilisant d'autres marqueurs et d'autres techniques.

IV.3.1. Pace-maker intestinal

La régulation de la motricité intestinale et des ondes lentes est sous l'influence des cellules de Cajal. La répartition de ces cellules a été étudiée dans ce contexte d'atrésie chez l'Homme⁽⁴⁶⁾ et chez le poulet⁽¹³¹⁾. Une diminution de la présence de ces cellules en amont a été mise en évidence, traduisant un « épuisement » pour tenter de franchir l'obstacle. Nous nous proposons de vérifier ces données sur nos modèles.

IV.3.2. Cellules gliales

Nous n'avons pas mis en évidence d'anomalies épithéliales, bien que ce dernier soit impliqué dans l'absorption intestinale. Des données récentes ont montré que les cellules gliales, composante à part entière du SNE, étaient impliquées dans la perméabilité de la barrière intestinale⁽¹³²⁾ au niveau de la muqueuse intestinale⁽¹³³⁾.

La mise en évidence dans nos modèles d'une altération des cellules gliales permettrait peut être de mieux comprendre les altérations de l'absorption que présentent les enfants opérés d'atrésies intestinales.

IV.3.3. Neuropeptides

Les neuropeptides, nous l'avons vu, sont nombreux avec des rôles spécifiques sur la régulation de la digestion à type de contraction ou de relâchement. La mise en évidence d'altération de leur expression au sein de nos modèles apporterait, en fonction de leur spécificité, des données permettant une meilleure appréciation des troubles fonctionnels décrits.

IV.3.4. Devenir des neuroblastes

L'évolution naturelle qui transforme le plexus myentérique immature d'un ruban continu en un aspect mature en chapelet n'est pas connue. S'agit-il d'un phénomène d'apoptose des neuroblastes immatures, s'agit-il d'une nouvelle répartition des neurones, s'agit-il d'une diminution de la taille des corps cellulaires de neuroblastes dont une partie du volume a diminué au profit de la croissance axonale ? Nous n'avons pas encore répondu à ces questions. Ces études peuvent

être réalisées dans nos modèles. L'apoptose neuronale peut être mise en évidence sur des coupes histologiques. Un éventuel changement de la répartition des neurones au sein des différents plexus serait avantageusement visualisé par la réalisation de whole-mount préparation.

IV.3.5. Modèles d'atrésies chez le gros animal

Une des limites du rat est l'impossibilité de rétablir la continuité digestive à la naissance. Une intervention post-natale (rétablissement de continuité, dérivation digestive) permettrait de suivre l'évolution et peut être de tenter des traitements. De tels objectifs ne sont possibles que sur des modèles expérimentaux à type de « gros animaux » comme le mouton. Ces modèles permettraient en outre, de bénéficier d'une plus longue période d'occlusion anténatale (limitée chez le rat) et permettraient de suivre cliniquement et par des méthodes d'enregistrement électromyographiques le degré de maturation du système nerveux entérique au décours de la chirurgie faite à la naissance.

IV.4. Perspectives cliniques

Nous l'avons vu, les problèmes non résolus restent nombreux, et il n'est pas question dans ce chapitre de proposer d'emblée des modifications radicales de prises en charge thérapeutique des patients. Certaines pistes peuvent cependant être évoquées.

IV.4.1. Caractérisation de facteurs pronostiques

En l'absence de traitement curatif, il serait important de disposer de facteurs pronostics permettant de classer le patient à traiter dans un groupe à risque (bas risque, risque intermédiaire ou haut risque) de voir survenir ces anomalies fonctionnelles post-opératoires.

L'idéal, serait de disposer d'arguments anténataux orientant le pronostic de l'enfant. Les études concernant le dosage des enzymes digestives dans le liquide amniotique n'apporte pas ces éléments. Certains considèrent que le degré d'hydramnios peut être corrélé à la mauvaise récupération des patients⁽³¹⁾. En cas de confirmation de ces données ou de l'existence d'autres critères, la prise en charge chirurgicale pourrait être modifiée en réalisant peut être, en cas de marqueurs péjoratifs une dérivation digestive de première intention...

En attendant la découverte de facteurs prénataux, l'analyse anatomopathologique des pièces de résection pourrait apporter une aide précieuse. Actuellement, l'analyse anatomopathologique faite en routine, recherche la présence de cellules ganglionnaires, mais aucune analyse plus fine n'est réalisée. Fort de nos résultats, et de ceux réalisés chez l'Homme par Khen et al.⁽⁴⁶⁾, l'étude systématique d'anomalies de la différenciation du SNE pourrait peut être permettre d'affiner le pronostic clinique et d'anticiper d'éventuelles anomalies de réalimentation.

IV.4.2. Modifications thérapeutiques à court terme : restauration du flux d'aval

IV.4.2.A. Minimal enteral feeding

En pratique, au décours d'une intervention pour atrésie intestinale chez un enfant eutrophe, avec une longueur de grêle normale, la prise en charge de l'alimentation de l'enfant est relativement bien standardisée⁽¹³⁴⁾. Une fois passée la phase de l'iléus post-opératoire, l'alimentation orale est introduite très progressivement, idéalement avec du lait de mère ou des hydrolysats permettant une meilleure assimilation que le lait de vache classique. Le volume est augmenté, jusqu'à ce que l'alimentation entérale assure une autonomie nutritionnelle totale à l'enfant. Les troubles fonctionnels surviennent soit immédiatement, soit à partir d'un certain seuil alimentaire au-delà duquel, l'intestin se comporte comme étant saturé.

