



HAL
open science

Axe cerveau-intestin et contrôle de la prise alimentaire : exemple d'altérations chez un modèle animal de schizophrénie

Florian Voinot

► **To cite this version:**

Florian Voinot. Axe cerveau-intestin et contrôle de la prise alimentaire : exemple d'altérations chez un modèle animal de schizophrénie. Endocrinologie et métabolisme. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ058 . tel-00790379

HAL Id: tel-00790379

<https://theses.hal.science/tel-00790379>

Submitted on 20 Feb 2013

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

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



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
UMR 7178, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC)

THÈSE présentée par :
Florian VOINOT

soutenue le : **09 octobre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Sciences du Vivant / Physiologie et Biologie des
Organismes, Populations, Interactions

**Axe cerveau-intestin et contrôle de la prise
alimentaire : exemple d'altérations chez un
modèle animal de schizophrénie**

THÈSE dirigée par :

Mme ANGEL Fabielle

Chargée de Recherche, INSERM, Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. BONAZ Bruno

Professeur, Université de Grenoble

M. SOULIMANI Rachid

Professeur, Université de Lorraine

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme SIMON-ASSMANN Patricia

Directrice de Recherche, CNRS, Strasbourg

M. MALBERT Charles-Henri

Directeur de Recherche, INRA, Rennes

M. SANDNER Guy

Professeur, Université de Strasbourg

Je dédie ce travail ...

A ma famille

A Camille

« Je sais pourquoi tant de gens aiment couper du bois. C'est une activité où l'on voit tout de suite le résultat »

Albert Einstein

“The behavior of scientists and lemmings can sometimes have more in common than the scientists would like to admit. The actions of isolated lemmings are rarely exceptional; however, when they form a herd, lemmings have been known to stampede and follow the mass of their colleagues off a cliff. The actions of isolated scientists are also unexceptional and dictated by the scientific method, but like lemmings, scientists can abandon rational thought and follow their colleagues into the mass acceptance of a mistake. The history of the enteric nervous system (ENS) is a good example of the lemming approach to scientific thought.”

Michael Gershon

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance à **Mme Fabielle Angel**, initiatrice de ce projet et sous la direction de laquelle cette thèse a été effectuée. Merci pour ton accueil lors de mon arrivée « *impromptue* ».

Je tiens à remercier **Mme Simon-Assmann, M. Bonaz, M. Soulimani, et M. Malbert** de m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce jury. Merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à **M. Guy Sandner** pour avoir partagé son expérience et ses précieux conseils sans compter. Merci, Guy pour ton optimisme et ton soutien qui m'ont permis de garder confiance en moi tout au long de ce travail.

Je remercie la direction et l'ensemble des **habitants du DEPE**, sans qui cette thèse n'aurait pas été conduite de la même manière. Merci aux différents **colocataires** avec qui j'ai eu la chance de partager un bureau au cours de ces trois ans.

J'adresse mes sincères remerciements à **Caroline, Aude et Sylvain** pour avoir partagé les bons comme les mauvais moments à Nancy. Merci de m'avoir montré le chemin de Strasbourg.

Je tiens à remercier chaleureusement celles qui ont été indispensables au bon déroulement de ce projet, **Caroline, Camille et Magali**. Je sais ce que je vous dois.

J'adresse mon amitié aux **stagiaires** qui m'ont aidé au cours de ce travail. Merci à Gustave, Florence, Charlotte, Samira et Tugba. Bon courage à tous.

Parce qu'une thèse ne s'arrête pas aux portes de sa maison, je remercie chaleureusement les personnes de l'ombre qui m'ont épaulé ces dernières années. Merci à **ma famille** et à **mes amis**. Un incommensurable merci à **Camille** qui a vécu ce travail des deux côtés du mur et avec qui j'ai la chance de partager ma vie.

Je souhaite également remercier **ceux qui m'ont mis des bâtons dans les roues** ou **ceux qui n'ont pas cru en ce travail**. Merci aux hypocrites, menteurs et incompetents qui m'ont fait me surpasser pour mener à bien ce projet.

Sommaire

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	13
INDEX DES FIGURES ET TABLES	17
LISTE DES ABREVIATIONS	21
CONTEXTE DE L'ETUDE	23
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	27
I. Axe cerveau-intestin	28
A. Le tube digestif	28
1. Rappels anatomiques	28
2. Activité contractile	29
B. Bases anatomiques de l'axe cerveau-intestin	32
1. Innervation intrinsèque	33
a. Organisation du SNE	33
b. Structure du SNE	33
c. Neurones fonctionnels du SNE	35
2. Innervation extrinsèque	36
a. Innervation afférente	37
b. Innervation efférente	37
C. Concept de l'axe cerveau-intestin	38
D. Signalisation dans l'axe cerveau-intestin	39
1. Signaux sensitifs du TD au SNC	39
2. Activation du SNC	42
3. Transduction du signal du SNC au TD	43
II. Axe cerveau-intestin et contrôle de la prise alimentaire	45
A. Régulation de la balance énergétique	45
1. Concept de balance énergétique	45
2. Circuits du SNC	46
B. Signaux gastro-intestinaux d'appétit et de satiété	47
1. Appétit	47
a. La ghréline	47
b. La motiline et les orexines	48
2. Satiété	49
a. La cholécystokinine	49
b. La famille des <i>polypeptide proteins-fold</i>	50
c. Les dérivés du préproglucagon	50
C. Signaux d'adiposité	52
1. Le pancréas	52
2. Le tissu adipeux	52
D. Interaction entre les signaux à court et à long terme	54

III. Axe cerveau-intestin et schizophrénie	56
A. La schizophrénie	56
1. Prévalence et symptômes	56
2. Facteurs de risques	57
3. Théorie neurodéveloppementale	57
B. Schizophrénie et troubles périphériques	59
1. Troubles cardiaques, alimentaires et métaboliques	59
2. Troubles des fonctions intestinales	61
C. Modèle heuristique de schizophrénie	61
1. Modèles animaux de schizophrénie	61
2. Le modèle de lésion néonatale de l'hippocampe ventral	62
OBJECTIFS DE L'ETUDE	65
TRAVAUX EXPERIMENTAUX	69
EFFETS MODULATEURS DE LA LEPTINE SUR LA NEUROTRANSMISSION DANS LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE CHEZ LE RAT.....	71
I. Introduction	72
II. Technique de l'organe isolé	73
III. Article de recherche A : leptin modulates enteric neurotransmission in the rat proximal colon: an <i>in vitro</i> study	75
Abstract	76
A. Introduction	77
B. Materials and methods	78
1. Animals and technique	78
2. Experimental design	79
3. Drugs	79
4. Data analysis	80
C. Results	81
1. Influence of leptin on tone and TNS-induced response	81
2. Pharmacological characterization of leptin effects on tone and TNS-induced R ...	81
a. Effect of leptin on nitrergic neurons	82
b. Effect of leptin on cholinergic innervation	82
c. Effect of leptin in the presence of capsazepine	85
D. Discussion	85
1. Effects of leptin on GI tract motility	85
2. Effects of leptin on inhibitory motor neurons	86
3. Effects of leptin on interneurons or intrinsic primary afferent neurons (IPANs) ...	87
4. Conclusion.....	88
Acknowledgements	88
References	88
Résumé des résultats	91
IV. Résultats complémentaires	91

A.	Influence de la leptine sur le tonus basal et la réponse induite par la NS	92
B.	Effets de la leptine sur les neurones nitrergiques	92
C.	Effets de la leptine sur l'innervation cholinergique	93
D.	Effets de la leptine en présence de capsazepine	95
V.	Discussion : modulation de la neurotransmission dans le SNE du rat par la leptine ...	95
A.	Modes d'action de la leptine	96
1.	La leptine inhibe la relaxation	96
2.	La leptine inhibe la contraction	97
B.	Réponse à la leptine dans le TD : relation structure/fonction	97
1.	Les récepteurs à la leptine dans le TD.....	98
2.	Origine de la leptine impliquée dans les fonctions digestives	99
VI.	Conclusion et perspectives.....	101
CONSEQUENCES PERIPHERIQUES D'UNE LESION NEONATALE DE L'HIPPOCAMPE VENTRAL CHEZ LE RAT		103
I.	Introduction	104
II.	Modèle NVHL.....	105
A.	Stratégie expérimentale	105
B.	Procédure.....	105
III.	Article de recherche B : Metabolic and intestinal consequences of the neonatal ventral hippocampal lesion (NVHL) in rats	107
Abstract		108
A.	Introduction	109
B.	Methods.....	110
1.	Ethical considerations, surgeries and selection of the subjects	110
2.	Tissue and blood plasma sampling.....	112
3.	Plasma and tissue assays	112
4.	<i>Ex vivo</i> organ bath studies	113
5.	Histology	114
6.	Data and statistical analyses	114
C.	Results	115
1.	Macroscopic aspects of the brain lesions and of the digestive tract of NVHL rats	115
2.	Body, organ weights and muscle layer widths	115
3.	Plasmatic assays	117
4.	Inflammatory substances in the jejunum and colon	118
5.	Organ bath studies	118
D.	Discussion	119
1.	Hormonal and metabolic alterations in NVHL rats	120
2.	Functional and morphological modifications of the intestine of NVHL rats.....	122
3.	Conclusions and prospects.	123
Acknowledgements		124
References		124

Résumé des résultats	129
IV. Article de recherche C : Alteration in enteric GABAergic neurotransmission in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia	130
Abstract	131
A. Introduction	132
B. Materials and methods	133
1. Ethical considerations, surgery, selection of the subjects and tissues sampling	133
2. Organ bath studies	134
3. Real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) studies	136
4. Data Analyses.....	137
C. Results	137
1. Organ bath studies	137
a. Effects of the lesion on tone and mechanical responses of jejunum and proximal colon to TNS	137
b. Effects of the lesion on enteric GABAergic innervation	138
2. qPCR studies	142
D. Discussion	143
Acknowledgments	145
References	146
Résumé des résultats	149
V. Discussion : altérations périphériques chez les rats NVHL	149
A. Hippocampe et régulation de la prise alimentaire	149
1. Lésion de l'hippocampe et profil hormonal chez le rat.....	150
2. Lésion de l'hippocampe, prise alimentaire et masse corporelle chez le rat	153
3. Schizophrénie et altérations du comportement alimentaire	155
B. Hippocampe et troubles digestifs	157
1. Lésion de l'hippocampe, inflammation et motricité digestive	157
2. Schizophrénie et pathologies digestives.....	162
VI. Conclusion et perspectives.....	162
REFERENCES	165
ANNEXES.....	197
Article de recherche D : Effects of controlled ingestion of kaolinite (5%) on food intake, gut morphology and <i>in vitro</i> motility in rats	199
Article de recherche E : Controlled ingestion of kaolinite (5%) modulates enteric nitrergic innervation in rats	223

Publications et communications

Articles inclus dans cette thèse

Article A

Voïnot F., Fischer C., Crenner F., Schmidt C. & Angel F. Leptin modulates enteric neurotransmission in the rat proximal colon: an *in vitro* study. En révision dans *Regulatory Peptides*.

Article B

Voïnot F., Angst M-J., Arrivé M., Guiberteau T., Guignard B., Habold C., Sandner G. & Angel F. Metabolic and intestinal consequences of the neonatal ventral hippocampal lesion (NVHL) in rats. En préparation pour une soumission à *Psychoneuroendocrinology*.

Article C

Voïnot F., Angst M-J., Arrivé M., Guiberteau T., Guignard B., Sandner G. & Angel F. Alteration in enteric GABAergic neurotransmission in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia. En préparation pour une soumission à *Neurogastroenterology & Motility*.

Articles présentés en annexe

Article D

Voïnot F., Fischer C., Bœuf A., Schmidt C., Delval-Dubois V., Reichardt F., Liewig N., Chaumande B., Ehret-Sabatier L., Lignot J.H., Angel F. 2011. Effects of controlled ingestion of kaolinite (5%) on food intake, gut morphology and *in vitro* motility in rats. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2011.00978.x

Article E

Voïnot F., Fischer C., Schmidt C., Ehret-Sabatier L. & Angel F. Controlled ingestion of kaolinite (5%) modulates enteric nitrergic innervation in rats. En révision dans *Fundamental and Clinical Pharmacology*.

Autres articles

Trabalon M., Carapito C., **Voinot F.**, Martrette JM., Van Dorsellaer A., Gilbert C., Bertile F. 2010. Differences in *Brachypelma albopilosa* (theraphosidae) hemolymph proteome between subadult and adult females. *Journal of Experimental Zoology*. 313A: 651-659.

Résumés de congrès publiés

Angel F., Fischer C., **Voinot F.**, Boeuf A., Sabatier L., Lignot J.H., Liewig N. 2010. Effects of kaolinite ingestion on lipid absorption and weight regulation. *Neurogastroenterology and Motility*. 22(S1): 23.

Voinot F., Angst M.J., Guiberteau T., Zahn S., Sandner G., Angel F. 2011. Neurovegetative consequences and intestinal inflammation in a Lipska-Weinberger neonatal model of schizophrenia. *Inflammation Research*. 60(S1): 45.

Voinot F., Angst M.J., Guiberteau T., Zahn S., Sandner G., Angel F. 2011. Neurovegetative consequences and intestinal inflammation in a Lipska-Weinberger neonatal model of schizophrenia. *Neurogastroenterology and Motility*. 23(S1): 18.

Angel. F., **Voinot F.**, Fischer C., Schmidt C., Malbert C.-H. 2012. Effects of kaolinite ingestion on regulation by leptin of intrinsic nitrergic neurons activity in jejunum and proximal colon in rats. *Neurogastroenterology and Motility*. 24(S2): 133.

Communications orales

Congrès internationaux

Voinot F., Angst M.J., Guiberteau T., Zahn S., Sandner G., Angel F. Neurovegetative consequences and intestinal inflammation in a Lipska-Weinberger neonatal model of schizophrenia. *10th World Congress on Inflammation*, Juin 2011, Paris, France.

Congrès nationaux

Ambroise E., Brendlé J., Patarin J., Soulard M., Faust A.C., Sabatier L., Chaumande B., Delval V., Bœuf A., Lignot J.H., Le Maho Y., Angel F., **Voinot F.**, Schmidt C., Fischer C., Liewig N., Malbert C.H., Louvrier P. Rôle des solides poreux en physiologie digestive. 9^{ème} Colloque Annuel du GFA (*Groupe Français des Argiles*), Mai 2011, Paris, France.

Communications affichées

Congrès internationaux

Lignot J.H., Reichardt F., Angel F., Fischer C., **Voinot F.**, Boeuf A., Sabatier L., Liewig N. Effects of Geophagia on intestinal morphology and lipid absorption. *SEB (Society for Experimental Biology) Main Meeting*, Juin 2010, Prague, République Tchèque.

Voinot F., Fischer C., Boeuf A., Sabatier L., Lignot J.H., Liewig N., Angel F. Effects of kaolinite ingestion on lipid absorption, hormonal regulation and intestinal motility. *Joint International Neurogastroenterology and Motility Meeting*, Août 2010, Boston, USA.

Angel F., Angst M.J., Brasse D., de Macedo C.E., Guiberteau T., Guignard B., Host L., Mensah Nyagan G., Nehlig A., Meyer L., Romieux P., Sandner G., **Voinot F.**, Zahn S., Zwiller J. The Lipska-Weinberger neonatal lesion model, beyond schizophrenia. *40th Annual Meeting Neuroscience*, Novembre 2010, San Diego, USA.

Voinot F., Angst M.J., Guiberteau T., Zahn S., Sandner G., Angel F. 2011. Neurovegetative consequences and intestinal inflammation in a Lipska-Weinberger neonatal model of schizophrenia. *16th Neurogastroenterology & Motility Meeting and 6th Postgraduate Course on Gastrointestinal Motility & Neurogastroenterology in Clinical Practice*, Septembre 2011, Saint-Louis, USA.

Voinot F., Fischer C., Schmidt C., Malbert C.-H., Ehret-Sabatier L. & Angel F. Effects of kaolinite ingestion on regulation by leptin on intrinsic nitrergic neurons activity in jejunum and proximal colon in rats. *Joint International Neurogastroenterology and Motility Meeting*, Septembre 2012, Bologne, Italie.

Congrès nationaux

Voinot F., Fischer C., Van der Giessen G., Zahn S., Guignard B., Guiberteau T., Angst M.J., Sandner G., Angel F. Alteration of intestinal and colonic physiology following neonatal ventral hippocampus lesion in rats. *13th Meeting I Joint Edition Young researchers in Life Sciences*, Juin 2010, Paris, France.

Boeuf A., Chaumande B., Delval V., Fischer C., **Voinot F.**, Angel F., Lignot J.H., Liewig N., Sabatier L. Analyse des effets de l'ingestion d'argile par une approche pluridisciplinaire. *27^{ème} Congrès de la SFEAP (Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique)*, Septembre 2010, Marseille, France.

Liewig N., Lignot J.H., Sabatier L., Angel F., Brendlé J., Fischer C., **Voinot F.**, Le Maho Y., Chaumande B., Delval V., Bœuf A., Patarin J., Soulard M., Faust A.C., Malbert C.H., Louvrier P. Rôle des nanosolides poreux (argiles naturelles ou de synthèse) en physiologie digestive et dans la restauration fonctionnelle de l'intestin. *Conférence internationale pluridisciplinaire - Matériaux*, Octobre 2010, Nantes, France.

Ambroise E., Brendlé J., Patarin J., Soulard M., Faust A.C., Sabatier L., Chaumande B., Delval V., Bœuf A., Lignot J.H., Le Maho Y., Angel F., **Voinot F.**, Schmidt C., Fischer C., Liewig N., Malbert C.H., Louvrier P. Rôle des solides poreux (argiles et zéolithes) en physiologie digestive et dans la restauration fonctionnelle de l'intestin. *4^{ème} Journées Scientifiques du PMNA (Pôle Matériaux et Nanosciences d'Alsace)*, Février 2011, Strasbourg, France.

Index des figures et tables

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Figure 1 : Représentation du tube digestif.

Figure 2 : Coupe de la paroi intestinale.

Figure 3 : Transmission de l'activité motrice intestinale.

Figure 4 : Variation du potentiel membranaire des cellules musculaires lisses et de l'activité contractile.

Figure 5 : Activité motrice, péristaltisme et segmentation, du tube digestif.

Figure 6 : Organisation du système nerveux entérique.

Figure 7 : Mise en place du système nerveux entérique à partir des cellules de la crête neurale et au cours du développement embryonnaire.

Figure 8 : Classification des neurones intrinsèques d'après leur fonction.

Figure 9 : Neurones afférents du tube digestif.

Figure 10 : Innervation efférente extrinsèque du tube digestif.

Figure 11 : Organisation de l'axe cerveau-intestin.

Figure 12 : Signalisation afférente extrinsèque du tube digestif.

Figure 13 : Contribution du noyau du tractus solitaire à la transmission des informations du tube digestif par les fibres afférentes vagues vers les structures du système nerveux central.

Figure 14 : Exemples de circuits dans le système nerveux entérique et innervation efférente sympathique et parasymphatique.

Figure 15 : Régulation de la balance énergétique.

Figure 16 : Contrôle de la prise alimentaire par l'action des hormones sur l'hypothalamus, le tronc cérébral et les afférences vagues.

Figure 17 : Sites centraux et périphériques de potentialisation de l'action de facteurs de satiété par la leptine.

Figure 18 : Régions centrales impliquées dans la schizophrénie.

Figure 19 : Illustration de la base de données des modèles animaux de schizophrénie disponible sur le *Schizophrenia Research Forum*.

Figure 20 : Chronologie des changements comportementaux après une lésion néonatale de l'hippocampe ventral chez le rat en comparaison de l'émergence des symptômes de la schizophrénie chez l'Homme.

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

CHAPITRE 1

Figure 21 : Dissection et mise en place des prélèvements de muscles lisses longitudinal de jéjunum et circulaire de côlon proximal.

Figure 22 : Exemple de tracé visualisé sur ordinateur.

Figure 23 : Tracé illustrant la réponse mécanique à la neurostimulation développée par le MLJ de rat dans une solution de Krebs.

ARTICLE A

Figure 1: Typical traces illustrating the mechanical response to transmural nerve stimulation developed by CMPC in normal Krebs solution in rats.

Figure 2: Dose-response curves of leptin on basal tone, TNS-induced relaxation and TNS-induced contraction.

Figure 3: Effects of leptin (0.1 μ M), L-NAME (0.1 mM) and leptin in the presence of L-NAME on basal tone and TNS-induced relaxation of CMPC in rats.

Figure 4: Effects of ACh (10 μ M) on basal tone of CMPC in rats in normal Krebs solution and in the presence of leptin.

Figure 5: Effects of leptin (0.1 μ M), cholinergic antagonists hexamethonium and atropine (10 μ M) and leptin in the presence of these antagonists on basal tone and TNS-induced relaxation of CMPC in rats.

Figure 6: Effects of leptin (0.1 μ M), capsazepine (10 μ M) and leptin in the presence capsazepine on basal tone and TNS-induced relaxation of CMPC in rats.

Figure 24 : Effets de la leptine (0,1 μ M), du L-NNA (0,1mM) et de la leptine en présence de L-NNA sur le tonus de base, la relaxation et la contraction induites par la neurostimulation du muscle longitudinal du jéjunum chez le rat.

Figure 25 : Effets de la leptine (0,1 μ M), des antagonistes cholinergiques pancuronium (10 μ M) ou atropine (1 μ M) et de la leptine en présence de ces antagonistes sur le tonus de base, la relaxation et la contraction induites par la neurostimulation du muscle longitudinal du jéjunum chez le rat.