Pour pallier à ces problèmes, une nutrition minimale (minimal enteral feeding MEF) a été proposée basée sur une « perfusion » entérale à très petite doses de manière à imbiber progressivement le tube digestif des facteurs trophiques et nutritifs du lait^(135, 136). Cette alimentation reste bien sur complémentaire du support parentéral. Ainsi, cette technique semble adaptée aux anomalies que nous avons décrites en tentant d'accélérer progressivement la récupération d'anomalies réversibles.

IV.4.2.B. Irrigation du segment d'aval

Même si la prise en charge actuelle d'une atrésie passe par la résection et l'anastomose en un temps, il est des situations où une dérivation intestinale est nécessaire. Ces dérivations, permettent en général une alimentation entérale rapide.

En fonction du niveau proximal ou distal de cette entérostomie, l'enfant peut

être sevré du cathéter et de la nutrition parentérale, sous stricte surveillance du bilan hydro électrolytique. Le rétablissement de continuité est effectué dans les semaines qui suivent sur des critères de poids essentiellement, au risque de voir apparaître lors du rétablissement de continuité des troubles fonctionnels intestinaux. L'irrigation de la stomie d'aval par des facteurs trophiques ou par les selles issues de la stomie d'amont permettrait une stimulation efficace du segment d'aval gage de succès lors du rétablissement de continuité.

IV.4.3. Pistes thérapeutiques à plus long terme : restauration de la trophicité intestinale

Les techniques chirurgicales de traitement in-utero des malformations congénitales n'ont pas fait preuve d'une grande efficacité. Le principal problème est que les interventions sont (pour des raisons techniques obstétricales évidentes) tardives et, même si elles corrigent l'anomalie, cette correction intervient alors que des lésions irréversibles sont installées.

Les obstétriciens interventionnels, maîtrisent de mieux en mieux les abords du foetus, permettant la réalisation de prélèvements sanguins ou des injections sélectives in-utéro de médicaments. Parallèlement, de nombreux facteurs de croissances sont maintenant disponibles pour des applications diverses.

Nous souhaiterions, en utilisant d'abord nos modèles animaux, tenter d'injecter in-utero de telles substances de manière à rechercher des améliorations de la maturation intestinale. En cas de validation sur ces modèles et des modèles de gros animaux, on pourrait imaginer, dans un futur raisonnablement proche, la

réalisation de telles injections dans ou au contact du segment d'aval pour en stimuler le développement déficitaire.

Conclusion

V. Conclusion

La prise en charge des évènements post-opératoires fait partie intégrante de l'acte opératoire. Après avoir opéré une atrésie intestinale, l'intervention ne sera considérée comme réussie que quand une alimentation normale aura été obtenue. La difficulté est que, même si les nouvelles sont rassurantes à la sortie du bloc opératoire, certains patients vont présenter une évolution défavorable. C'est alors que, tout naturellement, des regards suspicieux se tournent vers l'opérateur. « Es tu sûr de ton anastomose ? »... Il est toujours difficile de répondre avec certitude à cette question. Une meilleure connaissance de l'origine et de l'évolution des malformations peut aider le chirurgien à y répondre. C'est le but de ce travail de thèse.

Cette étude, bénéficie de l'expérience clinique et des résultats expérimentaux de nos prédécesseurs. Les recherches ont, jusqu'alors, principalement été concentrées sur le segment d'amont de l'atrésie. Les résultats obtenus (dilatation d'amont, épuisement neuro-musculaire juxta-atrétique et hypertrophie musculaire de proche amont) ont permis d'améliorer les techniques chirurgicales d'anastomose. Elles ont également montré, qu'au prix d'une réalimentation très progressive, le pronostic était favorable.

Nos résultats offrent de nouvelles perspectives dans ce contexte pathologique. Ils ont souligné l'atteinte du développement du SNE en aval de l'obstacle, allant dans le sens d'un retard de maturation du SNE. Cette donnée est compatible avec l'évolution clinique des patients qui, grâce et en l'absence de complications de la nutrition parentérale, finissent par guérir. Nos études expérimentales, ont suggéré que ce retard de maturation du SNE était consécutif à

l'absence de circulation du liquide amniotique en aval de l'atrésie. Cet effet serait potentialisé par des perturbations de la vascularisation mésentérique, perturbations inhérentes à l'atrésie.

Contrairement aux hypothèses suggérées par l'étude du segment d'amont, nos hypothèses une fois confirmées, pourraient offrir des développements thérapeutiques à moyen terme. Ainsi, l'injection anté-natale de facteurs trophiques à libération prolongée au contact ou dans l'intestin grêle d'aval pourrait permettre, en rétablissant une homéostasie convenable, de limiter les conséquences de l'atrésie sur la maturation du SNE.

Ainsi, nous espérons, par ce travail de thèse avoir pu apporter de nouvelles données aidant à la compréhension des troubles de la motricité intestinale présentés par les patients en post-opératoire du traitement des atrésies intestinales. Ces résultats devraient également permettre, de par leur apport cognitif, de mieux appréhender d'autres pathologies obstructives intestinales prénatales comme le laparoschisis, la maladie de Hirschsprung étendue et les malformations ano-rectales hautes.

Annexes

VI. Annexes

VI.1. Publications

VI.1.1. Articles

Nemeth L, Fourcade L, Puri P. Marked morphological differences in the myenteric plexus between the mesenteric and antimesenteric sides of small bowel in premature infants. *J Pediatr Surg* 2000 ; 35(5): 748-752.

Fourcade L, Shima H, Miyazaki E, Puri P. Multiple gastrointestinal atresias result from disturbed morphogenesis . *Pediatr Surg Int* 2001: 17(5-6): 361-364

Khen N, Jaubert F, Sauvat F, Fourcade L, Jan D, Martinovic J, Vekemans M, Landais P, Brousse N, Leborgne M, Nihoul-Fekete C, Cerf-Bensussan N, Sarnacki S; Group for the Study of Intestinal Atresia. *Pediatr Res*. 2004 Dec;56(6):975-80. Fetal intestinal obstruction induces alteration of enteric nervous system development in human intestinal atresia.

Mortell A, Fourcade L, Solari V, Puri P. *Pediatr Surg Int*. 2005 Mar;21(3):212-6. Bilateral megaureters in the Adriamycin rat model.

VI.1.2. Communications orales

1. Fourcade L, Sarnacki S, Cerf-Bensussan N, Jaubert F, Brousse N, Nihoul-Fékété C, Révillon Y ; Mise au point d'un modèle d'occlusion intestinale chez le

foetus de rat pour l'étude des conséquences de l'obstruction sur le développement de la muqueuse intestinale.

- 54 ème congrès de la société Française de Chirurgie Pédiatrique, Naples septembre 1997

- Congrès de l'ISEM, 18-21 juillet 1998 London, Ontario, Canada.

2. Fourcade L., Sarnacki S., Cerf-Bensussan N., Jaubert F, Brousse N, Nihoul-Fékété C., Révillon Y. Conséquences d'une obstruction mécanique sur le développement de l'intestin grêle chez le foetus de rat.

- VII ème Congrès de la société Francophone de Recherche en Pédiatrie, Nantes, 12 décembre 1997.

- 3 èmes Journées Francophones de Recherche en Néonatalogie, Nantes, 12 décembre 1997.

- Société Française de Gastroentérologie Pédiatrique, Paris 23 mars 1998.

- XXXIII Congres de la Société Européenne de Recherche Chirurgicale. Padoue Italie, 25 avril 1998.

- 55ème congrès de la société Française de Chirurgie Pédiatrique, Paris 22 septembre 1998.

3 Fourcade L., Puri P XLVI Annual International Congress of the British Association of Paediatric Surgeons ; 20-23 Juillet 1999 ; Liverpool ;UK. Timing and sequence of appearance of axonal growth in the enteric nervous system of fetal and newborn rat.

4. Fourcade L, Puri P 6 ème Annual Meeting of the Pediatric Colorectal Club ; Stockholm ; Sweden 24-26 Juillet 1999. Chronology of the differentiation of the enteric nervous system in rat colon.

5. L Fourcade, P Puri 1999 annual meeting ; Section on surgery ; American Academy of Pediatrics ; Washington ; USA , 8-10 octobre 1999. Prenatal Interruption of the mammalian gut interferes with the normal pathway of neural crest derived cells.

VI.1.3. Posters

1. L Fourcade, E Miyazaki, H Shima, P Puri.30 ème Congrès Annuel de l'American Pediatric surgical Association (APSA), 16-19 mai 1999, Rancho Mirage, Californie, USA

Multiple gastrointestinal atresias result from disturbed morphogenesis.

2. L Fourcade, P Puri.10ème Annual Meeting of the (ESPU) European Society for Paediatric Urology. 15-17 aril 1999 Istambul, Turkey. A new animal model of bilateral obstruction of the vesico-ureteric junction.