Figure 26 : Effets de la leptine (0,1 μ M), de la capsazepine (10 μ M) et de la leptine en présence de capsazepine sur le tonus de base, la relaxation et la contraction induites par la neurostimulation du muscle longitudinal du jéjunum chez le rat.

CHAPITRE 2

Figure 27 : Modèle hypothétique d'action de la leptine gastrique sur la satiété post-prandiale.

Figure 28 : Procédure expérimentale de lésion néonatale bilatérale de l'hippocampe ventral chez le rat.

ARTICLE B

Figure 1: Anatomical observations in sham and NVHL rats.

Figure 2: Body and tissue weights in sham and NVHL rats.

Figure 3: Smooth muscle layers of jejunum and proximal colon in sham and NVHL rats.

Table 1: Plasmatic levels of several circulating substances in sham and NVHL rats.

Figure 4: Inflammatory markers in jejunum and proximal colon of sham and NVHL rats.

Table 2: *Ex vivo* organ bath studies of jejunum and proximal colon in sham and NVHL rats.

ARTICLE C

Figure 1: MRI reconstructions of a typical lesion used to select the rats for the experiments.

Figure 2: *Ex vivo* organ bath studies in Sham rats.

Table 1: Characteristics of basal tone and mechanical responses to electrical transmural nerve stimulation of longitudinal muscle from jejunum and circular muscle from proximal colon in Sham and NVHL rats.

Figure 3: Effects of GABA (0.1 mM) on tone and mechanical responses to transmural nerve stimulation of LMJ and CMPC in Sham (respectively n = 6 and n = 7) and in NVHL rats (respectively n = 7 and n = 9).

Figure 4: Effects of baclofen (50 μ M) on tone and mechanical responses to transmural nerve stimulation of LMJ and CMPC in Sham (respectively n = 7 and n = 7) and in NVHL rats (respectively n = 5 and n = 8).

Figure 5: Effects of bicuculline (30 μ M) on tone and mechanical responses to transmural nerve stimulation of LMJ and CMPC in Sham (respectively n = 5 and n = 6) and in NVHL rats (respectively n = 5 and n = 7).

Table 2: Changes in DNA quantities for GABAergic system components of NVHL rats compared to Sham rats obtained from the real-time quantitative PCR on the jejunum and proximal colon.

Table 1 : Comparaison entre différents paramètres impliqués dans la régulation de la balance énergétique chez des modèles de lésion de l'hippocampe chez le rat et dans des pathologies psychiatriques et métaboliques chez l'Homme.

Table 2 : Données bibliographiques sur les paramètres impliqués dans la régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire chez des patients atteints de schizophrénie et non traités avec des antipsychotiques.

Table 3 : Troubles gastro-intestinaux et altérations du système nerveux autonome dans les pathologies psychiatriques liées au stress, les désordres neuropsychiatriques et neurologiques impliquant une réduction du volume de l'hippocampe.

Liste des abréviations

ACh : acétylcholine

AgRP : *agouti-related peptide*

ARC : noyau arqué

CART : transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine

CCK : cholécystokinine

CPF : cortex préfrontal

GABA : acide γ -aminobutyrique

GLP : *glucagon-like peptide*

IPANs : neurones afférents primaires intrinsèques

MCCP : muscle circulaire du côlon proximal

MLJ : muscle longitudinal du jéjunum

NO : monoxyde d'azote

NPY : neuropeptide Y

NS : neurostimulation

NTS : noyau du tractus solitaire

NVHL : lésion néonatale de l'hippocampe ventral

PN : jour postnatal

POMC : pro-opiomélanocortine

qPCR : réaction de polymérase en chaîne quantitative

SNA : système nerveux autonome

SNE : système nerveux entérique

TD : tube digestif

CONTEXTE DE L'ETUDE

L'homéostasie est la capacité d'un organisme à maintenir un état de stabilité de son milieu intérieur et ce malgré les changements constants du milieu externe (environnement). Il s'agit d'un équilibre dynamique puisque les modifications de l'environnement aboutissent à des perturbations internes de l'organisme qui, en réponse, met en place des réactions physiologiques (la plupart du temps automatiques) afin de maintenir les conditions internes constantes. Le maintien de l'homéostasie nécessite donc des régulations permanentes des fonctions de l'organisme.

Parmi ces fonctions physiologiques, le rôle fondamental de l'alimentation est de fournir suffisamment d'énergie à l'organisme pour pouvoir répondre à ses besoins. Cette fonction est constituée de la prise alimentaire qui assure l'ingestion d'aliments (de l'environnement vers le tube digestif) et de la digestion qui permet la dégradation de ces aliments en nutriments et leur absorption (du tube digestif vers le milieu intérieur). Elle fait intervenir à la fois le système nerveux central mais également le système gastro-intestinal (tube digestif et glandes annexes). Par conséquent, le contrôle de la prise alimentaire et de la digestion nécessite une régulation complexe.

L'axe cerveau-intestin désigne l'interaction bidirectionnelle entre le cerveau et le tube digestif et plus particulièrement le système nerveux entérique. Il constitue un circuit de réflexes nerveux, composé de récepteurs, de fibres afférentes projetant vers les aires intégratives centrales et de fibres efférentes projetant vers les structures effectrices du tube digestif. L'axe cerveau-intestin, en coopération avec le système hormonal (hormones intrinsèques au tube digestif ou synthétisées par les glandes annexes, le tissu adipeux ou l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien) et le système immunitaire, permet au cerveau d'être informé en permanence de l'environnement digestif et régule en retour les processus digestifs, la prise alimentaire, les réactions immunitaires et les réponses au stress, à la douleur ou aux émotions.

Une altération du fonctionnement de l'axe cerveau-intestin est associée à certaines maladies psychiatriques (troubles bipolaires, autisme, dépression, schizophrénie). Dans la schizophrénie, cette altération se manifeste par des troubles alimentaires (anorexie mentale, obésité), métaboliques (dyslipidémie, diabète) et digestifs (inflammation du tube digestif). Néanmoins, bien que ces troubles soient à l'origine d'une mortalité précoce des patients, leur développement indépendamment de la prise d'antipsychotiques reste contesté.

Dans la première partie de l'introduction bibliographique de ce mémoire, nous aborderons donc le concept d'axe cerveau-intestin ainsi que sa structure en relation avec sa fonction. Nous traiterons ensuite de la modulation de cet axe par les hormones gastro-intestinales, pancréatiques et du tissu adipeux afin de contrôler la prise alimentaire. Finalement, nous ferons le point sur la schizophrénie et son association avec des troubles alimentaires, métaboliques et digestifs.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Axe cerveau-intestin

A. Le tube digestif

1. Rappels anatomiques

Le tube digestif (TD) comprend l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon (**Figure 1**). Il possède cinq fonctions principales : motricité, sécrétion, digestion, absorption et immunité. Il est constitué de quatre tuniques dont l'importance et la composition varient selon les régions du TD et leurs fonctions.

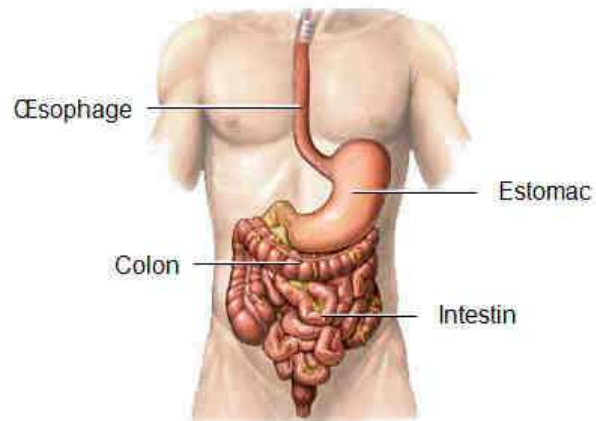


Figure 1 : Représentation du tube digestif. <http://www.digestionhelp.org> (consulté le 06.05.12).

De manière générale, de la lumière intestinale vers l'extérieur des organes, se trouvent (**Figure 2** ; Stevens & Lowe, 1997) :

- la muqueuse, constituée de cellules épithéliales (organisées en villosités), d'une *lamina propria* et de la musculaire muqueuse. C'est la structure la plus variable du TD. Elle est composée d'un mélange de différents types de cellules épithéliales aussi bien absorbantes (entérocytes) que sécrétrices (cellules caliciformes et entéroendocrines) ou des cellules participant à l'immunité (cellules M).
- la sous-muqueuse, tissu conjonctif renfermant un plexus nerveux ganglionnaire (plexus d'Auerbach), des vaisseaux sanguins et le système lymphatique. Elle participe activement à la sécrétion et l'absorption.
- la musculouse, constituée de deux couches de muscles lisses : une couche de fibres musculaires internes à orientation circulaire et une couche de fibres externes à orientation longitudinale. Le rôle de la musculouse est de faire progresser le contenu de la lumière digestive le long du TD. La progression du bol alimentaire résulte du péristaltisme qui est un mouvement musculaire synchronisé dans lequel une vague de contraction se déplace d'amont en aval, propulsant le contenu de la lumière intestinale vers le segment relâché sous-jacent. Entre les deux couches musculaires lisses, on

retrouve de petits vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi qu'un plexus nerveux ganglionnaire (plexus de Meissner).

- la séreuse, tissu conjonctif lâche constitué de fibroblastes, de collagène, d'adipocytes et de vaisseaux sanguins.

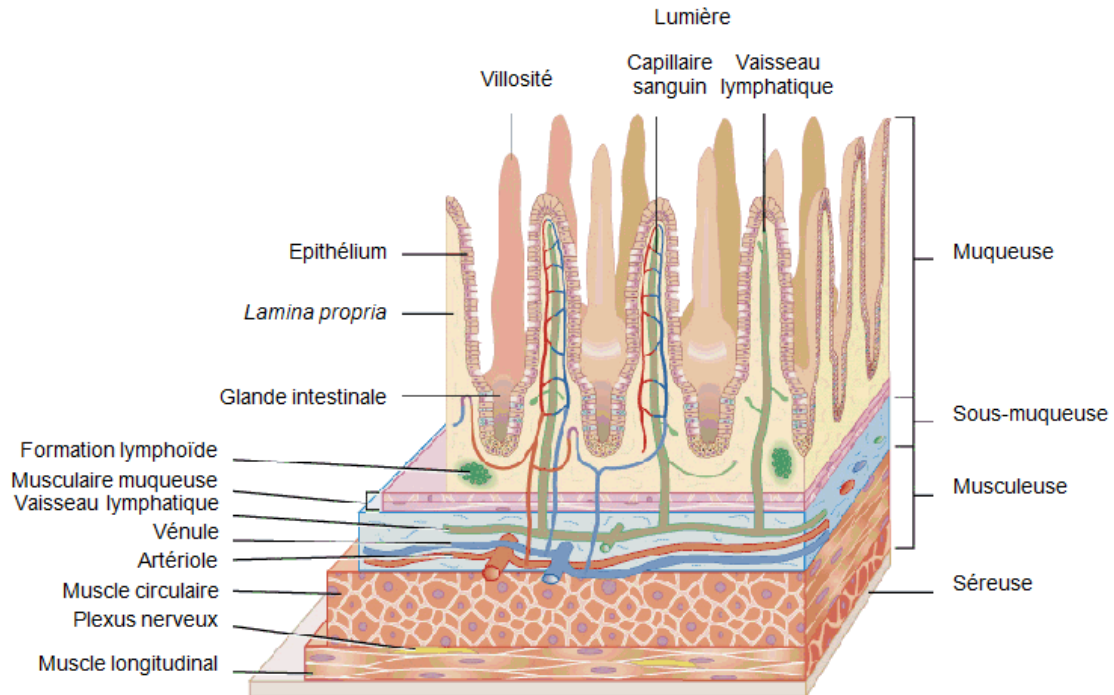


Figure 2 : Coupe de la paroi intestinale. <http://faculty.southwest.tn.edu> (consulté le 06.05.12).

2. Activité contractile

L'activité contractile du TD permet la progression du bol alimentaire dans le tube digestif, son brassage avec les sécrétions digestives, l'absorption des nutriments et l'évacuation des déchets. Trois types de cellules sont à l'origine de la genèse et de la coordination de cette activité motrice :

- Les cellules musculaires lisses sont des cellules mononucléées fusiformes qui mesurent au repos 400 à 500 μm de long pour 5 à 8 μm de large (**Figure 3**). Plusieurs cellules musculaires sont regroupées au sein de fibres musculaires (unités contractiles), elles-mêmes regroupées en syncytium fonctionnel (Roman & Mion, 2009). Au sein d'un syncytium, les cellules sont liées entre elles par des jonctions entre leurs membranes cellulaires, leur permettant ainsi de se relâcher et de se contracter en même temps (Sherwood, 2006). D'une part, les jonctions intermédiaires assurent la cohésion

mécanique entre les cellules et permettent au muscle de développer une tension nécessaire aux mouvements du TD. D'autre part, les jonctions communicantes assurent le couplage électrique et sont à l'origine de la diffusion de l'excitation entre les cellules musculaires. L'activation de récepteurs membranaires de la cellule musculaire lisse par des ligands spécifiques (neuromédiateurs du système nerveux par exemple) entraîne un afflux de calcium dans le cytoplasme. L'augmentation transitoire de calcium intracellulaire est à l'origine d'une augmentation d'affinité entre les protéines contractiles (actine et myosine) et permet les contractions phasiques du muscle. La relaxation du muscle est secondaire à une diminution d'affinité de ces protéines.

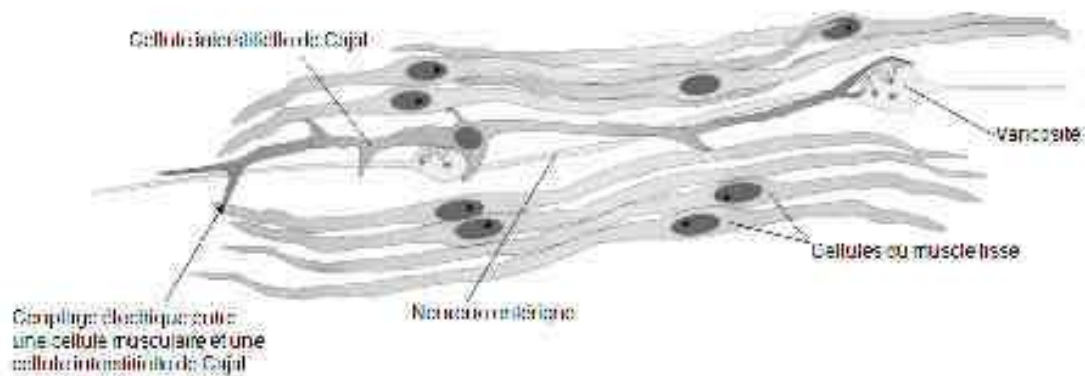


Figure 3 : Transmission de l'activité motrice intestinale. D'après Ward, 2000.

- Les cellules interstitielles de Cajal sont responsables de l'automatisme du TD (rôle pacemaker) et de la synchronisation de l'activité motrice (Sanders & Ward, 2006). Ce sont des cellules fusiformes situées entre les couches musculaires au voisinage du plexus myentérique (**Figure 3**). Elles possèdent de nombreuses ramifications et forment ainsi un véritable réseau. Elles sont couplées entre elles et avec les cellules musculaires lisses par des jonctions communicantes. Les jonctions communicantes permettent la propagation des oscillations spontanées du potentiel de membrane des cellules interstitielles de Cajal, initiées par les afflux de calcium dans le cytoplasme, aux cellules musculaires lisses (Roman & Mion, 2009). Ces variations du potentiel de membrane sont à l'origine de l'activité rythmique électrique des cellules du muscle lisse appelées ondes lentes (**Figure 4A**). L'activité électrique ne donne naissance à une activité mécanique que si des potentiels de pointe, appelés potentiels d'action apparaissent sur le plateau des ondes lentes. Les potentiels d'action correspondent à des dépolarisations de la fibre lisse qui n'apparaissent que lorsque le seuil

d'excitabilité membranaire est atteint, lors d'une dépolarisation induite par une onde lente. Ainsi, l'existence d'ondes lentes de dépolarisation régule la survenue des contractions (**Figure 4B**). La fréquence des contractions mécaniques est donc réglée par la fréquence d'apparition des ondes lentes tandis que l'intensité de l'activité mécanique est proportionnelle à la fréquence des potentiels d'action.

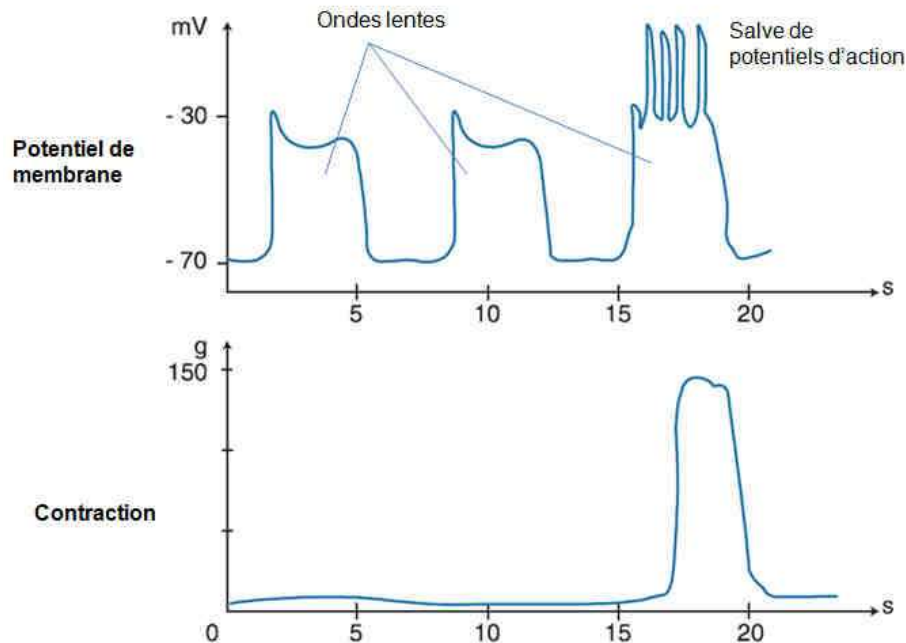


Figure 4 : Variation **A** du potentiel membranaire des cellules musculaires lisses et **B** de l'activité contractile. D'après Roman & Mion, 2009.

- Les neurones assurent la coordination de l'activité musculaire. En effet, les cellules musculaires lisses (et les cellules interstitielles de Cajal) sont directement modulées par les varicosités présentes sur les axones des neurones intramuraux (**Figure 3**). Elles assurent ainsi le brassage et la propulsion du bol alimentaire de l'œsophage vers l'anus via le réflexe péristaltique (Roman & Mion, 2009). Ce réflexe est initié par l'arrivée du bol alimentaire dans la lumière du TD qui provoque un étirement des parois du TD et finalement la stimulation de leurs neurones. Par leur modulation coordonnée, ces neurones assurent en aval une contraction de la couche musculaire longitudinale et une relaxation de la couche circulaire, aboutissant à une augmentation du diamètre du segment du TD (**Figure 5A**). Ils assurent en amont une contraction de la couche circulaire et une relaxation de la couche longitudinale, permettant la propulsion du bol vers l'avant. Ces circuits se répètent de façon séquentielle et coordonnée le long du TD assurant la propagation de l'onde péristaltique. Les

mouvements de brassage (segmentation) sont assurés par l'activation isolée des circuits neuronaux qui permet la contraction du muscle lisse et aboutit à la propagation de forces propulsives dirigées en amont et en aval sur de courtes distances (**Figure 5B**).

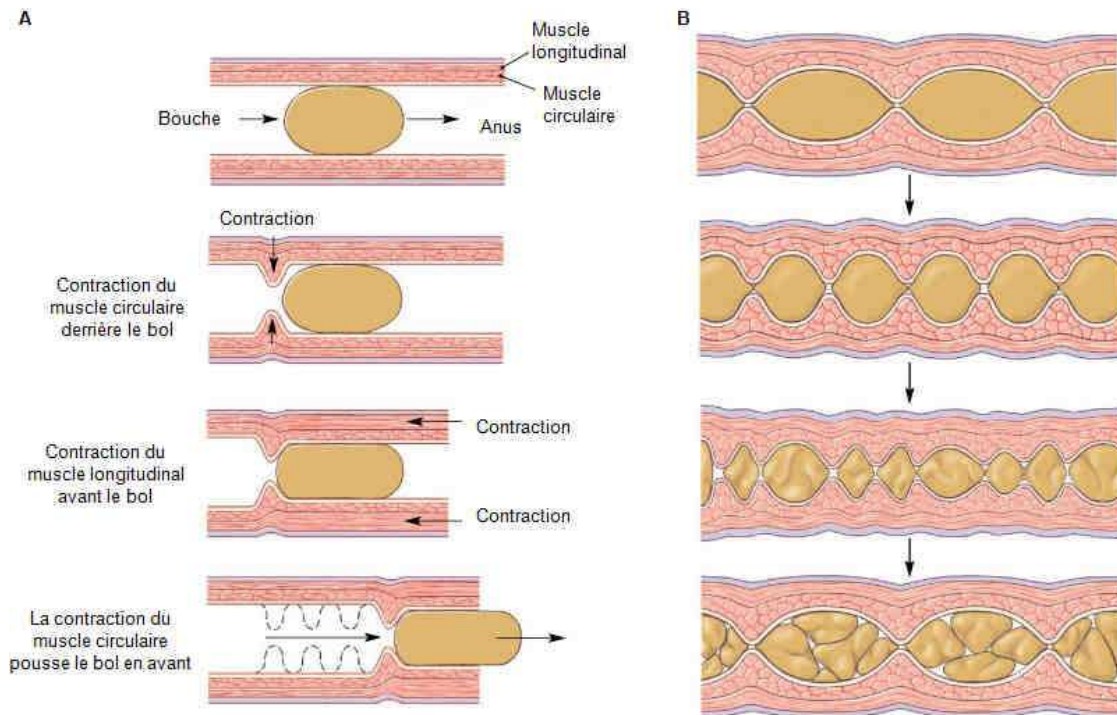


Figure 5 : Activité motrice, **A** péristaltisme et **B** segmentation, du tube digestif. <http://iupucbio2.iupui.edu/anatomy/LectNoteIntro.htm> (consulté le 21.05.12).