VI.2. Abréviations

ABC : avidin biotin complex

Ac : anticorps

Ach : acétylcholine

CCN : cellules de la crête neurale

ECUN : entérocolite ulcéronécrosante

GAP-43 : Growth associated protein-43

GDNF : glial cell line-derived neurotrophic factor

GFAP : gliary fibrillary acidic protein

HES : hématoxyline éosine safran

IPANs : intrinsic primary afferent neurons

LA : liquide amniotique

MAP : microtubule-associated-protein

MEC : matrice extra cellulaire

NANC : non-adrenergique-non-cholinergique

NSE : neuro specific enolase

OL : ondes lentes

PFA : paraformaldéhyde

PGP9.5 : protein gene product 9.5

RCIU : retard de croissance intra-utérin

SA : semaines d'aménorrhée

SMA : smooth muscle actin

SNC : système nerveux central

SNE : système nerveux entérique

TD : tube digestif

Bibliographie

VII. Bibliographie

1. Walker K, Badawi N, Hamid CH, Vora A, Halliday R, Taylor C, et al. A population-based study of the outcome after small bowel atresia/stenosis in New South Wales and the Australian Capital Territory, Australia, 1992-2003. *Journal of pediatric surgery*. 2008 Mar;43(3):484-8.
2. Dolk H. Methylene blue and atresia or stenosis of ileum and jejunum. EUROCAT Working Group. *Lancet*. 1991 Oct 19;338(8773):1021-2.
3. Hemming V, Rankin J. Small intestinal atresia in a defined population: occurrence, prenatal diagnosis and survival. *Prenatal diagnosis*. 2007 Dec;27(13):1205-11.
4. Goujard J, Vignac D, Vodovar V. Atrésies de l'intestin grêle dans 19 registres Eurocat. Paris, France: INSERM; 1992.
5. Ein SH, Shandling B. The late nonfunctioning duodenal atresia repair. *Journal of pediatric surgery*. 1986 Sep;21(9):798-801.
6. Boureau M. Les atrésies intestinales. In: Navarro J, Schmitz J, editors. *Gastroentérologie pédiatrique*. Paris: Flammarion Médecine Science; 1986.
7. Newman K. Jejunoileal atresia. In: K.T O, editor. *Surgery of Infants and Children*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1997. p. 1193-200.
8. Paterson-Brown S, Stalewski H, Brereton RJ. Neonatal small bowel atresia, stenosis and segmental dilatation. *Br J Surg*. 1991 Jan;78(1):83-6.
9. Haller JA, Jr., Tepas JJ, Pickard LR, Shermeta DW. Intestinal atresia. Current concepts of pathogenesis, pathophysiology, and operative management. *Am Surg*. 1983 Jul;49(7):385-91.
10. Sato S, Nishijima E, Muraji T, Tsugawa C, Kimura K. Jejunoileal atresia: a 27-year experience. *Journal of pediatric surgery*. 1998 Nov;33(11):1633-5.
11. Cheu HW, Grosfeld JL. The atonic baggy rectum: a cause of intractable obstipation after imperforate anus repair. *J Pediatr Surg*. 1992 Aug;27(8):1071-3; discussion 3-4.
12. Muller F, Dommergues M, Ville Y, Lewin F, Delvalez-Morichon N, Nihoul-Fekete C, et al. Amniotic fluid digestive enzymes: diagnostic value in fetal gastrointestinal obstructions. *Prenat Diagn*. 1994 Oct;14(10):973-9.

13. Rescorla FJ, Grosfeld JL. Intestinal atresia and stenosis: analysis of survival in 120 cases. *Surgery*. 1985 Oct;98(4):668-76.
14. Goeller G. Abortus humani monstrosi norimb hist anatom. *Misc Acad Nat Curios*. 1683.
15. Goujard J, Vignac. D, . VV. Atrésies de l'intestin grêle dans 19 registres eurocat. Paris, France: INSERM; 1981-1992.
16. Louw JH, Barnard CN. Congenital intestinal atresia; observations on its origin. *Lancet*. 1955 Nov 19;269(6899):1065-7.
17. Abrams JS. Experimental intestinal atresia. *Surgery*. 1968 Jul;64(1):185-91.
18. Koga Y, Hayashida Y, Ikeda K, Inokuchi K, Hashimoto N. Intestinal atresia in fetal dogs produced by localized ligation of mesenteric vessels. *J Pediatr Surg*. 1975 Dec;10(6):949-53.
19. Serrano J, Esahli H, Larsson L, Zetterstrom R. Experimental intestinal obstruction in rats. Studies on structure and disaccharidase activities. *Eur J Pediatr Surg*. 1991 Apr;1(2):92-6.
20. Tibboel D, Molenaar JC, Van Nie CJ. New perspectives in fetal surgery: the chicken embryo. *J Pediatr Surg*. 1979 Aug;14(4):438-40.
21. Gaillard D, Bouvier R, Scheiner C, Nessmann C, Delezoide AL, Dechelotte P, et al. Meconium ileus and intestinal atresia in fetuses and neonates. *Pediatr Pathol Lab Med*. 1996 Jan-Feb;16(1):25-40.
22. Johnson SM, Meyers RL. Inherited thrombophilia: a possible cause of in utero vascular thrombosis in children with intestinal atresia. *J Pediatr Surg*. 2001 Aug;36(8):1146-9.
23. Bilodeau A, Prasil P, Cloutier R, Laframboise R, Meguerditchian AN, Roy G, et al. Hereditary multiple intestinal atresia: thirty years later. *Journal of pediatric surgery*. 2004 May;39(5):726-30.
24. Shorter NA, Georges A, Perenyi A, Garrow E. A proposed classification system for familial intestinal atresia and its relevance to the understanding of the etiology of jejunoileal atresia. *J Pediatr Surg*. 2006 Nov;41(11):1822-5.
25. Thompson DJ, Molello JA, Strebing RJ, Dyke IL. Teratogenicity of adriamycin and daunomycin in the rat and rabbit. *Teratology*. 1978 Apr;17(2):151-7.

26. Fairbanks TJ, Kanard RC, Del Moral PM, Sala FG, De Langhe SP, Lopez CA, et al. Colonic atresia without mesenteric vascular occlusion. The role of the fibroblast growth factor 10 signaling pathway. *J Pediatr Surg.* 2005 Feb;40(2):390-6.
27. Fairbanks TJ, Sala FG, Kanard R, Curtis JL, Del Moral PM, De Langhe S, et al. The fibroblast growth factor pathway serves a regulatory role in proliferation and apoptosis in the pathogenesis of intestinal atresia. *J Pediatr Surg.* 2006 Jan;41(1):132-6; discussion -6.
28. Basu R, Burge DM. The effect of antenatal diagnosis on the management of small bowel atresia. *Pediatric surgery international.* 2004 Mar;20(3):177-9.
29. Wax JR, Hamilton T, Cartin A, Dudley J, Pinette MG, Blackstone J. Congenital jejunal and ileal atresia: natural prenatal sonographic history and association with neonatal outcome. *J Ultrasound Med.* 2006 Mar;25(3):337-42.
30. Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Evaluation of prenatal diagnosis of congenital gastro-intestinal atresias. *European journal of epidemiology.* 1996 Dec;12(6):611-6.
31. Iacobelli BD, Zaccara A, Spiridakis I, Giorlandino C, Capolupo I, Nahom A, et al. Prenatal counselling of small bowel atresia: watch the fluid! *Prenatal diagnosis.* 2006 Mar;26(3):214-7.
32. Veyrac C, Couture A, Saguintaah M, Baud C. MRI of fetal GI tract abnormalities. *Abdominal imaging.* 2004 Jul-Aug;29(4):411-20.
33. Grosfeld JL, Ballantine TV, Shoemaker R. Operative management of intestinal atresia and stenosis based on pathologic findings. *J Pediatr Surg.* 1979 Jun;14(3):368-75.
34. Hou D, Zhang J. 40 years' review of intestinal atresia. *Chin Med J (Engl).* 1999 Jul;112(7):583-5.
35. Prasad TR, Bajpai M. Intestinal atresia. *Indian J Pediatr.* 2000 Sep;67(9):671-8.
36. Goulet O, Sauvat F. Short bowel syndrome and intestinal transplantation in children. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care.* 2006 May;9(3):304-13.
37. Dalla Vecchia LK, Grosfeld JL, West KW, Rescorla FJ, Scherer LR, Engum SA. Intestinal atresia and stenosis: a 25-year experience with 277 cases. *Arch Surg.* 1998 May;133(5):490-6; discussion 6-7.

38. Lloyd DA, Gabe SM. Managing liver dysfunction in parenteral nutrition. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2007 Nov;66(4):530-8.
39. De Lorimier AA, Norman DA, Goodling CA, Preger L. A model for the cinefluoroscopic and manometric study of chronic intestinal obstruction. *Journal of pediatric surgery*. 1973 Oct;8(5):785-91.
40. Touloukian RJ, Wright HK. Intrauterine villus hypertrophy with jejunoileal atresia. *J Pediatr Surg*. 1973 Oct;8(5):779-84.
41. Touloukian RJ. Antenatal intestinal adaptation with experimental jejunoileal atresia. *J Pediatr Surg*. 1978 Oct;13(6):468-74.
42. Hamdy MH, Man DW, Bain D, Kirkland IS. Histochemical changes in intestinal atresia and its implications on surgical management: a preliminary report. *J Pediatr Surg*. 1986 Jan;21(1):17-21.
43. 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. *Journal of pediatric surgery*. 1979 Jun;14(3):376-80.
44. Serrano J, Zetterstrom R. Disaccharidase activities and intestinal absorption in infants with congenital intestinal obstruction. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1987 Mar-Apr;6(2):238-43.
45. Ozguner IF, Savas C, Ozguner M, Candir O. Intestinal atresia with segmental musculature and neural defect. *Journal of pediatric surgery*. 2005 Aug;40(8):1232-7.
46. Khen N, Jaubert F, Sauvat F, Fourcade L, Jan D, Martinovic J, et al. Fetal intestinal obstruction induces alteration of enteric nervous system development in human intestinal atresia. *Pediatr Res*. 2004 Dec;56(6):975-80.
47. Pickard LR, Santoro S, Wyllie RG, Haller JA, Jr. Histochemical studies of experimental fetal intestinal obstruction. *J Pediatr Surg*. 1981 Jun;16(3):256-60.
48. Trahair JF, Rodgers HF, Cool JC, Ford WD. Altered intestinal development after jejunal ligation in fetal sheep. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993;423(1):45-50.
49. Doolin EJ, Ormsbee HS, Hill JL. Motility abnormality in intestinal atresia. *J Pediatr Surg*. 1987 Apr;22(4):320-4.
50. Trahair JF, Harding R. Ultrastructural anomalies in the fetal small intestine indicate that fetal swallowing is important for normal development: an experimental study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;420(4):305-12.