B. Bases anatomiques de l'axe cerveau-intestin

Le système nerveux central (SNC) est connecté au TD par des voies nerveuses qui collectent l'information à partir de récepteurs sensitifs situés en périphérie (structures dans le TD) et qui la transmettent aux aires corticales. Après l'intégration et l'analyse de l'information, une réponse est générée pour moduler les fonctions du TD. Comme tout organe périphérique, le TD est innervé par le système nerveux autonome (SNA). Le SNA est composé des deux divisions sympathique et parasympathique de l'innervation extrinsèque autonome (les corps cellulaires des neurones sont situés en dehors du TD). Langley (1921) a mis en évidence l'existence d'une troisième division du SNA dans le TD : le système nerveux entérique (SNE) dont les neurones sont intrinsèques au TD.

1. Innervation intrinsèque

a. Organisation du SNE

Les corps cellulaires des neurones du SNE sont regroupés en ganglions, connectés entre eux par des faisceaux de fibres nerveuses amyéliniques. Ces ganglions forment le plexus myentérique (ou plexus d'Auerbach) et le plexus sous-muqueux (ou plexus de Meissner) (**Figure 6** ; Purves *et al.*, 2001). Le plexus myentérique se situe entre les couches musculaires

longitudinale et circulaire et s'étend sur toute la longueur du TD. Il est impliqué dans l'innervation motrice de ces deux couches musculaires et dans l'innervation

sécréto-motrice de la muqueuse (Furness,

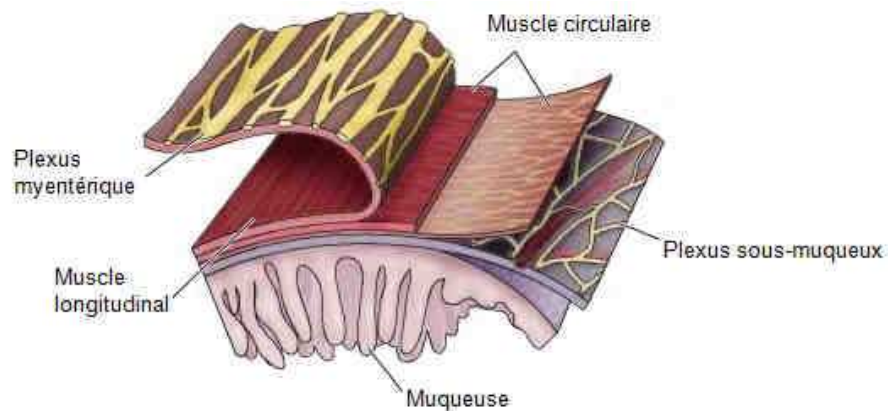


Figure 6 : Organisation du système nerveux entérique. D'après Purves *et al.*, 2001

2006). Le plexus sous-muqueux est localisé dans la sous-muqueuse, entre le muscle circulaire et la muqueuse. Il est retrouvé essentiellement dans l'intestin grêle et est impliqué dans le contrôle des sécrétions et du flux sanguin. Il est moins développé, bien que présent, dans le côlon. Les neurones du plexus sous-muqueux innervent non seulement l'épithélium glandulaire mais également la musculature muqueuse, les cellules endocrines intestinales et les vaisseaux sanguins sous-muqueux.

b. Structure du SNE

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

- Le SNE est originaire de la crête neurale (**Figure 7A**). La crête neurale chez l'embryon est constituée d'une population de cellules transitoires et multipotentes générées à partir de la région la plus dorsale du tube neural (à l'origine du SNC, **Figure 7B**). Les cellules du segment vagal de la crête neurale migrent et colonisent le TD au cours du développement (**Figure 7C** ; Le Douarin *et al.*, 1994). Une fois dans le

TD, ces cellules précurseurs se différencient en cellules gliales et en neurones qui constituent l'innervation intrinsèque du TD (**Figure 7D** ; Langley 1994).

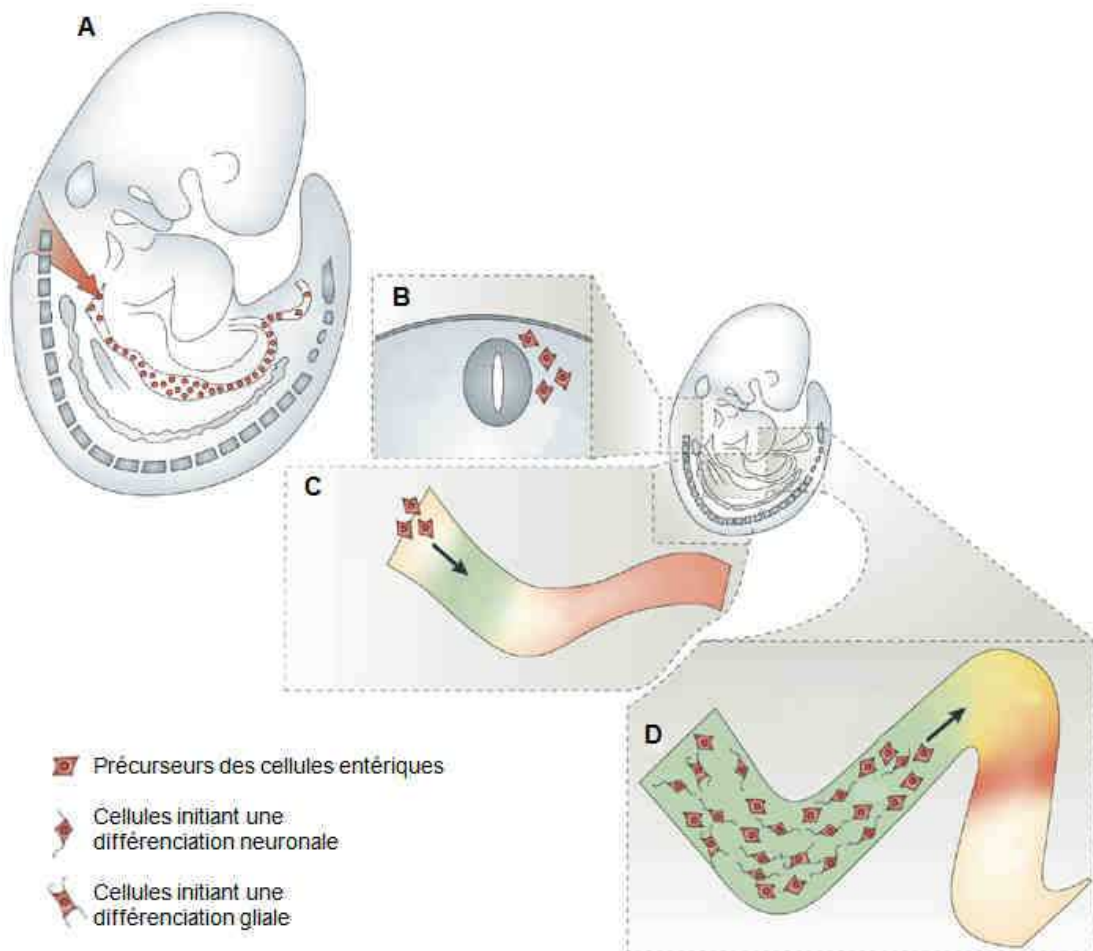


Figure 7 : Mise en place du système nerveux entérique à partir des cellules de la crête neurale **A** et **B** au cours du développement embryonnaire. Ces cellules **C** migrent dans le tube digestif **D** avant de se différencier. D'après Heanue & Pachnis, 2007 ; modifié.

- Le SNE contient entre 200 et 600 millions de neurones chez l'Homme soit approximativement le même nombre que ceux de la moelle épinière (Furness, 2006).
- Le SNE synthétise la plupart des neurotransmetteurs synthétisés par le SNC (Olsson & Holmgren, 2010).
- Le SNE est un système intégratif composé de neurones afférents, efférents et d'interneurones qui peut présenter une activité indépendante du SNC (**Figure 8** ; Serio *et al.*, 2011).

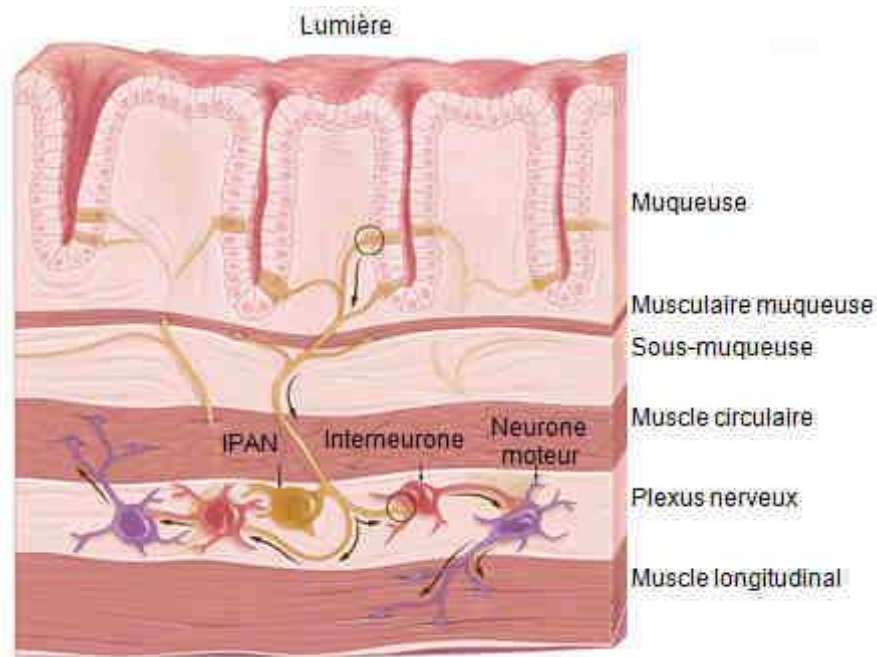


Figure 8 : Classification des neurones intrinsèques d'après leur fonction. IPAN : neurone afférent primaire intrinsèque. www.hopkins-gi.org, modifié (consulté le 09.05.12).

c. Neurones fonctionnels du SNE

Les neurones entériques sont classés en fonction de leur morphologie, de leurs propriétés électrophysiologiques et de la nature de leurs neurotransmetteurs. Un schéma fonctionnel de l'innervation intrinsèque de l'iléon du cobaye a ainsi pu être établi (Costa *et al.*, 1996 ; Furness, 2006). Cependant, ce schéma varie en fonction des espèces et en fonction des régions du TD (Furness, 2006). D'un point de vue général (**Figure 8** ; Furness, 2007) :

- les neurones afférents primaires intrinsèques (IPANs) reçoivent l'information sensitive et régulent l'activité des interneurones et des neurones moteurs entériques. Les IPANs myentériques et sous-muqueux sont multimodaux et peuvent répondre à des stimuli de nature différentes : ils peuvent répondre à la distorsion de leurs récepteurs dans les couches musculaires ou dans la muqueuse et, via des récepteurs dans la muqueuse, aux changements chimiques de la lumière du TD (**Figure 9** ; Furness *et al.*, 2004).

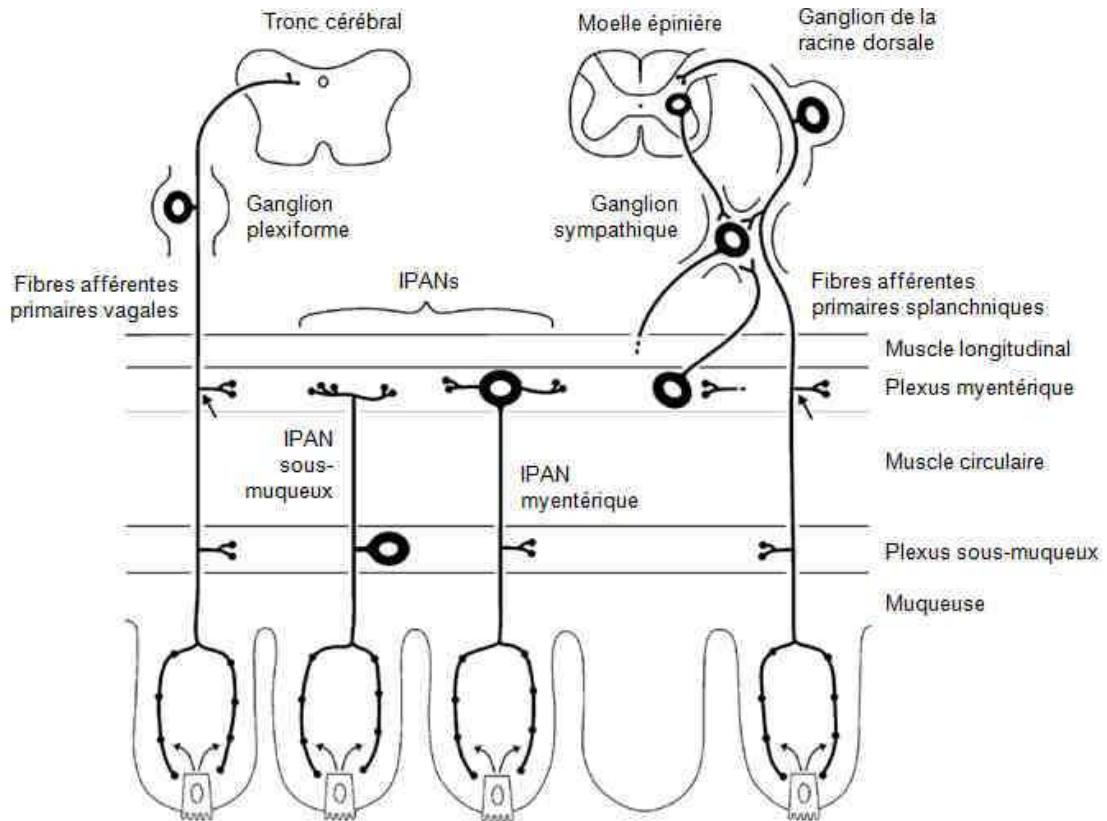


Figure 9 : Neurones afférents du tube digestif. IPAN : neurone afférent primaire intrinsèque ; ↷ hormones libérées par les cellules entéroendocrines. D'après Furness *et al.*, 2004.

- les neurones moteurs peuvent être excitateurs ou inhibiteurs. Les neurones moteurs excitateurs stimulent les cellules effectrices en libérant des neurotransmetteurs excitateurs (acétylcholine - ACh, substance P, tachykinines ...) alors que les neurones moteurs inhibiteurs libèrent des neurotransmetteurs qui réduisent l'activité de ces cellules effectrices (monoxyde d'azote - NO, adénosine triphosphate, ...).
- les interneurones forment un réseau dense au travers duquel les informations transitent. Ils permettent ainsi d'établir de multiples connexions entre les neurones afférents et efférents.

2. Innervation extrinsèque

Le TD reçoit une innervation extrinsèque sympathique et parasympathique. Ces deux divisions sont dites mixtes car elles sont constituées de fibres afférentes, qui transportent les informations sensibles vers les centres intégrateurs, et de fibres efférentes qui transmettent la commande motrice aux effecteurs.

a. Innervation afférente

Les récepteurs du TD sont des terminaisons nerveuses de neurones afférents primaires capables de collecter l'information sensitive provenant de la muqueuse, des couches musculaires ou de la séreuse et de la transmettre au cerveau via le SNA.

La division parasympathique est constituée d'afférences vagues (80% des fibres nerveuses du nerf vague - Andrews, 1986) et spinales. Le corps cellulaire des neurones afférents primaires vagues est localisé dans le ganglion plexiforme et leurs terminaisons nerveuses dans le tronc cérébral (**Figure 9**) alors que les terminaisons nerveuses du nerf pelvien sont localisées dans la partie sacrée de la moelle épinière. Ces neurones afférents synthétisent principalement le glutamate mais également le peptide relié au gène de la calcitonine et la substance P.

Les corps cellulaires des neurones afférents primaires splanchniques (division sympathique) sont localisés dans le ganglion de la racine dorsale (**Figure 9**). Ces neurones émettent également des branches collatérales dans le ganglion prévertébral (ganglion sympathique). Leurs terminaisons se trouvent dans la moelle épinière thoracique et lombaire. Le peptide relié au gène de la calcitonine et la substance P sont les principaux neurotransmetteurs de ces neurones (Green & Dockray, 1988).

b. Innervation efférente

Les fibres efférentes parasympathiques préganglionnaires du nerf vague sont d'origine bulbaire (noyau moteur dorsal du vague ; **Figure 10**). Ces fibres viennent faire synapse sur les neurones entériques où elles libèrent de l'ACh qui possède une action excitatrice sur les neurones entériques principalement via les récepteurs nicotiques et dans certaines régions via les récepteurs muscariniques.

L'innervation efférente sympathique est constituée d'une voie à deux neurones (**Figure 10**). Les neurones pré-ganglionnaires viennent de la moelle épinière et innervent le ganglion prévertébral via le nerf splanchnique. Les fibres qui pénètrent le TD sont donc des fibres nerveuses post-ganglionnaires. Les neurones pré-ganglionnaires sont cholinergiques alors que les neurones post-

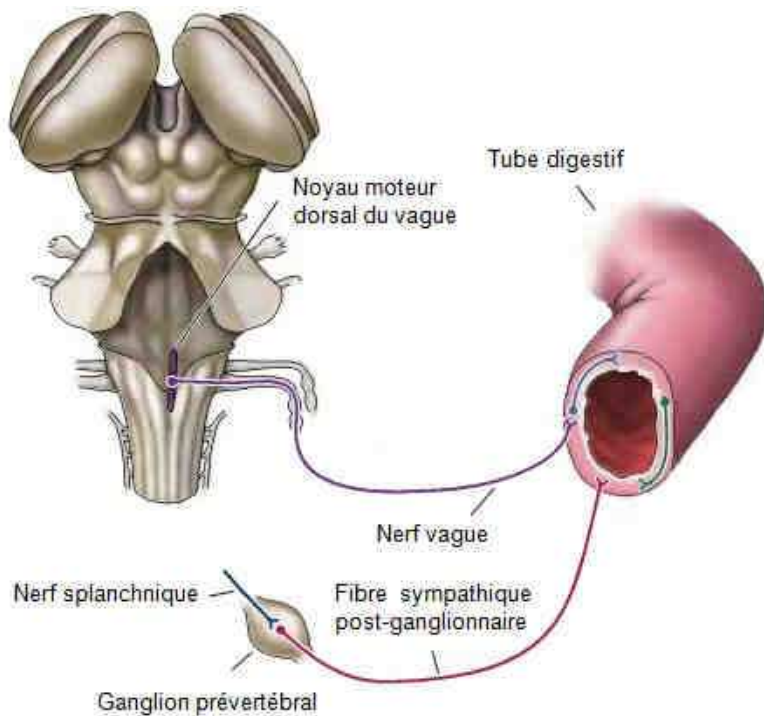


Figure 10 : Innervation efférente extrinsèque du tube digestif. D'après Purves *et al.*, 2001 ; modifié.

ganglionnaires sont essentiellement adrénérgiques. La noradrénaline possède des effets inhibiteurs sur le muscle lisse gastro-intestinal (sauf au niveau des sphincters) via son action sur les neurones entériques.

C. Concept de l'axe cerveau-intestin

Le SNC est en interaction permanente avec le TD, d'où le concept d'« axe cerveau-intestin ». Dans cet axe, le SNE peut être considéré comme une partie du SNC qui a migré vers le TD durant le développement mais qui a maintenu deux voies de communications (sympathique et parasympathique) bidirectionnelles avec le cerveau (chacune contenant des fibres nerveuses afférentes et efférentes) et qui contrôle le système effecteur (cellules musculaires, muqueuses, vasculaires et lymphatiques du TD ; **Figure 11** ; Konturek *et al.*, 2004). L'axe cerveau-intestin représente donc un circuit de réflexes complexes, composé de récepteurs, de fibres afférentes projetant vers les aires intégratives centrales et de fibres efférentes projetant aux structures efférentes du TD (Gaman & Kuo, 2008). Le SNC est ainsi informé en permanence de la nature de l'environnement chimique dans la lumière du TD, de la tension dans la paroi du TD et de la condition du tissu (inflammation par exemple) via les afférences. Une fois le signal intégré, le SNC module les fonctions gastro-intestinales par le biais des neurones efférents qui stimulent les neurones du SNE, eux-mêmes en interaction

avec les cellules effectrices. L'activité du TD peut également être directement modulée par le SNE lorsqu'il contourne le réseau cortical : il peut alors générer une activité indépendamment de toute intervention du SNC (Furness, 2006).

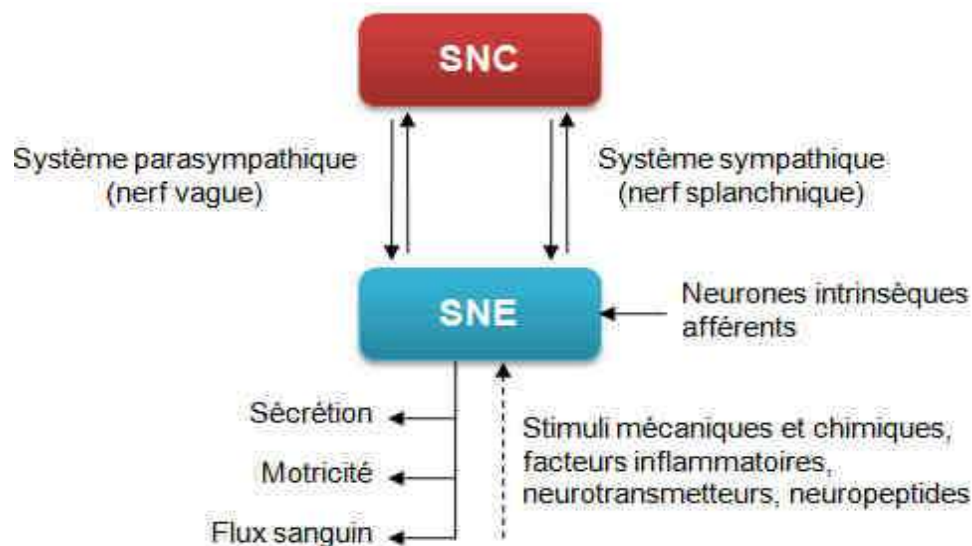


Figure 11 : Organisation de l'axe cerveau-intestin. SNC : système nerveux central, SNE : système nerveux entérique. D'après Konturek *et al.*, 2004 ; modifié.

L'axe cerveau-intestin joue donc un rôle primordial dans la régulation de certaines fonctions vitales. Dans les conditions physiologiques, il contrôle les processus digestifs (motricité, sécrétions exocrines ou endocrines et microcirculation du TD), le comportement alimentaire (appétit et prise alimentaire), le système immunitaire gastro-intestinal et la réponse au stress, à la douleur ou aux émotions. Dans les conditions pathologiques, une altération des interactions entre le cerveau et le TD peut conduire à des troubles digestifs (troubles digestifs fonctionnels - reflux gastro-œsophagien, syndrome de l'intestin irritable ; revue dans Mayer *et al.*, 2006 - ou maladies inflammatoires chroniques intestinales - MICI) ou à des troubles alimentaires variés (anorexie mentale, obésité).

D. Signalisation dans l'axe cerveau-intestin

1. Signaux sensitifs du TD au SNC

Les neurones afférents extrinsèques ou les IPANs montrent une sensibilité aux stimuli mécaniques et chimiques, qu'ils soient physiologiques ou nocifs (**Figure 12**). Ils sont le plus souvent multimodaux et répondent aux stimuli provenant de la muqueuse, des couches

musculaires et de la séreuse (Mayer, 2011). Les fibres afférentes extrinsèques transmettent l'information sensitive au cerveau ou à la moelle épinière mais la nature de cette information est différente entre les afférences splanchniques et vagues (Grundy, 2004). Ainsi, les afférences vagues transmettent essentiellement les informations physiologiques tandis que les afférences splanchniques transmettent les informations nociceptives.

Les stimuli mécaniques (tension, pression, distorsion) activent directement les mécanorécepteurs des neurones afférents vagues et splanchniques (**Figure 12**). On distingue deux populations de fibres afférentes en fonction de la sensibilité de leurs mécanorécepteurs (Dockray, 2009a) : certaines fibres afférentes (fibres à seuil faible) répondent à des distensions physiologiques (pression < 30 mm Hg) tandis que d'autres fibres (fibres à seuil élevé) ne sont stimulées que par des pressions élevées (> 30 mm Hg) comparables à une signalisation nociceptive. Les premières sont essentiellement vagues et les secondes splanchniques.

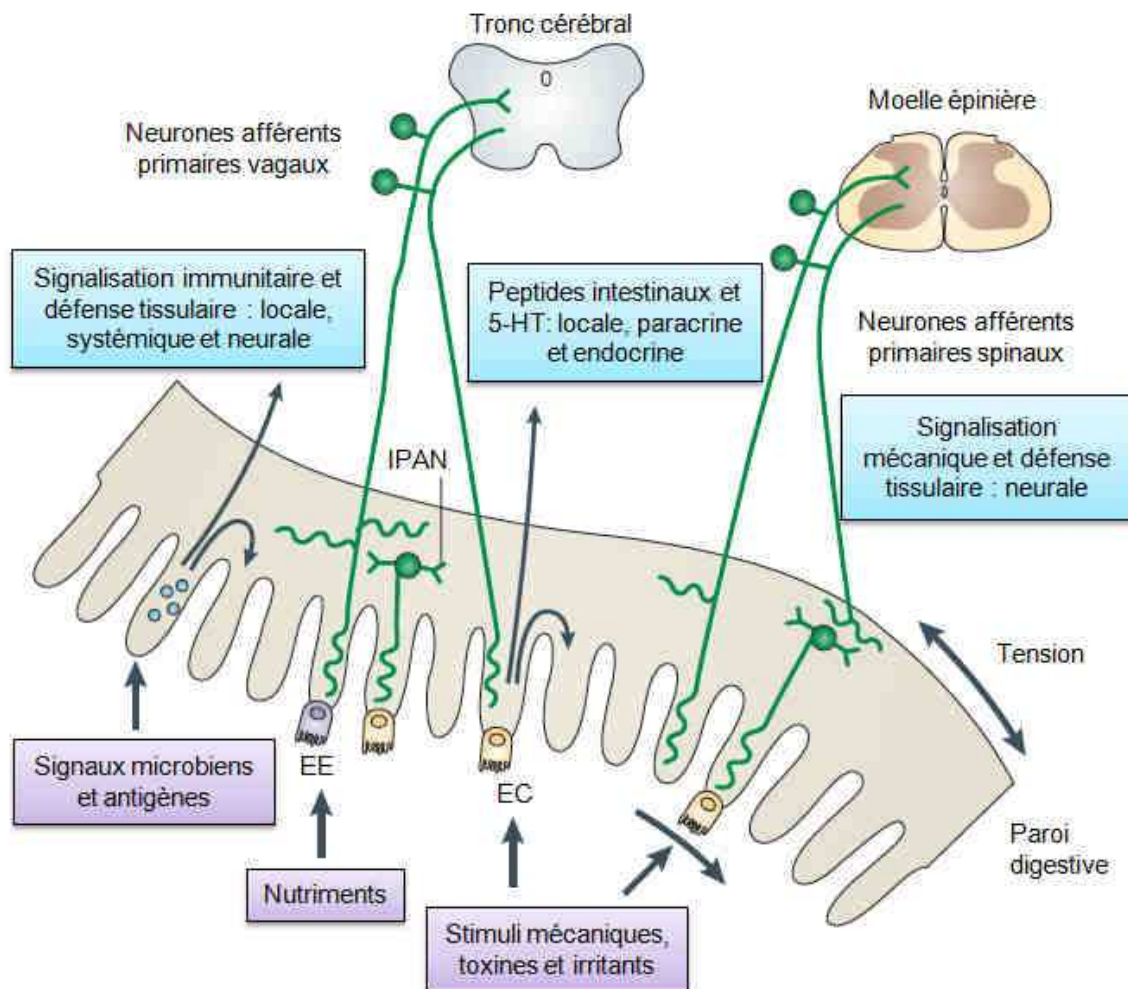


Figure 12 : Signalisation afférente extrinsèque du tube digestif. EE : cellule entéroendocrine, EC : cellule entérochromaffine. D'après Mayer, 2011.

Les chimiorécepteurs des neurones afférents peuvent être activés par des facteurs chimiques ou physiques situés dans la lumière du tube digestif ou des facteurs non lumineux (par exemple neurohormones ; **Figure 12** ; Dockray, 2009a) :

- Les macronutriments (glucose, acides aminés et acides gras) présents dans la lumière du TD peuvent traverser la muqueuse et stimuler directement les afférences nerveuses vagales (Mei, 1985). D'autres stimuli chimiques toxiques ou irritants (solutions acides, basiques, hypertoniques) de la lumière du TD activent également les fibres afférentes essentiellement splanchniques.
- Les hormones peptidiques ou les amines sont synthétisées par les cellules entéroendocrines en réponse à une déformation mécanique de la surface du TD ou à la présence de macronutriments, de toxines ou d'antigènes dans la lumière (Mayer, 2011). Ces substances peuvent transmettre l'information du TD au SNE ou au cerveau. Dans ce dernier cas, soit les produits des cellules entéroendocrines stimulent les fibres nerveuses afférentes vagales via l'activation de leurs récepteurs (action paracrine), soit ils pénètrent dans le SNC via la circulation sanguine (action endocrine). Ces substances sont particulièrement impliquées dans la régulation de la motricité digestive. Par exemple, la sérotonine est libérée par les cellules entérochromaffines en présence de glucides dans la lumière du TD (Zhu *et al.*, 2001 ; Grundy, 2004) et la cholécystokinine (CCK) est synthétisée par d'autres cellules entéroendocrines en présence de lipides ou de protéines (Berthoud & Patterson, 1996). La sérotonine active son récepteur 5-HT₃ (Uneyama *et al.*, 2002) et la CCK le récepteur CCK-A sur les afférences vagales (Moriarty *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2004).
- Les médiateurs immunitaires (et inflammatoires) comme les protéases, l'histamine, la sérotonine, le facteur de libération de la corticotrophine et les cytokines sont synthétisés par les mastocytes et les macrophages, lors d'une ischémie, d'une infection, d'une inflammation ou de dommages touchant le TD (Castex *et al.*, 1994 ; Akoev *et al.*, 1996 ; Kurosawa *et al.*, 2000 ; Barbara *et al.*, 2007). Ces médiateurs peuvent agir directement sur les afférences nerveuses vagales ou peuvent moduler la sensibilité des afférences spinales (Grundy, 2004). Ils peuvent également stimuler les cellules entéroendocrines.

- Certains médiateurs sont impliqués dans la sensation de douleur dans le TD et activent les nocicepteurs des neurones afférents splanchniques (Goyal & Hirano, 1996) de trois manières : par une activation directe, une sensibilisation ou par l'altération du phénotype des afférences (Grundy, 2004). Certains neurotransmetteurs comme le peptide relié au gène de la calcitonine ou la substance P interviennent dans l'activation de ces afférences dans des cas d'ischémie ou d'inflammation du TD (Green & Dockray, 1988).

2. Activation du SNC

Une fois stimulées, les fibres afférentes vagales transmettent l'information du TD au SNC. Les neurones afférents vagues pénètrent dans le tronc cérébral qui est un carrefour pour la transmission de l'information du TD au SNC et qui permet le contrôle des fonctions digestives via le réflexe vago-vagal. Ce réflexe permet la relaxation du TD, notamment de l'estomac, en réponse à l'arrivée du bol alimentaire dans l'œsophage (anticipation via la stimulation des mécanorécepteurs) ou en réponse à la distension par le bol déjà présent dans l'estomac (accommodation). Les informations sont transmises par les terminaisons nerveuses vagales majoritairement dans le noyau du tractus solitaire (NTS) (**Figure 13** ; Kenny, 2011).

A son tour, le NTS envoie des informations via des projections vers les centres nerveux supérieurs du cerveau tels que l'hypothalamus (plus particulièrement le noyau paraventriculaire ou le noyau arqué - ARC), l'amygdale (noyau central de l'amygdale), le noyau du lit de la strie terminale, le cortex et le thalamus (Berthoud *et al.*, 1990 ; Andrews & Sanger, 2002) qui sont impliqués dans différentes fonctions comme

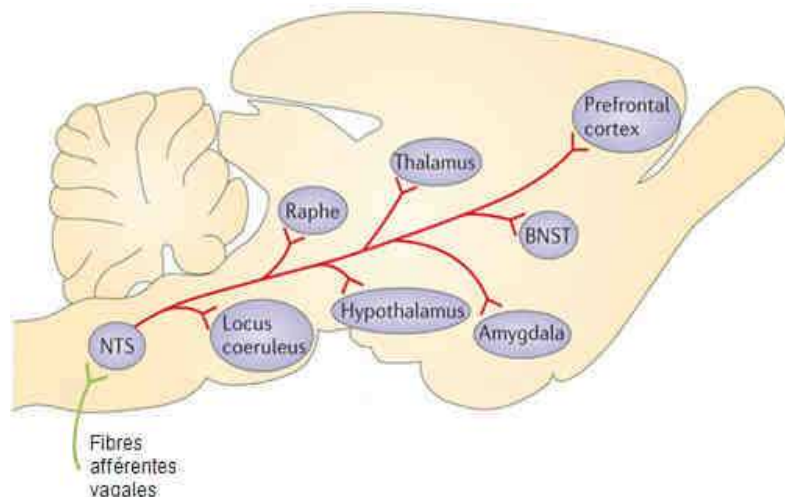


Figure 13 : Contribution du noyau du tractus solitaire (NTS) à la transmission des informations du tube digestif par les fibres afférentes vagues vers les structures du système nerveux central. BNST : noyau du lit de la strie terminale. D'après Kenny, 2011 ; modifié.

la prise alimentaire. En retour, ces structures stimulent principalement le noyau moteur dorsal du vague d'où proviennent les fibres efférentes qui innervent le TD (Chang *et al.*, 2003).

Les fibres afférentes splanchniques quant à elles, transmettent l'information à la moelle épinière afin d'effectuer le réflexe spinal qui permet le contrôle des fonctions motrices et sécrétrices du TD (Maggi, 1991) ou encore vers le tronc cérébral (NTS et *area postrema*) qui projette vers les structures cérébrales supérieures.

3. Transduction du signal du SNC au TD

Les fonctions du TD sont régulées par les réflexes intrinsèques locaux mais également par les réflexes extrinsèques (contrôle du SNC ; **Figure 14**). L'innervation intrinsèque est essentielle dans l'initiation des fonctions du TD (notamment motrices) tandis que l'innervation extrinsèque est primordiale dans la coordination de ces fonctions. Les nerfs efférents sympathique ou parasympathique modulent donc les activités motrices et sécrétrices contrôlées par le SNE. En effet, les cellules effectrices dans l'axe cerveau-intestin sont les cibles des neurones du SNE telles que les cellules musculaires lisses et les cellules pacemaker (cellules intestinielles de Cajal) responsables de la motricité du TD, les cellules sécrétrices de et endocrines de la muqueuse, les cellules des tissus vasculaires (cellules musculaires lisses et endothéliales) qui maintiennent le flux sanguin dans la muqueuse lors de la sécrétion et les cellules inflammatoires et immunitaires (Goyal & Hirano, 1996 ; Costa, 2000).

Les neurones efférents sympathiques agissent sur les neurones vasoconstricteurs, les neurones sécréteurs et les neurones moteurs du SNE (**Figure 14** ; Furness, 2006). Ils constituent une innervation inhibitrice du TD qui permet le ralentissement de la motricité et des sécrétions du TD. Ces effets sont largement permis par l'inhibition de la transmission cholinergique (sympathique) et par la stimulation des muscles lisses des sphincters. D'autres neurones efférents sympathiques sont impliqués dans la modulation immunitaire (modulation des interactions entre les micro-organismes et la muqueuse ; Elenkov *et al.*, 2000) et dans la régulation du flux sanguin (Lundgren, 2000).

Il existe un gradient d'abondance des neurones efférents vagues (fibres parasympathiques préganglionnaires) de l'estomac au côlon proximal (Mayer, 2011). Ces neurones excitateurs innervent les ganglions du SNE afin de moduler la motricité et la sécrétion du TD (Chang *et al.*, 2003). En effet, ces neurones modulent le réflexe moteur vago-

vagal ainsi que les activités contractiles segmentaires et propagées qui permettent le transport des substances de la lumière le long du TD. Les efférences vagales modulent également la phase céphalique de la sécrétion d'acide gastrique ainsi que la libération des produits des cellules entéroendocrines (gastrine, somatostatine, histamine) et les réactions immunitaires (inflammation).

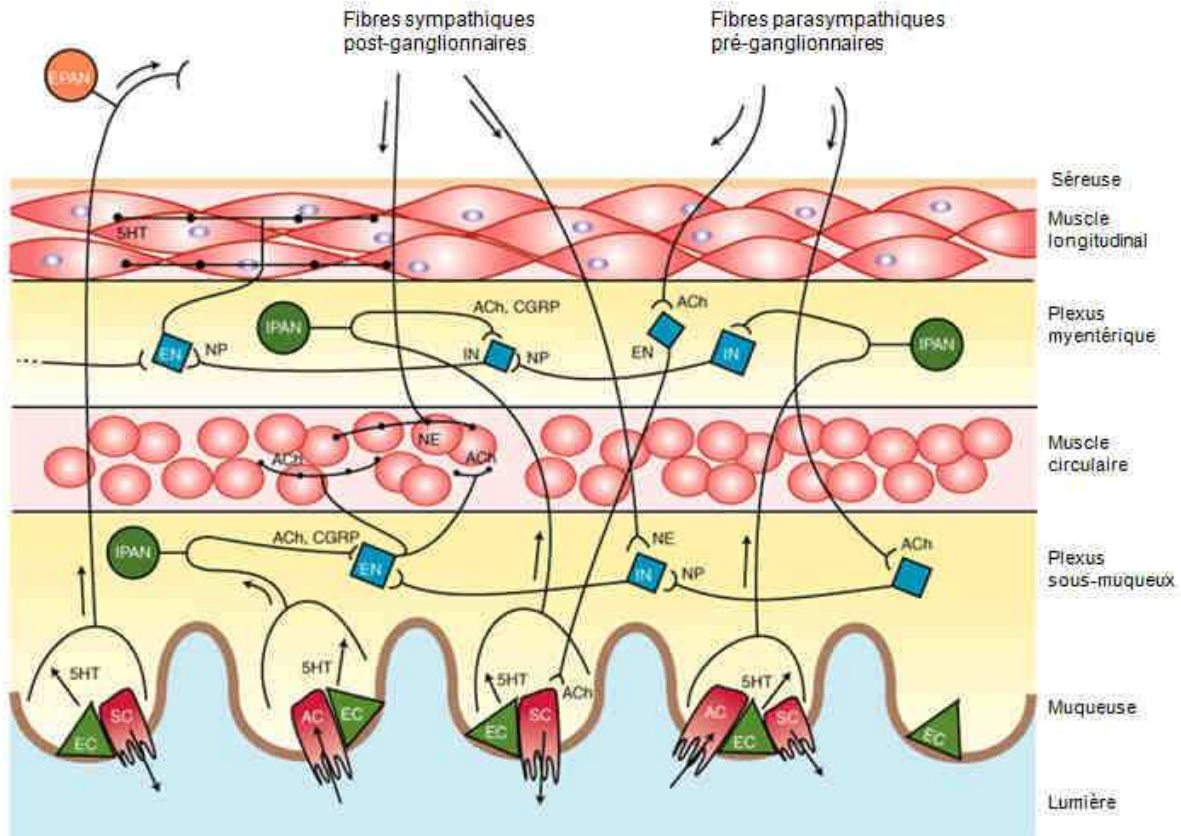


Figure 14 : Exemples de circuits dans le système nerveux entérique et innervation efférente sympathique et parasympathique. 5HT : sérotonine, ACh : acétylcholine, AC : cellules absorbantes, EC : cellules entérochromaffines, EN : neurone excitateur, EPAN : neurone afférent primaire extrinsèque, IN : neurone inhibiteur, IPAN : neurone afférent primaire intrinsèque, NE : noradrénaline, NP : neuropeptides. D'après Katzung *et al.*, 2009 ; modifié.

L'axe cerveau-intestin désigne le réseau complexe de récepteurs, de fibres afférentes projetant vers les aires centrales intégratives et de fibres efférentes projetant sur les structures effectrices. Il constitue le support nerveux permettant une interaction bidirectionnelle entre le TD, et plus particulièrement le SNE, et le SNC via les voies sympathique et parasympathique. Cet axe peut être modulé par de nombreux facteurs, qu'ils appartiennent au système hormonal (hormones du TD ou de l'axe hypothalamo-hypophyséo-surrénalien) ou au système immunitaire. En particulier, les hormones intrinsèques et extrinsèques au TD modulent l'axe cerveau-intestin et participent à la digestion et au contrôle de la prise alimentaire.

II. Axe cerveau-intestin et contrôle de la prise alimentaire

A. Régulation de la balance énergétique

1. Concept de balance énergétique

La balance énergétique est un état métabolique correspondant à un équilibre entre la dépense énergétique et les apports énergétiques (Näslund & Hellström, 2007). Cependant, chez certaines personnes, un déséquilibre entre ces facteurs peut conduire à une prise de poids et finalement à l'obésité (**Figure 15**).