51. Tovar JA, Sunol M, Lopez de Torre B, Camarero C, Torrado J. Mucosal morphology in experimental intestinal atresia: studies in the chick embryo. *J Pediatr Surg.* 1991 Feb;26(2):184-9.
52. Masumoto K, Suita S, Nada O, Taguchi T, Guo R, Yamanouchi T. Alterations of the intramural nervous distributions in a chick intestinal atresia model. *Pediatr Res.* 1999 Jan;45(1):30-7.
53. 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 Sep;28(9):1196-9.
54. Buchmiller TL, Gregg J, Rivera FA, Jr., Diamond JM, Fonkalsrud EW. Effect of esophageal ligation on the development of fetal rabbit intestinal lactase. *Journal of pediatric surgery.* 1993 Nov;28(11):1473-7.
55. Mulvihill SJ, Stone MM, Debas HT, Fonkalsrud EW. The role of amniotic fluid in fetal nutrition. *J Pediatr Surg.* 1985 Dec;20(6):668-72.
56. Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology.* 1999 Mar;116(3):702-31.
57. Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 2004 Apr;16 Suppl 1:55-9.
58. Hoyle CH, Burnstock G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *Journal of anatomy.* 1989 Oct;166:7-22.
59. Mathan M, Moxey PC, Trier JS. Morphogenesis of fetal rat duodenal villi. *Am J Anat.* 1976 May;146(1):73-92.
60. Simon-Assmann P, Keding M. Heterotypic cellular cooperation in gut morphogenesis and differentiation. *Semin Cell Biol.* 1993 Jun;4(3):221-30.
61. Mathan M, Hermos JA, Trier JS. Structural features of the epithelio-mesenchymal interface of rat duodenal mucosa during development. *J Cell Biol.* 1972 Mar;52(3):577-88.
62. Beaulieu JF, Vachon PH. Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology.* 1994 Apr;106(4):829-39.
63. Dogan A, MacDonald TT, Spencer J. Ontogeny and induction of adhesion molecule expression in human fetal intestine. *Clin Exp Immunol.* 1993 Mar;91(3):532-7.

64. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis; 1996 Feb 9.
65. Kedinger M, Simon-Assmann P, Bouziges F, Haffen K. Epithelial-mesenchymal interactions in intestinal epithelial differentiation. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1988;151:62-9.
66. Louvard D, Kedinger M, Hauri HP. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:157-95.
67. Alberts J. Cell junctions, cell adhesion and the extracellular matrix. In: Alberts J, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J, editors. *The molecular biology of the cell.* 3 ed. New-york, London: Garland publishing; 1994. p. 949-71.
68. Berndorff D, Gessner R, Kreft B, Schnoy N, Lajous-Petter AM, Loch N, et al. Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca(2+)-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. *J Cell Biol.* 1994 Jun;125(6):1353-69.
69. Geiger B, Ayalon O. Cadherins. *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:307-32.
70. Dowling J, Yu QC, Fuchs E. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J Cell Biol.* 1996 Jul;134(2):559-72.
71. Simon-Assmann P, Duclos B, Orian-Rousseau V, Arnold C, Mathelin C, Engvall E, et al. Differential expression of laminin isoforms and alpha 6-beta 4 integrin subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev Dyn.* 1994 Sep;201(1):71-85.
72. De Arcangelis A, Neuville P, Boukamel R, Lefebvre O, Kedinger M, Simon-Assmann P. Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J Cell Biol.* 1996 Apr;133(2):417-30.
73. Ezzell RM, Chafel MM, Matsudaira PT. Differential localization of villin and fimbrin during development of the mouse visceral endoderm and intestinal epithelium. *Development.* 1989 Jun;106(2):407-19.
74. Quaroni A. Pre- and postnatal development of differentiated functions in rat intestinal epithelial cells. *Dev Biol.* 1985 Oct;111(2):280-92.
75. Rings EH, de Boer PA, Moorman AF, van Beers EH, Dekker J, Montgomery RK, et al. Lactase gene expression during early development of rat small intestine. *Gastroenterology.* 1992 Oct;103(4):1154-61.

76. Heuckeroth RO, Pachnis V. Getting to the guts of enteric nervous system development. *Development*. 2006 Jun;133(12):2287-90.
77. Burns AJ, Thapar N. Advances in ontogeny of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*. 2006 Oct;18(10):876-87.
78. Le Douarin NM, Teillet A, Couly G. Chimères embryonnaires et développement du système nerveux. *Med Science*. 1990;6:157-95.
79. Young HM, Bergner AJ, Anderson RB, Enomoto H, Milbrandt J, Newgreen DF, et al. Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev Biol*. 2004 Jun 15;270(2):455-73.
80. Druckenbrod NR, Epstein ML. Behavior of enteric neural crest-derived cells varies with respect to the migratory wavefront. *Dev Dyn*. 2007 Jan;236(1):84-92.
81. Krull CE, Collazo A, Fraser SE, Bronner-Fraser M. Segmental migration of trunk neural crest: time-lapse analysis reveals a role for PNA-binding molecules. *Development*. 1995 Nov;121(11):3733-43.
82. Druckenbrod NR, Epstein ML. The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev Biol*. 2005 Nov 1;287(1):125-33.
83. Kapur RP, Gershon MD, Milla PJ, Pachnis V. The influence of Hox genes and three intercellular signalling pathways on enteric neuromuscular development. *Neurogastroenterol Motil*. 2004 Apr;16 Suppl 1:8-13.
84. Grundy D, Schemann M. Enteric nervous system. *Current opinion in gastroenterology*. 2005 Mar;21(2):176-82.
85. Jiang Y, Liu MT, Gershon MD. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol*. 2003 Jun 15;258(2):364-84.
86. Chalazonitis A, D'Autreaux F, Guha U, Pham TD, Faure C, Chen JJ, et al. Bone morphogenetic protein-2 and -4 limit the number of enteric neurons but promote development of a TrkC-expressing neurotrophin-3-dependent subset. *J Neurosci*. 2004 Apr 28;24(17):4266-82.
87. Gaillard D. [Normal and pathologic development of autonomous nerve plexus in the intestine]. *Arch Fr Pediatr*. 1981 Jan;38(1):61-7.
88. Goyal RK, Hirano I. The enteric nervous system. *N Engl J Med*. 1996 Apr 25;334(17):1106-15.