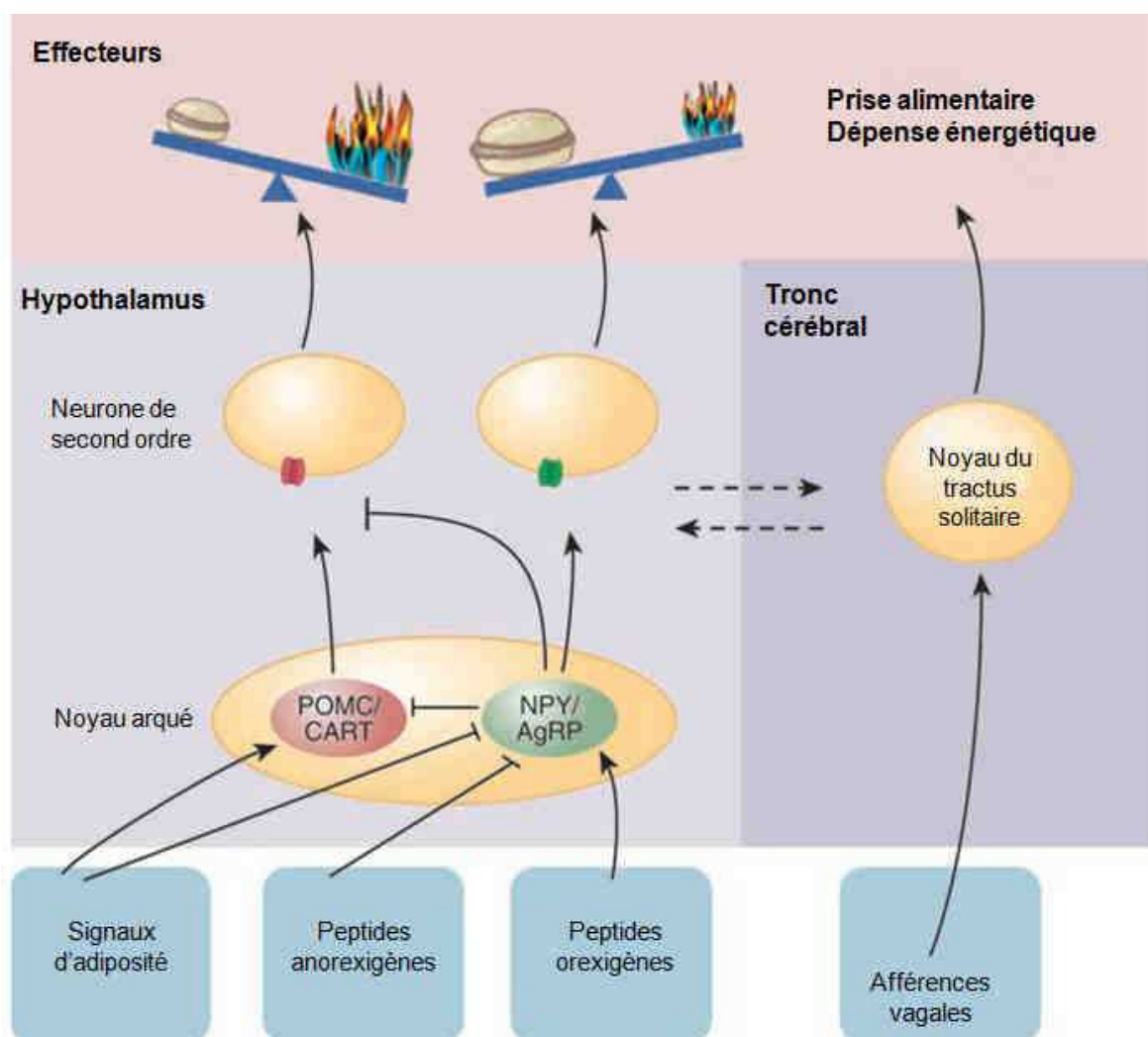


Figure 15 : Régulation de la balance énergétique. AgRP: *agouti-related peptide*, CART : transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine, NPY : neuropeptide Y, POMC : pro-opiomélanocortine → stimulation directe, —| inhibition directe, ---▶ action indirecte. D'après Badman & Flier, 2005 ; modifié.

A l'heure actuelle, on sait que le contrôle de la prise alimentaire implique non seulement le SNC mais également les organes périphériques tels que les glandes surrénales, le pancréas, le tissu adipeux et le TD (Coll *et al.*, 2007). Ces organes libèrent des hormones qui peuvent intervenir à court terme ou à long terme (**Figure 15**). Ainsi, les cellules entéroendocrines du TD, en réponse à la présence ou à l'absence de nutriments dans le TD, libèrent des facteurs qui stimulent l'appétit (facteurs orexigènes) ou qui l'inhibent (facteurs anorexigènes) : ce sont des signaux qui agissent à court terme, à l'échelle du repas (Huda *et al.*, 2006). A l'inverse, les signaux d'adiposité correspondent à des hormones sécrétées proportionnellement à la masse de tissu adipeux, de façon relativement continue, par le tissu adipeux ou par le pancréas et qui interviennent dans la régulation de la prise alimentaire à long terme.

2. Circuits du SNC

L'ensemble de ces facteurs hormonaux qui influencent la prise alimentaire et la dépense énergétique peuvent agir directement dans le SNC ou à la périphérie. En particulier, plusieurs hormones peuvent agir sur l'hypothalamus et le tronc cérébral qui sont des centres de contrôle de l'appétit (**Figure 15**). L'hypothalamus est divisé en noyaux. Parmi ceux-ci, l'ARC est un site d'intégration de signaux nerveux et hormonaux impliqués dans le contrôle alimentaire. L'ARC présenterait une barrière hémato-encéphalique incomplète, le rendant ainsi sensible aux hormones circulantes (Peruzzo *et al.*, 2000 ; Cone *et al.*, 2001). Néanmoins, cette théorie est controversée et l'hypothèse d'une perméabilité sélective a été avancée (Banks 2006). Deux populations de neurones sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire par les facteurs circulants dans l'ARC (Schwartz *et al.*, 2000 ; Cone *et al.*, 2001). La première coexprime les peptides anorexigènes dérivés de POMC (pro-opiomélanocortine) et CART (transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine). La seconde coexprime les peptides orexigènes NPY (neuropeptide Y) et AgRP (*agouti-related peptide*). Ces deux groupes de neurones agissent de telle manière que lorsqu'un groupe est activé, l'autre est inhibé et *vice versa*. Ces neurones projettent vers le noyau paraventriculaire et d'autres régions impliquées dans la régulation de la prise alimentaire (Schwartz *et al.*, 2000). L'hypothalamus est directement connecté au tronc cérébral, particulièrement au NTS. Comme l'ARC, le NTS reçoit directement des signaux hormonaux, de par sa proximité avec d'autres régions présentant une barrière hémato-encéphalique incomplète, comme l'*area postrema*.

Comme nous l'avons vu précédemment, en plus d'une action centrale, les neurones du SNE et les neurones vagues peuvent constituer une cible pour les facteurs hormonaux (**Figure 15**). En effet, le nerf vague représente le lien principal entre le TD et le cerveau, et les neurones afférents vagues transmettent l'information sensitive vers le tronc cérébral qui à son tour projette vers l'hypothalamus ou les centres supérieurs impliqués dans le contrôle alimentaire.

B. Signaux gastro-intestinaux d'appétit et de satiété

1. Appétit

a. La ghréline

La ghréline est la principale hormone du TD ayant des propriétés orexigènes confirmées (**Figure 16**). La ghréline est un peptide de 28 acides aminés qui se lie au récepteur *growth hormone secretagogue* (Kojima *et al.*, 1999). Elle est essentiellement synthétisée par les cellules oxyntiques du fundus gastrique (ou cellules A/X ; Date *et al.*, 2000). Dans des conditions physiologiques, la ghréline a des effets à court terme sur la balance énergétique bien que des effets à long terme suite à des injections chroniques aient été rapportés. En effet, des injections centrales et périphériques de ghréline stimulent la libération de l'hormone de croissance, l'appétit, la prise alimentaire, l'accumulation de graisse et la prise de poids chez l'Homme et chez l'animal (Tschöp *et al.*, 2000 ; Wren *et al.*, 2000 ; Wren *et al.*, 2001b ; Wren *et al.*, 2001a). La concentration plasmatique de ghréline augmente au cours du jeûne, atteint un pic avant chaque prise alimentaire et diminue après (Tschöp *et al.*, 2001 ; Ariyasu *et al.*, 2001 ; Cummings *et al.*, 2002). La ghréline exerce ses fonctions par l'intermédiaire d'une action sur l'hypothalamus (Korbonits *et al.*, 2004). Elle peut activer directement ses récepteurs dans l'ARC soit en passant la barrière hémato-encéphalique si elle est synthétisée par l'estomac et libérée dans la circulation sanguine, soit en activant les neurones NPY et AgRP après sa synthèse dans l'hypothalamus même (Banks *et al.*, 2002 ; Cowley *et al.*, 2003). La ghréline peut également stimuler les afférences vagues projetant vers le NTS qui en retour projette sur l'hypothalamus (Date *et al.*, 2002). Au niveau périphérique, la prise alimentaire est augmentée par la ghréline via son action stimulatrice sur la motricité du TD. En effet, la ghréline augmente la vidange et les sécrétions gastriques via une action sur ses récepteurs vagues et sur ses récepteurs dans le SNE (Masuda *et al.*, 2000 ; Asakawa *et al.*,

2001 ; Dass *et al.*, 2003 ; Edholm *et al.*, 2004). Les neurones afférents vagues et entériques interviennent également dans la capacité de la ghréline à protéger l'estomac de différents stress (Sibilia *et al.*, 2003 ; Brzozowski *et al.*, 2004).

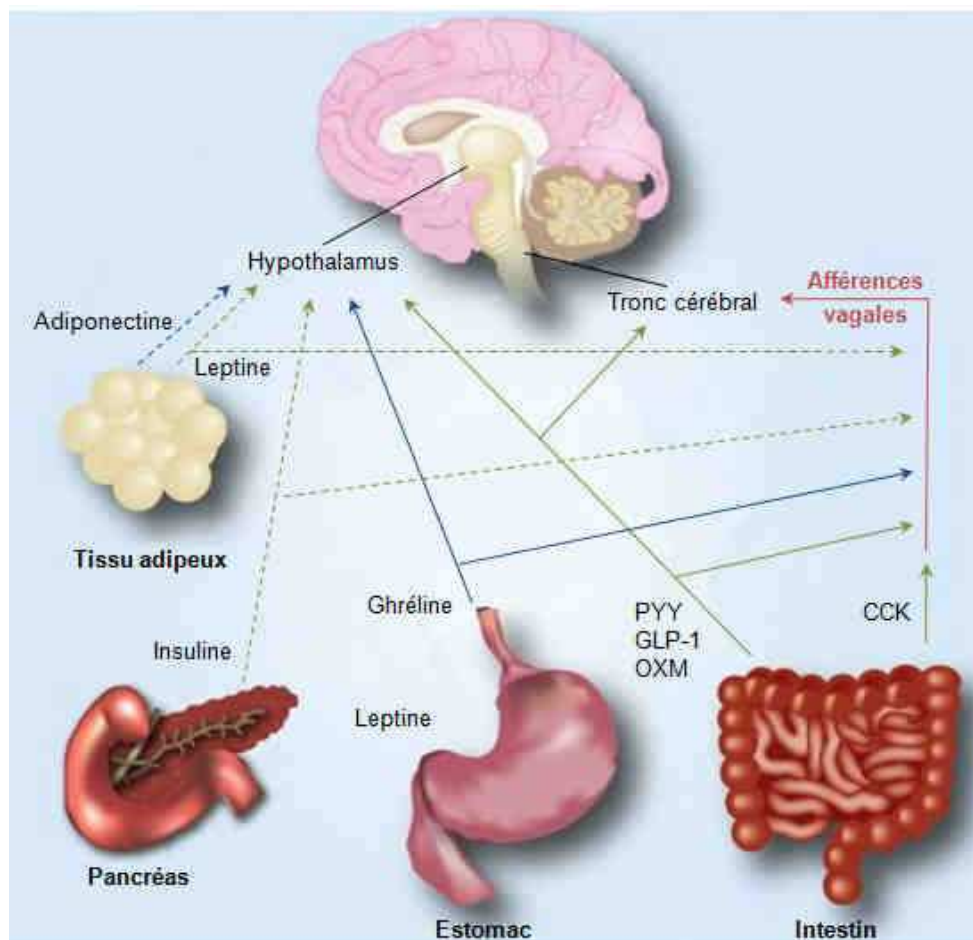


Figure 16 : Contrôle de la prise alimentaire par l'action des hormones sur l'hypothalamus, le tronc cérébral et les afférences vagues. CCK : cholécystokinine, GLP-1 : *glucagon like peptide 1*, OXM : oxyntomoduline, PYY : peptide YY. → signal anorexigène, → signal orexigène, → signal d'adiposité. D'après Salem & Bloom, 2010 ; modifié.

b. La motiline et les orexines

La motiline et les orexines sont d'autres hormones qui semblent impliquées dans une augmentation de la prise alimentaire. La motiline est une hormone synthétisée par le duodénum. Elle présente d'importantes similarités structurales et fonctionnelles avec la ghréline (Folwaczny *et al.*, 2001 ; Chaudhri *et al.*, 2006). Ainsi, son récepteur gastro-intestinal a une haute homologie structurale avec celui de la ghréline. La concentration plasmatique en motiline augmente avant un repas et diminue après la prise alimentaire. La motiline active l'hypothalamus et le SNE et possède des effets centraux et périphériques

comparables à ceux de la ghréline : stimulation de la prise alimentaire et de l'activité motrice du TD.

Les orexines (ou hypocrélines) sont des hormones synthétisées par l'hypothalamus et par des cellules endocrines de l'estomac et de l'intestin (revue dans Kirchgessner, 2002). Les récepteurs des orexines sont localisés tout le long de l'axe cerveau-intestin : dans l'hypothalamus, le NTS, sur les neurones afférents vagues et dans les plexus entériques. Les orexines stimulent ainsi la prise alimentaire ainsi que les sécrétions et la motricité gastrique.

2. Satiété

a. La cholécystokinine

La CCK est la première hormone découverte régulant la prise alimentaire (Gibbs *et al.*, 1973). Elle est libérée dans le sang par les cellules I du duodénum et du jéjunum suite à un repas et plus particulièrement à l'ingestion de lipides et de protéines (**Figure 16** ; Liddle *et al.*, 1985). Des études chez de nombreuses espèces ont montré que la CCK réduisait la prise alimentaire (Kissileff *et al.*, 1981 ; Owyang & Heldsinger, 2011). Dans le TD, elle facilite l'absorption des nutriments en stimulant la contraction de la vésicule biliaire, la sécrétion d'enzymes pancréatiques et en inhibant la vidange gastrique (Liddle *et al.*, 1985 ; Muurahainen *et al.*, 1988). Le mécanisme par lequel la CCK contrôle la prise alimentaire ne fait pas consensus. Ainsi, pour certains auteurs, l'inhibition de la motricité du TD par la CCK, et en particulier l'inhibition de la vidange gastrique, pourrait contribuer à la réduction de la prise alimentaire en augmentant la sensation de satiété. Dans ce cas, la CCK n'aurait pas une action directe sur le SNC mais stimulerait les neurones afférents vagues (Smith *et al.*, 1981 ; Moran & Kinzig, 2004). A l'inverse, des études récentes ont montré que la CCK pouvait inhiber la prise alimentaire en activant les terminaisons vagues dans le NTS (Rogers & Hermann 2008). Dans tous les cas, l'administration chronique et intermittente de CCK chez le rat n'entraîne pas de changement de masse corporelle et l'administration continue provoque une tolérance après 24h (Crawley & Beinfeld, 1983 ; West *et al.*, 1984). La CCK interagit avec d'autres signaux régulant la prise alimentaire : elle inhibe l'effet orexigène de la ghréline et des orexines sur les neurones afférents vagues et elle interagit avec la leptine pour inhiber à court terme la prise alimentaire et à long terme la prise de poids (Burdyga *et al.*, 2003 ; Date *et al.*, 2005 ; Owyang & Heldsinger, 2011). La CCK module également la motricité du TD,

notamment la vidange gastrique, par l'intermédiaire du SNE. En effet, la CCK stimule les neurones entériques en se fixant sur ses récepteurs mais elle joue également un rôle de neurotransmetteur dans le SNE (Grider, 1994 ; Schutte *et al.*, 1997).

b. La famille des *polypeptide proteins-fold*

Le peptide YY appartient à la famille des *polypeptide proteins-fold* comme le NPY et le polypeptide pancréatique. Sa forme principale est la forme (3-36). Elle est synthétisée par les cellules endocrines L de l'iléon et du côlon (**Figure 16** ; Adrian *et al.*, 1985). La sécrétion de ce peptide est stimulée par la prise alimentaire ou par la présence de nutriments dans le TD et induit une sensation de satiété (Pfluger *et al.*, 2007). Le peptide YY traverse la barrière hémato-encéphalique et se lie au récepteur présynaptique Y2 dans l'hypothalamus. Il inhibe ainsi l'expression des neurones NPY entraînant une inhibition de la prise alimentaire (Batterham *et al.*, 2002). En plus de ses effets centraux, il régule la motricité gastro-intestinale par le biais du « frein iléal » : en présence de nutriments dans l'iléon, notamment de lipides, il entraîne un ralentissement de la vidange gastrique et du transit intestinal augmentant ainsi l'efficacité d'absorption (Taylor, 1993 ; Lin *et al.*, 1996). Le peptide YY agit en périphérie via les neurones afférents vagues ou les neurones du SNE (Krantis *et al.*, 1988 ; Koda *et al.*, 2005).

Bien que principalement synthétisé dans le pancréas, le polypeptide pancréatique est également produit dans le TD (Alumets *et al.*, 1978). Sa libération est stimulée par la prise alimentaire, l'hypoglycémie et l'exercice (revue dans Kojima *et al.*, 2007). Son administration centrale et périphérique induit une diminution de la prise alimentaire, de la vidange et des sécrétions gastriques ainsi que du tonus vagal. Ainsi, la libération et l'action du peptide pancréatique sont essentiellement modulées par le nerf vague.

c. Les dérivés du préproglucagon

Le préproglucagon est une prohormone synthétisée dans les îlots pancréatiques, dans les cellules L de la muqueuse intestinale, où elle est colocalisée avec le peptide YY, et dans le SNC, en réponse à l'ingestion de nourriture. Dans le TD et dans le SNC, cette prohormone est

clivée en GLP-1 (*glucagon like peptide-1*), GLP-2 et en oxyntomoduline qui interviennent dans la régulation de la prise alimentaire (**Figure 16** ; Chaudhri *et al.*, 2006).

Le GLP-1 est libéré 5 à 30 minutes après l'ingestion de nutriments (essentiellement glucides et lipides), proportionnellement à l'énergie ingérée et permet de réduire la prise alimentaire chez les animaux et chez l'Homme par l'intermédiaire de mécanismes périphériques et centraux (Huda *et al.*, 2006 ; Woods & D'Alessio, 2008). L'administration centrale de GLP-1 réduit la prise alimentaire via deux mécanismes distincts : le récepteur à GLP-1 dans les noyaux hypothalamiques permet une modulation des circuits caloriques homéostatiques alors que le récepteur dans l'amygdale entraîne des symptômes de stress et de malaise (Larsen *et al.*, 1997 ; Kinzig *et al.*, 2002 ; Kinzig *et al.*, 2003). Une administration chronique entraîne également une perte de poids (Meeran *et al.*, 1999). Le GLP-1 produit en périphérie ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (Kastin *et al.*, 2002). Par conséquent, il ne peut pas se fixer aux récepteurs centraux. La réduction de la prise alimentaire induite par la synthèse ou l'injection dans la circulation sanguine de GLP-1 est donc permise par une action sur le nerf vague (Imeryüz *et al.*, 1997). Le GLP-1 intervient ainsi dans le frein iléal comme le peptide YY : il inhibe la vidange gastrique, le transit du TD et la synthèse d'acide gastrique (Wettergren *et al.*, 1993 ; Näslund *et al.*, 1999). Le GLP-1 intervient également dans le métabolisme du glucose en inhibant la production de glucagon et en stimulant la synthèse d'insuline (Chaudhri *et al.*, 2006).

A l'inverse de celle du GLP-1, l'action du GLP-2 sur la régulation de la prise alimentaire reste controversée (Näslund & Hellström, 2007).

L'oxyntomoduline agit en partie par l'intermédiaire du récepteur à GLP-1 pour moduler la balance énergétique à court et à long terme. En effet, son injection centrale inhibe la prise alimentaire (Dakin *et al.*, 2001). Une injection intraveineuse inhibe la vidange et les sécrétions gastriques via une action vagale et contribue à la sensation de satiété chez l'Homme (Schjoldager *et al.*, 1989). Elle entraîne également une diminution de la concentration plasmatique en ghréline, participant ainsi à une diminution de la prise alimentaire. De plus, son administration chronique induit une perte de masse corporelle et de masse adipeuse, prouvant également son effet sur la dépense énergétique (Huda *et al.*, 2006).

C. Signaux d'adiposité

1. Le pancréas

L'insuline est une hormone peptidique synthétisée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas au cours des repas et en réponse à l'augmentation de la glycémie (**Figure 16**). Son rôle dans la régulation du métabolisme du glucose est bien connu (reuve dans Saltiel & Kahn, 2001). L'insuline intervient également dans le contrôle de la prise alimentaire en tant que signal d'adiposité. En effet, l'injection centrale d'insuline conduit à une diminution de la prise alimentaire et de la masse corporelle (Woods *et al.*, 1979 ; Porte & Woods, 1981 ; Baskin *et al.*, 1999). La concentration plasmatique d'insuline est directement proportionnelle à la masse de tissu adipeux. Ainsi, l'insuline plasmatique traverse la barrière hémato-encéphalique et se fixe à ses récepteurs dans les des aires de contrôle alimentaire comme l'hypothalamus (Schwartz *et al.*, 1992 ; Brüning *et al.*, 2000 ; Woods *et al.*, 2006 ; Mayer & Belsham, 2009). Elle permet donc d'indiquer au cerveau le degré d'adiposité de l'organisme. Dans l'ARC, l'insuline inhibe les neurones NPY et AgRP et stimule les neurones POMC/CART, ce qui conduit à une inhibition de la prise alimentaire. Finalement, l'insuline circulante stimule également les neurones afférents vagues (Blat & Malbert, 2005) afin de générer un signal de satiété vers le cerveau. Ceci pourrait expliquer les modulations de la motricité gastro-intestinale induites par l'hyperglycémie.

2. Le tissu adipeux

En plus de son rôle de stockage énergétique, le tissu adipeux blanc est un organe endocrine qui synthétise des adipokines participant à la régulation énergétique (**Figure 16**). Parmi ces adipokines, la leptine est synthétisée proportionnellement à la masse de tissu adipeux : elle augmente avec la suralimentation et diminue avec le jeûne (Maffei *et al.*, 1995 ; Ahima *et al.*, 1996 ; Friedman & Halaas, 1998). La leptine circulante traverse la barrière hémato-encéphalique et se fixe à l'isoforme longue de son récepteur, notamment dans l'ARC (Owyang & Logsdon, 2004). Elle active les neurones POMC afin de diminuer la prise alimentaire et d'augmenter la dépense énergétique, et en même temps inhibe les neurones NPY/AgRP afin de supprimer l'activité orexigène de ces neuropeptides. A long terme, cela conduit à une inhibition de la prise de poids.

En plus d'une action centrale, la leptine est impliquée dans la régulation périphérique du contrôle du comportement alimentaire. Ainsi, la modulation de la motricité du TD par la leptine (Yarandi *et al.*, 2011), en particulier la diminution de la vidange gastrique et l'augmentation du transit intestinal (Asakawa *et al.*, 1999 ; Kiely *et al.*, 2005), pourrait contribuer à la réduction de la prise alimentaire en augmentant la sensation de satiété par l'intermédiaire des afférences vagues (Gaigé *et al.*, 2002). En effet, le récepteur à la leptine est présent sur une sous-population de neurones afférents vagues chez le chat et la leptine possède des effets stimulateurs ou inhibiteurs sur les mécanorécepteurs vagues intestinaux (Gaigé *et al.*, 2002 ; Gaigé *et al.*, 2003). Ainsi, les signaux de satiété générés par le nerf vague en réponse à l'action de la leptine pourraient transiter par le NTS avant d'être relayés à l'hypothalamus afin de contrôler la prise alimentaire (Owyang & Heldsinger, 2011). Le récepteur à la leptine a également été mis en évidence dans le SNE (Liu *et al.*, 1999). Ainsi, des concentrations importantes de leptine hyperpolarisent les neurones myentériques sensibles au glucose et n'ont pas d'effet ou dépolarisent les autres neurones (Liu *et al.*, 1999). Il a également été montré que la leptine excite les neurones myentériques et sous-muqueux via une action post-synaptique directe (Reichardt *et al.*, 2011). L'action de la leptine sur les neurones périphériques pourrait être soit endocrine via une libération par le tissu adipeux, soit paracrine car la leptine est également synthétisée par les cellules P de l'estomac (Bado *et al.*, 1998 ; Cammisotto *et al.*, 2005).

Dans des conditions pathologiques et en particulier dans l'obésité, il a été montré que le taux de leptine était anormalement élevé et qu'il ne permettait pas la réduction de la prise alimentaire. En effet, les personnes atteintes d'obésité seraient résistantes aux effets de la leptine (revue dans Enriori *et al.*, 2006). L'hypothèse selon laquelle la leptine ne pourrait plus franchir la barrière hémato encéphalique et par conséquent ne pourrait plus atteindre ses cibles dans le cerveau, ainsi que celle proposant une altération de la cascade de signalisation intracellulaire de son récepteur ont été privilégiées.

Le tissu adipeux sécrète d'autres adipokines parmi lesquelles l'adiponectine, la visfatine ou la résistine. Ces hormones interviennent essentiellement dans la régulation de la sensibilité à l'insuline des organes périphériques, dans l'inflammation et dans l'athérosclérose (Wozniak *et al.*, 2009). A l'inverse des autres adipokines, l'adiponectine est libérée dans la circulation sanguine à une concentration inversement proportionnelle à la masse de tissu adipeux. Des études récentes mais controversées ont montré que l'adiponectine, en plus de ses actions périphériques, pouvait franchir la barrière hémato-encéphalique, se fixer à ses

récepteurs dans l'hypothalamus et plus particulièrement dans l'ARC afin d'augmenter la prise alimentaire (**Figure 16** ; revue dans Kadowaki *et al.*, 2006 ; Dridi & Taouis 2009).

D. Interaction entre les signaux à court et à long terme

Le contrôle alimentaire est un mécanisme complexe. Il implique de nombreuses hormones qui sont le plus souvent synthétisées dans différents organes et ont des cibles multiples. Ces hormones génèrent des signaux antagonistes qui nécessitent une régulation précise. C'est le cas à l'échelle de l'hypothalamus où les deux groupes de neurones POMC/CART et NPY/AgRP interagissent pour ne transmettre qu'un seul message anorexigène ou orexigène (**Figure 15**) mais également à l'échelle des fibres afférentes vagues où des récepteurs aux peptides anorexigènes sont colocalisés avec des récepteurs aux peptides orexigènes et exercent des effets antagonistes sur les décharges nerveuses (Date *et al.*, 2002).

Le paradigme de la régulation de la prise alimentaire par des signaux de satiété à court terme et des signaux d'adiposité à long terme a récemment été remis en cause (Cummings & Overduin, 2007 ; Woods & D'Alessio, 2008). En effet, de nouvelles données suggèrent une synergie entre ces signaux dans le TD (**Figure 17**). D'une part, ces signaux peuvent coopérer à l'échelle de la sécrétion de peptides gastro-intestinaux. Par exemple, des récepteurs à la leptine et à l'insuline sont exprimés par les cellules L intestinales et l'activation de ces récepteurs augmente la sécrétion de GLP-1 (Anini & Brubaker, 2003). D'autre part, des interactions entre les signaux de satiété et d'adiposité sont possibles à l'échelle de la sensibilité des afférences vagues aux peptides du TD. Par exemple, il existe une colocalisation des récepteurs à la leptine et à la CCK sur les terminaisons des neurones afférents vagues dans l'estomac et le duodénum. Ces hormones agissent en synergie et potentialisent leurs effets respectifs afin d'augmenter la décharge des neurones afférents vagues et de réduire la prise alimentaire et la masse corporelle (Barrachina *et al.*, 1997 ; Gaigé *et al.*, 2002 ; Gaigé *et al.*, 2003 ; Peters *et al.*, 2006).

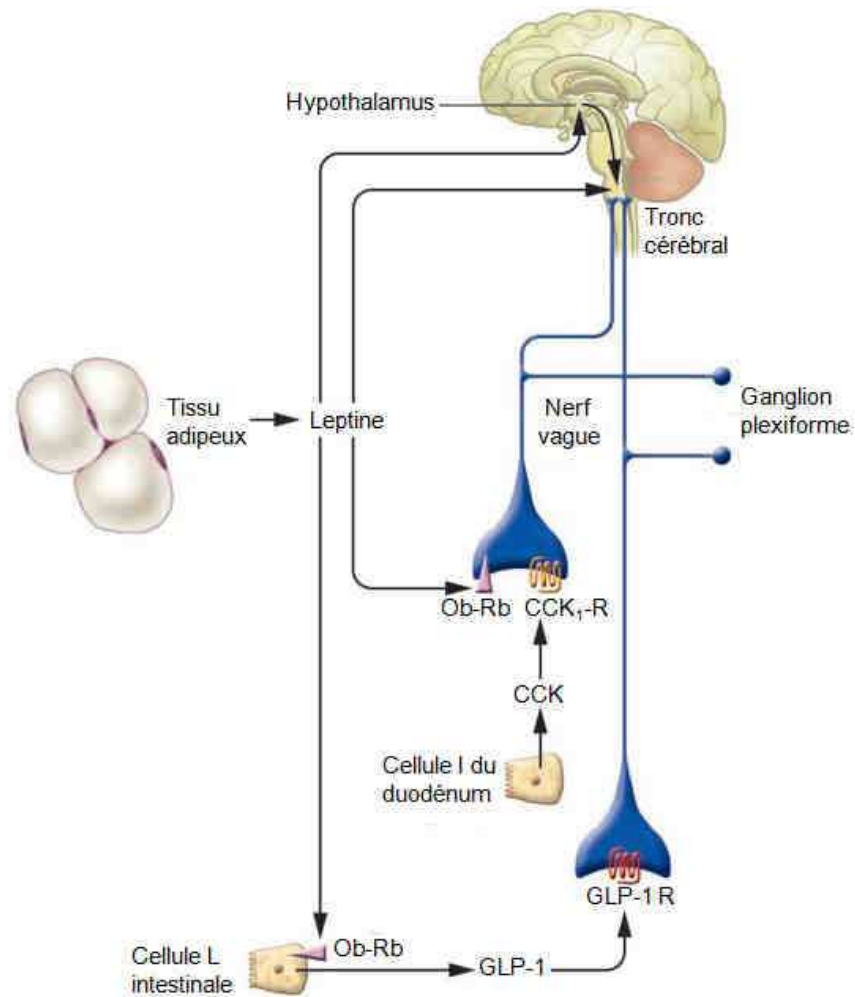


Figure 17 : Sites centraux et périphériques de potentialisation de l'action de facteurs de satiété par la leptine. CCK : cholécystokinine, CCK₁-R : récepteur à la CCK, GLP-1 : *glucagon like peptide* , GLP-1 R : récepteur au GLP-1, Ob-Rb : récepteur à la leptine. D'après Cummings & Overduin, 2007.

L'axe cerveau-intestin constitue le lien entre les processus digestifs et le comportement alimentaire. Par conséquent, il n'est pas surprenant qu'un dysfonctionnement de cet axe soit à la base de la physiopathologie de troubles du comportement alimentaire (anorexie mentale, obésité), métaboliques (hyperglycémie, dyslipidémie - taux de triglycérides élevés et de lipoprotéines à haute densité réduits) mais également de troubles digestifs. A l'heure actuelle, de nouvelles données suggèrent une étroite relation entre une perturbation de l'axe cerveau-intestin et certaines maladies psychiatriques (North *et al.*, 2007 ; Taylor & MacQueen, 2010 ; Wu, 2012).

III. Axe cerveau-intestin et schizophrénie

A. La schizophrénie

1. Prévalence et symptômes

La schizophrénie est une maladie psychiatrique qui touche 1 % de la population mondiale et présente une stabilité à travers les cultures, les pays et les sexes (Tamminga & Holcomb, 2005 ; Ross *et al.*, 2006). Les symptômes de cette maladie sont repérés généralement à la fin de l'adolescence ou au début de l'âge adulte (20-25 ans chez l'homme et 3 à 5 ans plus tard chez la femme) et perdurent tout au long de la vie (Terenius, 2000 ; Freedman, 2003). Ils correspondent à des troubles majeurs des fonctions mentales, des émotions et du comportement et ils perturbent certains des mécanismes impliqués dans la perception et le jugement. D'après la dernière version du Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-IV-TR ; American Psychiatric Association, 2000) les symptômes de la schizophrénie sont classés en deux catégories :

- Les symptômes positifs font référence à des traits qui ne sont pas présents chez l'individu sain mais sont le résultat de la maladie. Ils regroupent les hallucinations (essentiellement auditives), les délires (de grandeur, paranoïdes, d'influence, ...) et les troubles de la pensée.
- Les symptômes négatifs font référence à des traits normalement présents mais qui sont atténués ou absents avec la maladie. Ils comprennent le retrait social, l'apathie (manque de motivation), l'anhédonie (manque de plaisir), l'alogie (perte des capacités de raisonnement) et la persévération comportementale (incapacité à réaliser des changements).

Plus récemment, les symptômes cognitifs de la schizophrénie ont été intégrés dans une troisième catégorie (références dans Tamminga & Holcomb, 2005 ; Meyer & Feldon, 2010). Ils impliquent des troubles dans les fonctions exécutives (planification, organisation, raisonnement logique, ...), l'attention et la mémoire (mémoire de travail, sémantique et épisodique).

2. Facteurs de risques

La schizophrénie résulterait d'une interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux (Howes *et al.*, 2004 ; Harrison & Weinberger, 2005). L'origine génétique de la schizophrénie est admise. En effet, le risque de développer la maladie augmente avec le degré de parenté avec un parent malade (par exemple, le risque passe de 1 à 12% pour un enfant dont un des deux parents est malade ; Tamminga & Holcomb, 2005). A l'heure actuelle, une douzaine de gènes ont été liés à la pathophysiologie de la schizophrénie, mais tous ne sont pas retrouvés dans l'ensemble des analyses génétiques (Harrison & Weinberger, 2005). Bien que les facteurs génétiques représentent 80% des facteurs de risque de la maladie, le risque qu'un individu soit atteint de schizophrénie si son jumeau zygote (c'est-à-dire qui partage 100% de ses gènes) est malade étant de 50% prouve que l'environnement a un rôle déterminant (revue dans Mittal *et al.*, 2008).

Les facteurs environnementaux tiennent une place importante dans la physiopathologie de la schizophrénie (20 % ; revue dans Arnold, 1999 ; McDonald & Murray, 2000). Ainsi, des troubles pré- ou périnataux tels qu'une infection virale de la mère (influenza, toxoplasmose ou herpes) ou encore la malnutrition, peuvent conduire à une hypoxie résultant de complications obstétricales (faible poids à la naissance, prématurité, réanimation, placement en incubateur, rupture prématurée des membranes) et finalement au développement anormal du cerveau. L'existence d'un stress social au cours de l'évolution de l'individu (vie urbaine, modification de la structure familiale, soins parentaux inadaptés, migration) ou l'abus de drogues ont également été impliqués dans l'étiologie de la maladie.

3. Théorie neurodéveloppementale

Le modèle neurodéveloppemental est largement admis pour expliquer la schizophrénie. Dans ce modèle, la pathologie est le résultat comportemental d'une aberration dans les processus neurodéveloppementaux qui débute bien avant l'apparition des symptômes cliniques et qui est causée par l'interaction de facteurs génétiques (prédisposition génétique) et environnementaux à une période périnatale (Tsuang *et al.*, 2001 ; Rapoport *et al.*, 2005). Ces anomalies neurodéveloppementales conduiraient à l'activation de circuits nerveux pathologiques durant l'adolescence ou au début de l'âge adulte et mèneraient à l'émergence des symptômes de la maladie.

L'importance des facteurs neurodéveloppementaux dans la schizophrénie a été confirmée par la mise en évidence d'anomalies dans le cerveau de patients atteints de schizophrénie que ce soit *in vivo* (notamment par imagerie à résonance magnétique) ou *post-mortem*. Ces études ont rapporté une augmentation du volume des ventricules cérébraux, une diminution du volume cérébral et de la substance grise totale ainsi qu'une réduction des volumes du cortex préfrontal (CPF), du système limbique (notamment du cortex temporal de l'hippocampe et de l'amygdale) et du thalamus (**Figure 18** ; revue dans Rajarethinam *et al.*, 2005). L'élargissement du ventricule latéral et la réduction du volume de l'hippocampe pourraient être secondaires à l'hypoxie pré- ou périnatale (références dans McDonald & Murray, 2000). Des altérations dans l'architecture neuronale des structures cérébrales ont été montrées par des analyses microscopiques (Linkowski & Jurysta, 2001). En particulier, le CPF et l'hippocampe présentent une diminution de la taille de leurs neurones sans modification de leur nombre ainsi que des anomalies dans les couches cellulaires de ces régions et l'orientation de leurs neurones suggérant un défaut de migration neuronale (Harrison, 1999). Ces altérations structurales sont déjà présentes chez l'enfant et supposent une altération de la fonction de ces structures à l'âge adulte (Cannon & Murray, 1998).

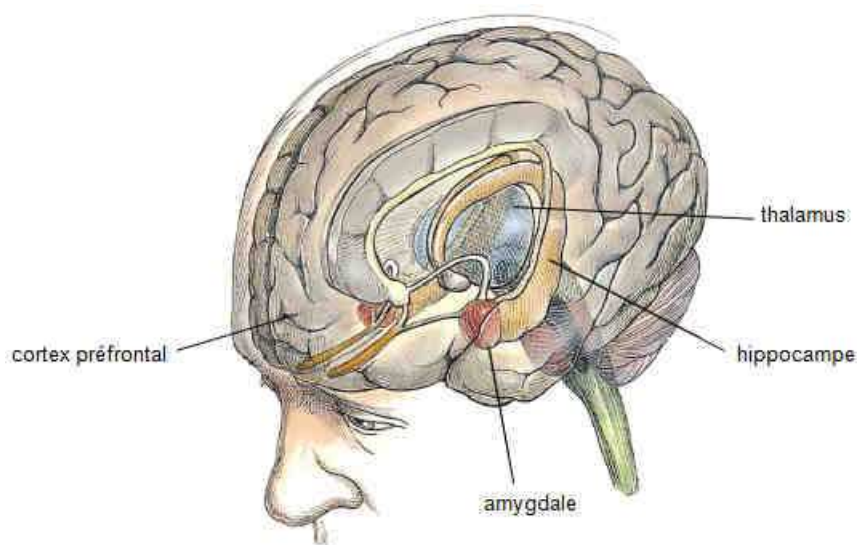


Figure 18 : Régions centrales impliquées dans la schizophrénie. D'après www.eitheory.com ; modifié (consulté le 23.07.12).

Des données cliniques confortent l'hypothèse neurodéveloppementale. En effet, chez les patients atteints de schizophrénie, la phase chronique qui se développe généralement chez les jeunes adultes, est précédée d'une phase prodromique pendant le développement. Ainsi, des symptômes avant-coureurs tels que signes neurologiques mineurs (troubles de l'intégration motrice et sensorielle, de la coordination motrice, présence de mouvements anormaux, anomalies de la latéralisation) et troubles des interactions sociales apparaissent

séquentiellement dès l'enfance, avant l'éclosion du trouble schizophrénique (Gourion *et al.*, 2004). Cependant, de tels troubles chez l'enfant ou l'adolescent sont difficilement diagnostiquables et ne permettent pas l'établissement d'un diagnostic prévisionnel.

Une des hypothèses permettant d'expliquer ce délai d'apparition des symptômes se base sur la perte graduelle de 30-40% des connexions synaptiques du cerveau (*pruning*) par apoptose depuis la naissance jusqu'au milieu de l'adolescence afin d'éliminer les erreurs de connexions. L'aberration périnatale entrainerait la constitution d'un capital neuronal plus faible que la normale ou conduirait à une désorganisation synaptique à l'âge adulte par le biais d'un *pruning* excessif (McGlashan & Hoffman, 2000). Il est également possible que la lésion reste dormante jusqu'à ce que les procédés normaux de maturation du cerveau à l'adolescence conduisent à la mobilisation de circuits qui sont peu développés chez l'enfant.

Les anomalies structurales observées ont pour conséquence des modifications dans les taux de neurotransmetteurs et de récepteurs dans ces structures. Comme la plupart des antipsychotiques sont des antagonistes du récepteur D₂ à la dopamine ou du récepteur NMDA du glutamate, ces neurotransmetteurs ont été particulièrement étudiés. Ainsi, la schizophrénie est associée à un dysfonctionnement du système dopaminergique (hypoactivité dans le CPF et hyperactivité dans le striatum) et à des altérations dans la connectivité des neurones dans le CPF dues à une hypoactivité glutamatergique (Laruelle *et al.*, 2003). D'autres neurotransmetteurs comme la sérotonine et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) sont également impliqués. En effet, des études ont montré qu'un déficit GABAergique dans le CPF et l'hippocampe était associé à la schizophrénie (revue dans Wassef *et al.*, 2003). En particulier, des altérations des transporteurs et des récepteurs au GABA participent au dysfonctionnement des interactions inhibitrices entre GABA et dopamine.

B. Schizophrénie et troubles périphériques

1. Troubles cardiaques, alimentaires et métaboliques

Les individus atteints de schizophrénie ont une espérance de vie 20% inférieure à celle des individus sains (Hennekens *et al.*, 2005). En plus de suicides (près de 50% des patients tentent de se suicider et environ 10% y parviennent ; Meltzer, 1998), de cancers ou de troubles respiratoires et cérébraux, les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité (de 30 à 75%), avec une prévalence deux fois plus élevée que dans la population

générale (Osby *et al.*, 2000 ; Hennekens *et al.*, 2005 ; Van Gaal 2006). Les principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires incluent des facteurs fixes comme l'âge, le sexe, l'historique familial, mais également des facteurs de risque comme l'hygiène de vie et le comportement alimentaire (Thakore, 2004).

Les patients atteints de schizophrénie consomment peu de fibres (fruits ou légumes) mais de nombreux aliments riches en sucres et en lipides (Peet, 2004). Ce comportement alimentaire, associé à une activité physique réduite et à la prise d'antipsychotiques, conduit à la prise de poids et au développement de l'obésité. Ainsi, les patients atteints de schizophrénie ont un risque au moins deux fois plus élevé de développer une obésité (Panariello *et al.*, 2011). L'obésité associée à une hypertension, une hyperglycémie et/ou une dyslipidémie caractérise le syndrome métabolique. De manière générale, les patients souffrant de schizophrénie ont un risque accru de développer ces symptômes. Par conséquent, l'occurrence du syndrome métabolique est quatre fois plus élevée chez ces patients que dans la population générale (Van Gaal, 2006 ; Hanssens *et al.*, 2008).