89. Grand RJ, Watkins JB, Torti FM. Development of the human gastrointestinal tract. A review. *Gastroenterology*. 1976 May;70(5 PT.1):790-810.
90. Vannucchi MG, Faussone-Pellegrini MS. Differentiation of cholinergic cells in the rat gut during pre- and postnatal life. *Neuroscience letters*. 1996 Mar 15;206(2-3):105-8.
91. Cheng W, Bishop AE, Spitz L, Polak JM. Abnormalities of neuropeptides and neural markers in the esophagus of fetal rats with adriamycin-induced esophageal atresia. *J Pediatr Surg*. 1997 Oct;32(10):1420-3.
92. Berthoud HR, Blackshaw LA, Brookes SJ, Grundy D. Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil*. 2004 Apr;16 Suppl 1:28-33.
93. Bornstein JC, Costa M, Grider JR. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil*. 2004 Apr;16 Suppl 1:34-8.
94. Gabella G. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract (Chapter 18). In: Johnson L, editor. *Physiology of the gastrointestinal tract*. Third ed. New York: Raven Press; 1994.
95. Wells TR, Landing BH, Ariel I, Nadorra R, Garcia C. Normal anatomy of the myenteric plexus of infants and children. Demonstration by flat-mount (circuit diagram) preparations. *Perspectives in pediatric pathology*. 1987;11:152-74.
96. Clerc N, Furness JB. Intrinsic primary afferent neurones of the digestive tract. *Neurogastroenterol Motil*. 2004 Apr;16 Suppl 1:24-7.
97. Raybould HE, Cooke HJ, Christofi FL. Sensory mechanisms: transmitters, modulators and reflexes. *Neurogastroenterol Motil*. 2004 Apr;16 Suppl 1:60-3.
98. Ekblad E, Bauer AJ. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil*. 2004 Apr;16 Suppl 1:123-8.
99. Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil*. 2004 Apr;16 Suppl 1:112-7.
100. Gershon MD, Rothman TP. Enteric glia. *Glia*. 1991;4(2):195-204.
101. Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, et al. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jan;292(1):G231-41.

102. Lecoin L, Gabella G, Le Douarin N. Origin of the c-kit-positive interstitial cells in the avian bowel. *Development*. 1996 Mar;122(3):725-33.
103. Wester T, Eriksson L, Olsson Y, Olsen L. Interstitial cells of Cajal in the human fetal small bowel as shown by c-kit immunohistochemistry. *Gut*. 1999 Jan;44(1):65-71.
104. Der-Silaphet T, Malysz J, Hagel S, Larry Arsenault A, Huizinga JD. Interstitial cells of cajal direct normal propulsive contractile activity in the mouse small intestine. *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):724-36.
105. Smith VV, Milla PJ. Histological phenotypes of enteric smooth muscle disease causing functional intestinal obstruction in childhood. *Histopathology*. 1997 Aug;31(2):112-22.
106. Keding M, Simon-Assmann P, Bouziges F, Arnold C, Alexandre E, Haffen K. Smooth muscle actin expression during rat gut development and induction in fetal skin fibroblastic cells associated with intestinal embryonic epithelium. *Differentiation*. 1990 Apr;43(2):87-97.
107. Tam PK, Owen G. An immunohistochemical study of neuronal microtubule-associated proteins in Hirschsprung's disease. *Human pathology*. 1993 Apr;24(4):424-31.
108. Sang Q, Young HM. The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse. *The Anatomical record*. 1998 Jun;251(2):185-99.
109. Hitchcock RJ, Pemble MJ, Bishop AE, Spitz L, Polak JM. Quantitative study of the development and maturation of human oesophageal innervation. *Journal of anatomy*. 1992 Feb;180 (Pt 1):175-83.
110. Tharakan T, Kirchgessner AL, Baxi LV, Gershon MD. Appearance of neuropeptides and NADPH-diaphorase during development of the enteropancreatic innervation. *Brain research*. 1995 Jan 14;84(1):26-38.
111. Sharkey KA, Coggins PJ, Tetzlaff W, Zwiers H, Bisby MA, Davision JS. Distribution of growth-associated protein, B-50 (GAP-43) in the mammalian enteric nervous system. *Neuroscience*. 1990;38(1):13-20.
112. Eaker EY, Sallustio JE. The distribution of novel intermediate filament proteins defines subpopulations of myenteric neurons in rat intestine. *Gastroenterology*. 1994 Sep;107(3):666-74.