Il semblerait que la preuve de l'existence d'une relation étroite entre les maladies mentales sévères telles que la schizophrénie et les troubles métaboliques trouve ses origines avant l'introduction des antipsychotiques (Bou Khalil, 2011). Cependant, bien que certaines études ont montré que le risque de développer une obésité ou des troubles métaboliques était indépendant de la prise d'un traitement médical, d'autres ont avancé des preuves du contraire. De la même manière, les données concernant les modifications du profil hormonal chez les malades et l'impact des antipsychotiques sur ce facteur sont contradictoires (Atmaca *et al.*, 2003a ; Atmaca *et al.*, 2003b ; Jow *et al.*, 2006 ; Cohen, 2007 ; Guest *et al.*, 2010 ; Tsai *et al.*, 2011 ; Guest *et al.*, 2011). Deux consensus en 2004 aux Etats-Unis et en Australie ont conclu que les données n'étaient pas suffisantes pour déterminer si le syndrome métabolique était une conséquence de la schizophrénie ou du traitement avec des antipsychotiques (Lambert & Chapman, 2004 ; Clark, 2004). Depuis 2004, plusieurs arguments tendent à montrer que la schizophrénie et le syndrome métabolique sont à l'intersection de plusieurs facteurs qui dépassent l'administration d'antipsychotiques même si l'importance de ces facteurs sans traitement fait toujours débat (Thakore, 2004 ; Van Gaal, 2006 ; Spelman *et al.*, 2007 ; Venkatasubramanian *et al.*, 2007 ; Sengupta *et al.*, 2008 ; Verma *et al.*, 2009 ; Padmavati *et al.*, 2010 ; Bou Khalil, 2011).

2. Troubles des fonctions intestinales

Il existe une corrélation entre les pathologies du TD et les troubles psychiatriques tels que l'autisme, la dépression ou la maladie de Parkinson (North *et al.*, 2007 ; Ibrahim *et al.*, 2009 ; Jost, 2010). Cependant, il est difficile de différencier les causes des conséquences et l'impact des antipsychotiques sur les symptômes gastro-intestinaux (Severance *et al.*, 2012). Bien que les données soient peu nombreuses, un lien a pu être établi entre la schizophrénie et les troubles digestifs. L'ensemble de ces données suppose l'existence de dommages structuraux du TD des patients atteints de schizophrénie. Ainsi, des autopsies réalisées chez 82 malades ont montré que 50% présentaient une gastrite, 88% une entérite et 92% une colite (Buscaino, 1953). L'existence de troubles digestifs fonctionnels (Gupta *et al.*, 1997) et d'une inflammation gastro-intestinale en présence et en absence d'antipsychotiques a été confirmée *in vivo* (Severance *et al.*, 2012). La maladie céliaque et les ulcères gastro-intestinaux ont également été mis en évidence chez ces patients (Eaton, 2004 ; Ozdemir *et al.*, 2007). Finalement, des troubles de la motricité gastrique apparaissent chez des patients atteints de schizophrénie mais non traités et semblent être corrélés aux troubles psychiatriques (Peupelmann *et al.*, 2009a). Ces troubles des fonctions gastro-intestinales pourraient résulter d'altérations du fonctionnement du SNE (Peupelmann *et al.*, 2009a).

C. Modèle heuristique de schizophrénie

1. Modèles animaux de schizophrénie

Les modèles animaux sont importants pour déterminer les mécanismes à l'origine des pathologies humaines et pour mettre en place de nouvelles thérapies. De nombreux modèles animaux de schizophrénie ont été mis au point au cours de ces trente dernières années (**Figure 19**). Les premiers modèles étaient des modèles pharmacologiques basés essentiellement sur les perturbations du système dopaminergique. Bien que le système dopaminergique soit impliqué dans la schizophrénie et que les modèles animaux basés sur cette idée soient importants pour permettre le développement d'antipsychotiques antagonistes de la dopamine, ce modèle pharmacologique a des limites. Ainsi, un modèle heuristique (c'est-à-dire « qui sert à découvrir des faits et des théories ») doit manifester les anomalies observées dans la schizophrénie en plus de celles qui sont directement manipulées. Par exemple, un modèle basé sur une altération de l'hippocampe serait heuristique s'il montrait

les changements comportementaux et moléculaires hors de l'hippocampe qui sont associés à la schizophrénie, s'il permettait de tester les mécanismes qui induisent ces changements et s'il permettait de mettre en place de nouvelles thérapies basées sur la découverte de ces mécanismes (Lipska & Weinberger, 2000).

ANIMAL PREPARATION		PHENOTYPES ASSESSED					
#	DEVELOPMENTAL PREPARATIONS	DA-related behavior	Gating	Cognitive Behavior	Social Behavior	Molecular/Morphological Signature	Response to APD
10	Rat Prenatal Variable Stress (Kinnunen, 2003; Koenig, 2005; Lee et al., 2007)	Increased response to amphetamine and PCP with post-pubertal onset	Disrupted PPI and N40	Impaired object and social recognition	Impaired social interaction present in adolescent and adult rats; reversal by oxytocin; no effect of cross-fostering	NMDA, GABAergic and presynaptic protein dysregulation	Social interaction deficit not improved by haloperidol.
DRUG-INDUCED PREPARATIONS							
19	NMDA Receptor Antagonist RX (MK801, PCP, Ketamine)-Acute (Jentsch and Roth, 1999)	Increases locomotor activity and stereotypy, ataxia	Disrupted PPI 1 day after PCP, and 15 minutes after PCP, but not 7 or 28 days	Decreased working memory, disrupted fear conditioning, long-term spatial	Impaired social interaction	Impaired LTP; decreased AMPA receptor density	Enhanced locomotor responses blocked by APD, glycine transporter-1
GENETIC PREPARATIONS							
40	Dopamine Transporter KO (Szelewoy et al., 2000; Ralph et al., 2001; Trinh, 2003; Rodriguez, 2004; Morice, 2007; Weiss et al., 2007)	Increased DA and decreased D1R, D2R, hyperactive	Disrupted PPI	Impaired adaption to environmental changes in Morris water maze	Impaired social behavior	Decreased LTD in hippocampus	More aggressive; impairments in Morris water maze reversed by haloperidol and acute nicotine treatment; LTD reversed by haloperidol
LESION PREPARATIONS							
64	Neonatal Amygdalar Lesion (Daenen, 2002; Daenen, 2003; Hanlon, 2000; Weiner, 2003; Diergaarde et al., 2005; Bouwmeester et al., 2007)	Enhanced amphetamine or apomorphine-induced locomotion	Increase acoustic startle response but impair PPI on animals lesioned on PND 7 but not PND 21; abnormally persistent latent inhibition	Impaired place navigation and spatial ability (not found by all studies); impaired spatial alternation and food hoarding	Social behaviors diminished in animals lesioned on PND 7 but not 21 but ventral HPC lesions did not affect social behavior	Increased lateral ventricular volume; reduced density of D1- and D2-like but not D3-like receptors and increased DA turnover in mesolimbic but not striatal regions	

Figure 19 : Illustration de la base de données des modèles animaux de schizophrénie disponible sur <http://www.schizophreniaforum.org/res/models/default.asp> (Schizophrenia Research Forum, dernière actualisation le 09 avril 2009 ; modifié).

2. Le modèle de lésion néonatale de l'hippocampe ventral

Le modèle animal heuristique de la schizophrénie le mieux caractérisé à l'heure actuelle est le modèle de lésion néonatale de l'hippocampe ventral (NVHL pour *neonatal ventral hippocampal lesion* - revues dans Lipska & Weinberger, 2000 ; Lipska, 2004 ; Tseng et al., 2009). Ce modèle a été conçu par Lipska, Weinberger et leurs collègues au début des années 1990. Il est basé sur les données montrant un élargissement du ventricule latéral accompagné d'une altération de l'anatomie et de la biochimie de l'hippocampe dans le cerveau des patients atteints de schizophrénie. Cette altération périnatale de l'hippocampe perturberait le développement des circuits corticaux (notamment le CPF) et sous-corticaux auquel participe l'hippocampe (**Figure 18**). A partir de ces données, les auteurs ont réalisé des lésions néonatales chez le rat dans la région de l'hippocampe qui projette directement vers le

CPF, c'est-à-dire l'hippocampe ventral. Cette région correspond à l'hippocampe antérieur chez l'Homme et présente des anomalies anatomiques en cas de schizophrénie, même si celles-ci sont bien moindres que celles qui sont provoquées dans le modèle.

En tant que modèle neurodéveloppemental heuristique, le modèle NVHL induit des modifications comportementales, physiologiques et moléculaires comparables à celles de la schizophrénie, qui se manifestent bien après la lésion, aux alentours de l'adolescence ou au début de l'âge adulte (revues dans Lipska & Weinberger, 2000 ; Lipska 2004 ; Tseng *et al.*, 2009 ; **Figure 20**). Ainsi, les rats NVHL présentent :

- une hyperactivité locomotrice induite par le stress, certains stimulants provoquant un efflux de dopamine (amphétamine, cocaïne), des agonistes du récepteur D2 de la dopamine (apomorphine) et les antagonistes du récepteur NMDA du glutamate (MK-801 et phencyclidine).
- des déficits de l'inhibition par pré-pulse (un stimulus acoustique faible diminue la réponse réflexe de sursaut produit par le second stimulus plus intense) et de l'inhibition latente (affaiblissement d'un conditionnement, quand le stimulus conditionné est préalablement présenté seul). Cela représente un trouble du filtrage sensorimoteur chez les patients atteints de schizophrénie.
- des déficits des comportements sociaux et des problèmes d'apprentissage spatial et de mémoire de travail.

D'autre part, des altérations neurobiologiques chez les rats NVHL ont été rapportées, notamment des dérèglements des circuits du CPF et de structures sous-corticales (par exemple noyau accumbens) associés à des perturbations dans le développement des interactions dopamine-glutamate-GABA (revue dans Ollat, 2002 ; Lipska, 2004 ; Tseng *et al.*, 2009).

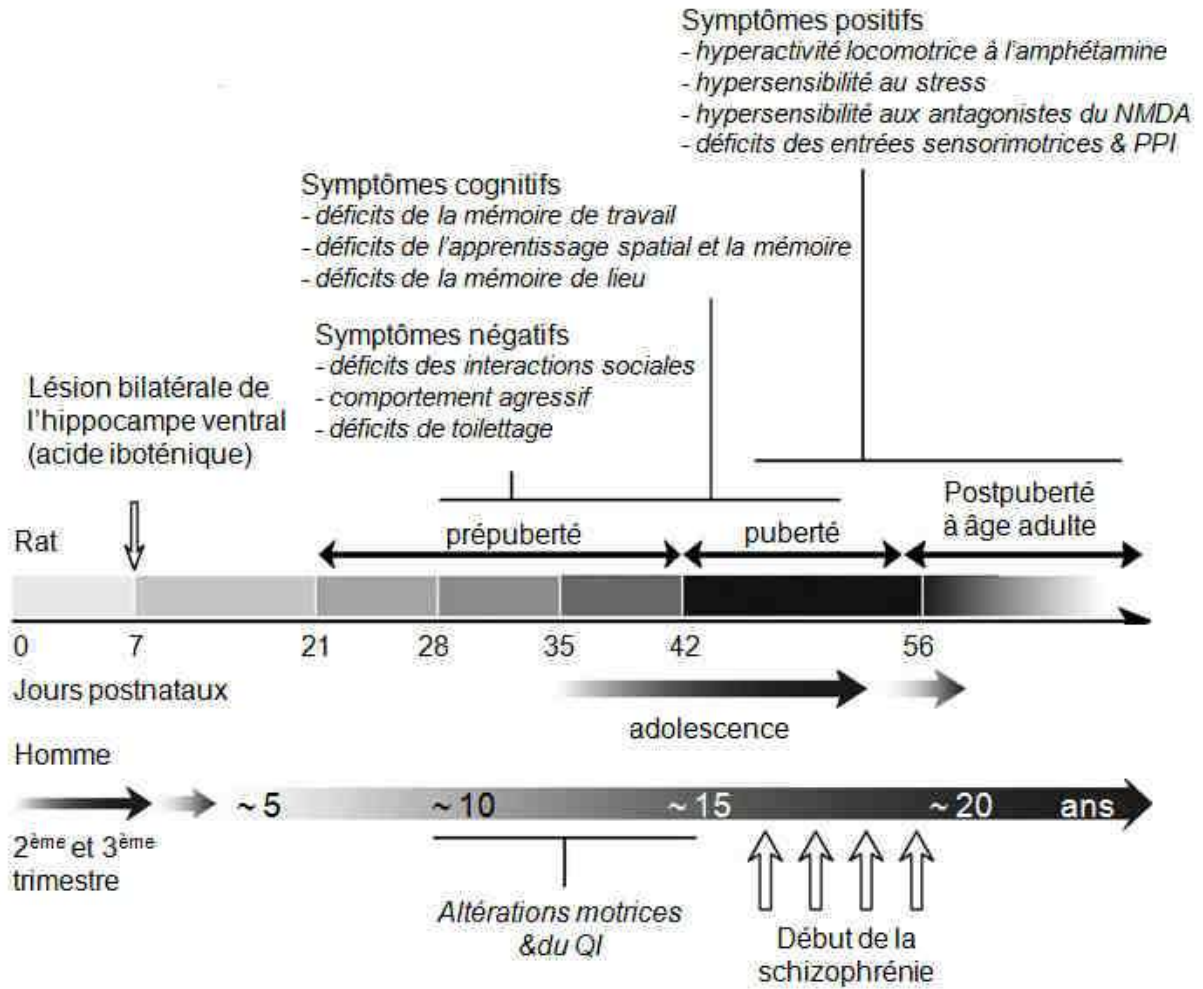


Figure 20 : Chronologie des changements comportementaux après une lésion néonatale de l'hippocampe ventral chez le rat en comparaison de l'émergence des symptômes de la schizophrénie chez l'Homme. D'après Tseng *et al.*, 2009.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'axe cerveau-intestin désigne l'interaction permanente entre le cerveau et le TD, et plus particulièrement le SNE, via le SNA sympathique et parasympathique. Il assure ainsi le contrôle des fonctions physiologiques gastro-intestinales. Son activité peut également être modulée par de nombreux facteurs, notamment les hormones du TD, du pancréas et du tissu adipeux afin d'assurer le maintien de la balance énergétique et en particulier la régulation de la prise alimentaire. Par conséquent, des altérations de l'axe cerveau-intestin peuvent entraîner à la fois à des perturbations des fonctions digestives mais également de la prise alimentaire et peuvent finalement conduire à des pathologies telles que l'obésité.

La leptine est une hormone peptidique essentiellement synthétisée par les adipocytes, proportionnellement à la masse de tissu adipeux blanc, mais également par l'estomac. Elle possède une action anorexigène. Ainsi, elle diminue la prise alimentaire en se fixant sur l'hypothalamus où elle stimule les neurones POMC/CART et en même temps inhibe les neurones NPY/AgRP. Elle participe aussi à la régulation périphérique du contrôle alimentaire. En effet, elle contribue à l'augmentation de la sensation de satiété en se fixant sur les afférences vagues et en modulant la vidange gastrique et le transit intestinal. Finalement, la leptine participe au contrôle de l'axe cerveau-intestin via une action sur les neurones entériques. En effet, son récepteur a été mis en évidence dans le plexus myentérique. De plus, il a été montré que la leptine stimule l'activité des neurones myentériques et sous-muqueux. Néanmoins, son mode d'action et la nature des neurones impliqués dans le SNE ne sont pas connus.

La schizophrénie est une pathologie psychiatrique qui se manifeste par des troubles cognitifs, sociaux et comportementaux au début de l'âge adulte. Les facteurs environnementaux, associés à une prédisposition génétique, interfèrent avec le développement et la maturation de certaines structures cérébrales. Ces anomalies structurales entraînent des modifications dans la neurotransmission, notamment celle impliquant le GABA. La schizophrénie a également été associée à une altération du fonctionnement de l'axe cerveau-intestin, ce qui conduit à des troubles alimentaires, métaboliques et digestifs et finalement à une réduction de l'espérance de vie des patients. Néanmoins, le développement de ces troubles chez les malades indépendamment de la prise d'antipsychotiques est contesté. Finalement, pour déterminer les mécanismes à l'origine de la schizophrénie et les troubles associés ainsi que pour mettre en place de nouvelles thérapies, les modèles animaux sont particulièrement importants.

Par conséquent, les objectifs de ce travail portaient sur deux axes. Tout d'abord, il s'agissait d'évaluer le rôle *ex vivo* de la leptine sur les neurones entériques chez le rat. Les mécanismes d'action impliqués ont également été étudiés. Dans un deuxième temps, les substances circulantes impliquées dans la prise alimentaire ainsi que les propriétés structurales et fonctionnelles du TD ont été évaluées dans un modèle neurodéveloppemental animal de schizophrénie (NVHL).

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

Chapitre I

Effets modulateurs de la leptine sur la neurotransmission dans le système nerveux entérique chez le rat

I. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, la leptine est une hormone (adipokine) essentiellement synthétisée par le tissu adipeux blanc qui intervient dans la régulation du métabolisme et de la balance énergétique (Zhang *et al.*, 1994 ; Pelleymounter *et al.*, 1995 ; Barbier *et al.*, 2000), notamment via une action sur l'hypothalamus (Lee *et al.*, 1996 ; Tartaglia, 1997). Elle joue également un rôle dans les fonctions périphériques et plus particulièrement gastro-intestinales. En effet, la leptine synthétisée par l'estomac (Bado *et al.*, 1998 ; Cammisotto *et al.*, 2005) est libérée dans la lumière digestive et se fixe aux isoformes de son récepteur, localisées principalement sur les entérocytes et les colonocytes (Barrenetxe *et al.*, 2002 ; Aparicio *et al.*, 2005 ; Hansen *et al.*, 2008). De cette manière, elle module l'absorption des nutriments, la croissance et les défenses immunitaires du TD. A l'heure actuelle, on sait qu'elle intervient également dans la régulation de la motricité digestive, notamment via les neurones afférents vagues. Ainsi, la leptine stimule la motricité intestinale par une action excitatrice et inhibitrice sur les mécanorécepteurs vagues (Wang *et al.*, 1997 ; Gaigé *et al.*, 2002 ; Gaigé *et al.*, 2003). Des récepteurs à la leptine ayant également été mis en évidence dans le SNE des rongeurs (références dans Sitaraman *et al.*, 2004), ses effets sur les fonctions intestinales pourraient également résulter de la modulation du SNE. Ainsi, des concentrations importantes en leptine hyperpolarisent les neurones myentériques sensibles au glucose et n'ont pas d'effet ou dépolarisent les autres neurones (Liu *et al.*, 1999). Il a également été montré que la leptine excite certains neurones myentériques et sous-muqueux (Reichardt *et al.*, 2011). Néanmoins, les mécanismes d'action précis de la leptine sur les neurones entériques ne sont pas connus.

Par conséquent, les objectifs de cette étude étaient de déterminer les effets de la leptine *ex vivo* sur les neurones entériques chez le rat mais également de caractériser ses mécanismes d'action. Nous nous sommes principalement intéressés à ses effets sur les neurones cholinergiques, nitrergiques et sensibles à la capsazepine, principaux neurones impliqués dans la neurotransmission dans le SNE (Serio *et al.*, 2003 ; Furness *et al.*, 2004 ; Harrington *et al.*, 2010).

II. Technique de l'organe isolé

La technique de l'organe isolé est utilisée afin de maintenir l'intégrité d'un tissu *ex vivo* pendant plusieurs heures, dans un environnement contrôlé et d'étudier sa physiologie.

Immédiatement après euthanasie, le jéjunum et le côlon proximal de rats mâles de souche Wistar sont placés dans une solution physiologique dite de « Krebs » (en mM: 119,8 NaCl, 16,2 C₆H₁₂O₆, 15,5 NaHCO₃, 5,8 KCl, 2,5 CaCl₂.H₂O, 2,0 NaH₂PO₄.H₂O, 1,2 MgCl₂.H₂O, pH 7,4) à 4° C et oxygénée par l'intermédiaire de carbogène (95% O₂/5% CO₂). Des fragments de tissus sont ensuite disséqués : des fragments d'environ 1cm de jéjunum sont ouverts et placés dans les cuves à organe isolé de telle façon que l'activité motrice enregistrée soit l'activité du muscle lisse longitudinal alors que des anneaux musculaires de côlon (3mm d'épaisseur) sont disséqués afin d'enregistrer l'activité du muscle circulaire (**Figure 21**).

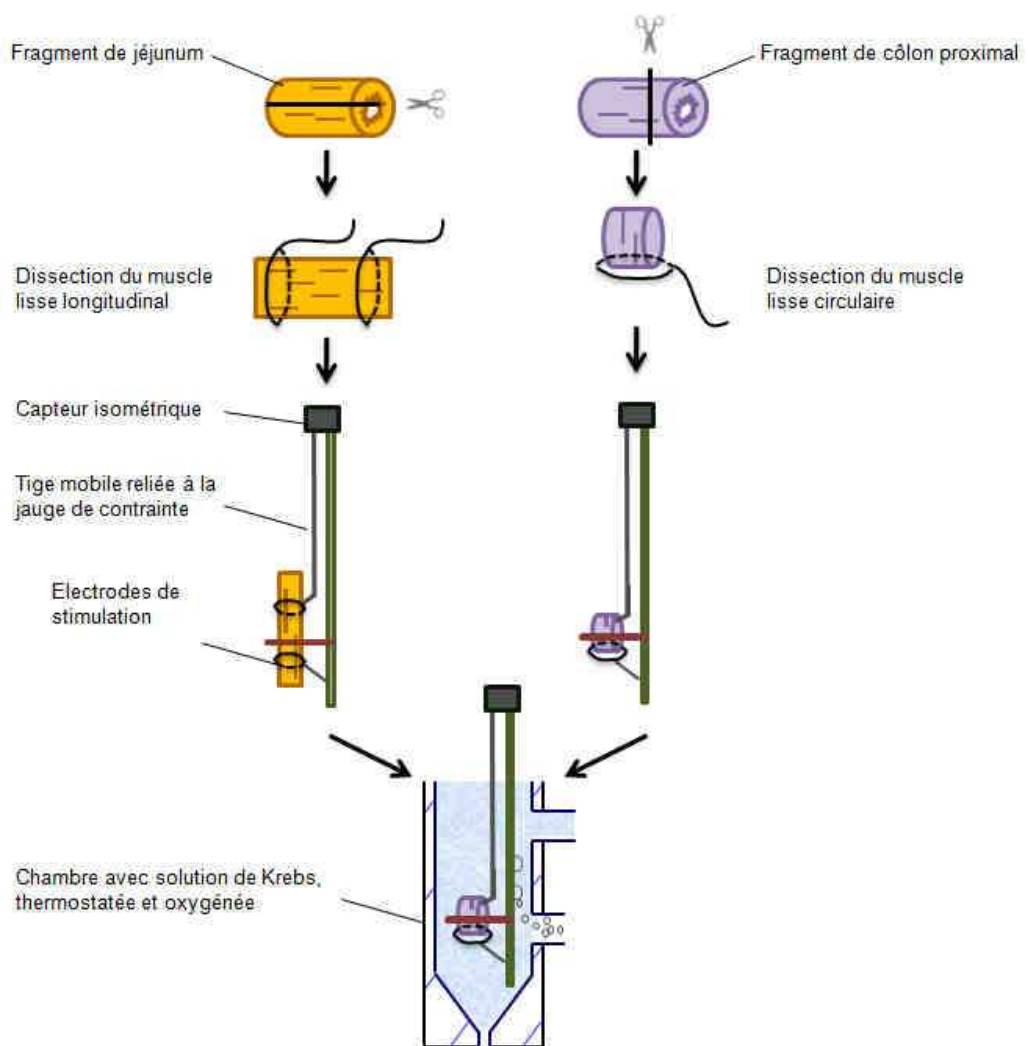


Figure 21 : Dissection et mise en place des prélèvements de muscles lisses longitudinal de jéjunum et circulaire de côlon proximal.