113. Nothias F, Boyne L, Murray M, Tessler A, Fischer I. The expression and distribution of tau proteins and messenger RNA in rat dorsal root ganglion neurons during development and regeneration. *Neuroscience*. 1995 Jun;66(3):707-19.
114. Kobayashi H, Miyano T, Yamataka A, Lane GJ, Fujimoto T, Puri P. Use of synaptophysin polyclonal antibody for the rapid intraoperative immunohistochemical evaluation of functional bowel disorders. *J Pediatr Surg*. 1997 Jan;32(1):38-40.
115. Lu B, Greengard P, Poo MM. Exogenous synapsin I promotes functional maturation of developing neuromuscular synapses. *Neuron*. 1992 Mar;8(3):521-9.
116. De Camilli P, Cameron R, Greengard P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J Cell Biol*. 1983 May;96(5):1337-54.
117. Akagi S, Mizoguchi A, Sobue K, Nakamura H, Ide C. Localization of synapsin I in normal fibers and regenerating axonal sprouts of the rat sciatic nerve. *Histochemistry and cell biology*. 1996 May;105(5):365-73.
118. Epstein ML, Poulsen KT, Thiboldeaux R. Formation of ganglia in the gut of the chick embryo. *The Journal of comparative neurology*. 1991 May 8;307(2):189-99.
119. Puliti A, Poirier V, Goossens M, Simonneau M. Neuronal defects in genotyped dominant megacolon (Dom) mouse embryos, a model for Hirschsprung disease. *Neuroreport*. 1996 Jan 31;7(2):489-92.
120. Tanaka K, Ohshiro K, Puri P. Morphological changes in the enteric nervous system of the transplanted fetal rat intestine. *J Pediatr Surg*. 1997 Jun;32(6):897-901.
121. Munakata K, Tomita R, Kurosu Y. Preliminary immunohistochemical new findings in the myenteric plexus of patients with intestinal neuronal dysplasia type B. *Eur J Pediatr Surg*. 1997 Feb;7(1):21-9.
122. Hitchcock RJ, Pemble MJ, Bishop AE, Spitz L, Polak JM. The ontogeny and distribution of neuropeptides in the human fetal and infant esophagus. *Gastroenterology*. 1992 Mar;102(3):840-8.
123. Martinou JC. Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature*. 1999 Jun 3;399(6735):411-2.
124. Wester T, O'Briain S, Puri P. NADPH diaphorase-containing nerve fibers and neurons in the myenteric plexus are resistant to postmortem changes: studies in Hirschsprung's disease and normal autopsy material. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1998 May;122(5):461-6.

125. Nemeth L, Fourcade L, Puri P. Marked morphological differences in the myenteric plexus between the mesenteric and antimesenteric sides of small bowel in premature infants. *J Pediatr Surg.* 2000 May;35(5):748-52.
126. Nemeth L, O'Briain S, Puri P. Whole-mount NADPH-diaphorase histochemistry is a reliable technique for the intraoperative evaluation of extent of aganglionosis. *Pediatric surgery international.* 1999;15(3-4):195-7.
127. Adelson DW, Wei JY, Kruger L. H₂O₂ sensitivity of afferent splanchnic C fiber units in vitro. *Journal of neurophysiology.* 1996 Jul;76(1):371-80.
128. Booth CE, Shaw J, Hicks GA, Kirkup AJ, Winchester W, Grundy D. Influence of the pattern of jejunal distension on mesenteric afferent sensitivity in the anaesthetized rat. *Neurogastroenterol Motil.* 2008 Feb;20(2):149-58.
129. Lopez de Torre B, Tovar JA, Uriarte S, Aldazabal P. The nutrition of the fetus with intestinal atresia: studies in the chick embryo model. *Journal of pediatric surgery.* 1992 Oct;27(10):1325-8.
130. Fourcade L, Shima H, Miyazaki E, Puri P. Multiple gastrointestinal atresias result from disturbed morphogenesis. *Pediatric surgery international.* 2001 Jul;17(5-6):361-4.
131. 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 Oct;34(10):1463-8.
132. Aube AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, et al. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut.* 2006 May;55(5):630-7.
133. Ruhl A, Nasser Y, Sharkey KA. Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil.* 2004 Apr;16 Suppl 1:44-9.
134. Tyson JE, Kennedy KA, Lucke JF, Pedroza C. Dilemmas initiating enteral feedings in high risk infants: how can they be resolved? *Semin Perinatol.* 2007 Apr;31(2):61-73.
135. Tyson JE, Kennedy KA. Minimal enteral nutrition for promoting feeding tolerance and preventing morbidity in parenterally fed infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000(2):CD000504.
136. Owens L, Burrin DG, Berseth CL. Minimal enteral feeding induces maturation of intestinal motor function but not mucosal growth in neonatal dogs. *The Journal of nutrition.* 2002 Sep;132(9):2717-22.