Le fragment musculaire est accroché d'une part à un anneau fixe placé dans la partie basse de la chambre et d'autre part à la jauge de contrainte via une tige mobile. L'ensemble est plongé dans la chambre qui contient 10 mL de solution de Krebs à 37,5°C et continuellement oxygénée. Un mécanisme de vidange permet le renouvellement de la solution dans la cuve. Les activités contractiles de l'organe sont enregistrées avec un capteur isométrique relié à une interface électronique délivrant le signal à un ordinateur et permettant leur visualisation et leur enregistrement (**Figure 22**). Les cuves sont équipées de deux électrodes de stimulation en argent, localisées de part et d'autre du tissu et reliées à un stimulateur délivrant des impulsions électriques rectangulaires d'amplitude 15 V, de fréquence 10 Hz et de durée 200 μ s. Cette stimulation est appliquée pendant 10 s et permet la stimulation spécifique des fibres nerveuses intramurales qui modulent l'activité motrice du lambeau musculaire.

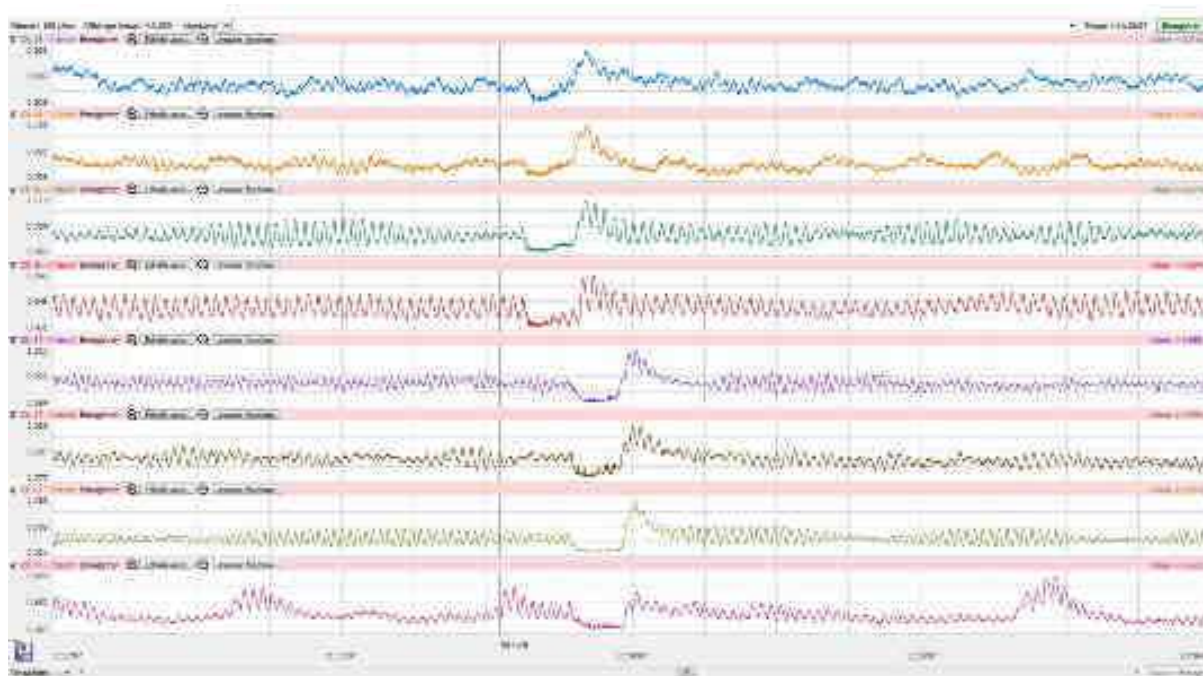


Figure 22 : Exemple de tracé visualisé sur ordinateur.

Après leur fixation dans la cuve, les lambeaux musculaires sont étirés progressivement jusqu'à un niveau basal (tonus) favorisant les réponses optimales à la neurostimulation (NS) et l'apparition d'une activité spontanée régulière (**Figure 22**). Cette étape permet de vérifier l'activité des neurones intrinsèques. Les agents pharmacologiques dont on veut étudier l'action sont laissés au contact des tissus pendant 10 minutes avant l'addition de la leptine. Après chaque protocole, on procède régulièrement à la vidange des cuves afin de s'assurer du retour à une réponse à la NS et à une activité mécanique spontanée identiques aux conditions témoins, avant de passer au protocole suivant.

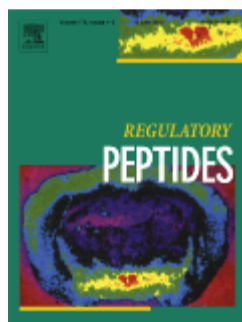
III. Article de recherche A

**LEPTIN MODULATES ENTERIC NEUROTRANSMISSION IN
THE RAT PROXIMAL COLON: AN *IN VITRO* STUDY**

Florian Voinot, Caroline Fisher, Francis Crenner, Camille Schmidt and Fabielle Angel

Université de Strasbourg, IPHC, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France.

CNRS, UMR7178, 67037 Strasbourg, France.



In revision in *Regulatory Peptides*

Abstract

Leptin has been shown to modulate gastrointestinal functions including nutrient absorption, growth, inflammation and to display complex effects on gut motility. Leptin receptors have also been identified within the enteric nervous system (ENS), which plays a crucial role in digestive functions. Although leptin has recently been shown to activate neurons in the ENS, the precise mechanisms involved are so far unknown. Therefore, the aim of the present study was to determine the effects of leptin on rat proximal colon smooth muscle and enteric neurons activities. The effects of exogenous leptin on tone and on responses to transmural nerve stimulation (TNS) of isolated circular smooth muscle of proximal colon in rats were investigated using an organ bath technique. The effects of a physiological concentration (0.1 μM) of leptin were also studied on tone and TNS-induced relaxation in the presence of atropine, hexamethonium, L-N^G-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) and capsazepine. Leptin caused a slight but significant decrease in tone, TNS-induced relaxation and contraction in a dose-dependent manner in colonic preparations. Cholinergic antagonists abolished the effects of 0.1 μM leptin on TNS-induced relaxation. This concentration of leptin had no further effect on relaxation in the presence of L-NAME. In the presence of capsazepine, leptin had no further effect either on tone or relaxation compared to the drug alone. In conclusion, leptin modulates the activity of enteric inhibitory and excitatory neurons in proximal colon. These effects may be mediated through nitrergic neurons. Intrinsic primary afferent neurons may be involved.

Keywords

adipokines; enteric nervous system; nitrergic neurons; cholinergic neurons ; IPANs ; gut

Abbreviation

ACh: acetylcholine; C: contraction; CCK: cholecystokinin; CMPC: circular muscle from proximal colon; ENS: enteric nervous system; GI: gastrointestinal; IPANs: intrinsic primary afferent neurons; L-NAME: L-NG-Nitroarginine methyl ester; NO: nitric oxide; NOS: nitric oxide synthase; R: relaxation; TNS: transmural nerve stimulation.

A. Introduction

White adipose tissue, apart from its role in energy storage, is a target for various hormones and is an active endocrine organ producing adipokines. These substances are polypeptides acting on various tissues and organs (including muscles, liver and hypothalamus) and they are involved in the physiopathology of metabolic regulations such as energy homeostasis, glucose and lipid metabolism, blood pressure regulation, immune functions and inflammation [1–4].

Leptin was the first adipokine that has been shown to be involved in the regulation of metabolism [5, 6], food intake and energy balance [7]. Indeed, it acts as a sensor of fat mass in part of a negative feedback loop that maintains a set point for body fat stores [8]. Leptin is a 16 kDa non-glycosylated peptide hormone encoded by the gene *obese (ob)* [5]. It is predominantly produced by mature adipocytes but is also produced in other organs such as the stomach, placenta, skeletal muscle, mammary epithelium [9–12]. The plasmatic levels of leptin are highly correlated with the mass of visceral adipose tissue [13, 14]. Leptin exerts its biological action in the brain through the activation of its receptor in the hypothalamus [15, 16]. Because of the ubiquitous tissue distribution of its receptor, leptin plays also a role in several peripheral tissues, including skeletal muscle, liver, adipose tissue and intestine [17, 18].

Within the gastrointestinal (GI) tract, the epithelium of the stomach is the major source of leptin [11, 19]. Both endocrine and exocrine cells produce leptin. Leptin secreted in the gastric lumen remains stable despite the acidic environment and reaches the intestine in an active form. Leptin receptor isoforms have been found in the digestive tract from duodenum to colon, mainly in the basolateral membrane but also on the luminal border of enterocytes and colonocytes [20–22]. The presence of leptin receptors along the GI tract suggests that leptin may be involved in diverse functions [23]. Thus, leptin has been shown to modulate GI nutrient absorption, growth and inflammation [24]. Moreover, leptin is known to display complex effects on motility of the GI tract [24]. Leptin-deficient mice, which exhibit metabolic disturbances similar to obesity, showed an increase in gastric emptying and proximal intestinal transit but a decrease in overall intestinal transit [25, 26]. This effect of leptin on GI motility may be explained by the presence of leptin receptors on vagal afferent neurons which transmit information to the central nervous system and then provide in return parasympathetic control for most visceral organs [27, 28]. Moreover, leptin has been shown to

cause excitatory and inhibitory effects on intestinal vagal mechanoreceptors and to stimulate intestinal motility in presence of cholecystokinin (CCK) in cats [29, 30].

The enteric nervous system (ENS) plays a crucial role in regulating digestive functions including motility and nutrient absorption. Because leptin receptors have been found in the antral and intestinal ENS of rodents, the effects of leptin on gut motility and nutrient absorption might be due to modulation of ENS activities [31, 32]. Thus, leptin was shown to hyperpolarize glucoresponsive enteric neurons in guinea-pig [31] and recently to activate colonic submucous and myenteric plexus [33]. However, the precise mechanisms involved are so far unknown.

Therefore, the aim of the present study was to decipher the effects of leptin on rat colonic enteric neurons activities, as well as to pharmacologically characterize leptin mechanisms of action. Emphasis will lie on nitrergic, cholinergic and capsazepine-sensitive neurons which have been shown to be principally involved in transmission within the ENS [28, 34, 35].

B. Materials and methods

1. Animals and technique

Male Wistar rats (Charles River Laboratories, Lyon, France) were housed two per cage in a controlled environment at an ambient temperature of 24 ± 2 °C and under a 12 h light/dark cycle (lights on 07.00 am). They had *ad libitum* access to food (standard low-fat diet A03, SAFE, Augy, France) and tap water. The day of experiment, rats (300-500 g) were anaesthetized with isoflurane 2% (Centravet, Nancy, France) and were killed by decapitation. The proximal colon was immediately removed and immersed in a Petri dish containing a chilled physiological Krebs solution (in mM: 119.8 NaCl, 16.2 C₆H₁₂O₆, 15.5 NaHCO₃, 5.8 KCl, 2.5 CaCl₂.H₂O, 2.0 NaH₂PO₄.H₂O, 1.2 MgCl₂.H₂O, pH 7.4) oxygenated with 95% O₂/5% CO₂. Then, 8 strips of circular muscle (3 mm) were dissected from proximal colon (CMPC), rinsed of intraluminal content and mounted in organ bath chambers containing 10 ml of warmed (37 °C) and gassed (95% O₂/5% CO₂) Krebs solution. CMPC mechanical activities were measured by means of an isometric force transducer (Fort25, WPI, Aston, UK) and amplifier (Lab-Trax-4/24T, WPI, Aston, UK) and were visualized using computer (HP Compaq 8000, Hewlett-Packard, USA). Transmural nerve stimulation (TNS) was applied

via two steel electrodes, placed 10 mm apart from the tissue. Square wave pulses of 15 V intensity, 10 Hz frequency and 200 μ s pulse duration, during 10 s period of time, were used (stimulator designed by the Metrology and Instrumentation in Biology and Environment (MIBE) department, IPHC, CNRS, Strasbourg, France).

Animal care was provided according to protocols and guidelines approved by the local Animal Care and Ethic Committees (CREMEAS #AL/06/25/12/09).

2. Experimental design

At the beginning of the experiment, each muscle strip was stretched incrementally to its optimal length, until the spontaneous contractile activity (basal tone and spontaneous rhythmic contractions) and the contractile responses to TNS were stable. Strips without spontaneous contractile activity or response to TNS were excluded from the study. Strips were finally allowed to equilibrate for 60 min after which the effects of various pharmacological agents on basal tone and responses to TNS were investigated. Bath solution was replaced every 15 minutes.

In a first series of experiments, three increasing concentrations of leptin (0.01, 0.1 and 1 μ M) were added to the bath with washouts between each concentration. The pharmacological effects of each concentration were studied 10 minutes after its application. In a second series of experiments, the response to 0.1 μ M of leptin (0.395 μ g.mL⁻¹) was studied in the presence of several pharmacological agents: acetylcholine (ACh, 10 μ M), atropine (1 μ M), hexamethonium (0.1 mM), L-N^G-Nitroarginine methyl ester (L-NAME, 0.1 mM) and capsazepine (10 μ M). ACh was added to the bath 10 minutes after the addition of leptin whereas the other drugs were administrated 10 minutes prior to leptin. After each experiment, tissues were washed out by replacing the bath solution several times with fresh Krebs solution and muscle strips were allowed to equilibrate for 30 minutes. Recovery of smooth muscle strips was regularly verified by stimulating enteric nerves.

3. Drugs

Leptin (human leptin) was purchased from Polypeptide Laboratories (Strasbourg, France), atropine and hexamethonium from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

The other drugs were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Capsazepine was dissolved in DMSO whereas the other substances were dissolved in distilled water. Solvent vehicles were added to the bath (in a volume of 100 μL in 10 mL) for control experiments. They showed no effect on spontaneous contractile activity or response to TNS developed by rat CMPC.

4. Data analysis

Analysis was performed using Datatrax (Datatrax 2.0, WPI, Aston, UK). Tone was evaluated for 2 min before TNS. The parameters of the TNS-induced response were measured as the area under the curve (in $\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$, **Figure 1**). The effects of the pharmacological agents are given as the percentage change from control basal tone or from area under the curve for TNS responses (defined as 100 %; **Figure 1**).

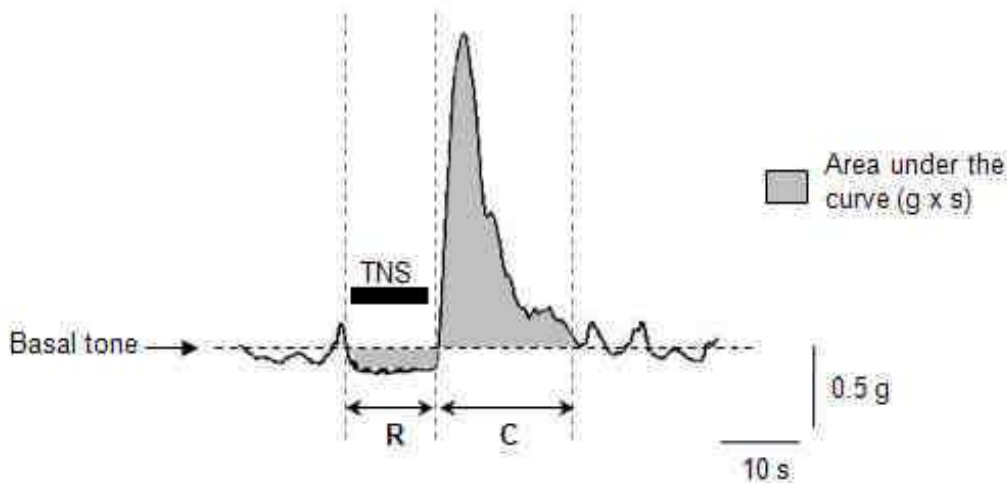


Figure 1: Typical traces illustrating the mechanical response to transmural nerve stimulation (TNS) developed by CMPC in normal Krebs solution in rats. Mechanical response to TNS is composed of a relaxation (R) and an off-contraction (C) at the end of stimulation.

Data were expressed as the mean \pm SEM. Statistical analysis was carried out using R (R Foundation, Vienna, Austria). The effect of the drug was evaluated by paired t-test since each muscle strip was considered as its own control. Differences between drugs were evaluated using ANOVA followed by Tukey multiple comparisons tests with Holm correction. Differences were considered significant at $P < 0.05$ (noted *).

C. Results

1. Influence of leptin on tone and TNS-induced response

TNS induced two kinds of responses in CMPC (Figure 1): an inhibition of phasic contractions during stimulation (relaxation, noted R), as a result of activation of inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) neurons, followed by a large contraction just after cessation of stimulation (off-contraction, noted C), as a result of contraction due to excitatory neurons activation superimposed on a rebound contraction [36]. Leptin caused significant decrease in tone and both TNS-induced R and C in a dose-dependent manner (n= 12, Figure 2). Leptin decreased tone by $4 \pm 3\%$ and TNS-induced R by $13 \pm 3\%$ at a dose of $0.1 \mu\text{M}$ ($P < 0.05$) whereas it had no effect on the TNS-induced C ($P > 0.05$).

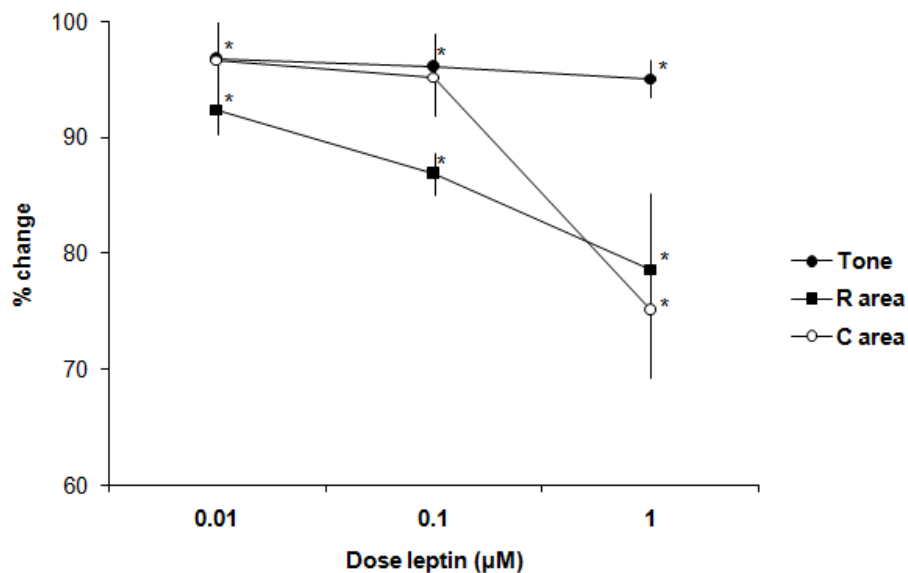


Figure 2: Dose-response curves of leptin on basal tone, TNS-induced relaxation and TNS-induced contraction. Leptin decreased these parameters in a dose-dependent manner (n=12). Data are expressed as % of control response (taken as 100%).*difference with control response ($P < 0.05$) by paired Student t-test.

2. Pharmacological characterization of leptin effects on tone and TNS-induced R

In order to determine the nature of the neurons involved in the effects of leptin, the effects of leptin at a dose of $0.1 \mu\text{M}$ ($0.395 \mu\text{g.mL}^{-1}$) on tone and TNS-induced R were studied in the presence of acetylcholine, atropine (a cholinergic muscarinic antagonist), hexamethonium (a nicotinic antagonist), L-NAME (a nitric oxide synthase - NOS inhibitor) and capsazepine (used to investigate the role of visceral afferent nerves).

a. Effect of leptin on nitrergic neurons

L-NAME (0.1 mM) induced a significant decrease in the TNS-induced R of CMPC ($-50 \pm 11 \%$, $n = 7$, $P < 0.05$; **Figure 3**) whereas it had no effect on basal tone ($P > 0.05$). Leptin in the presence of L-NAME induced a decrease in CMPC-R ($-62 \pm 9 \%$, $P < 0.05$) which was not significantly different from the decrease induced by L-NAME alone ($P > 0.05$).

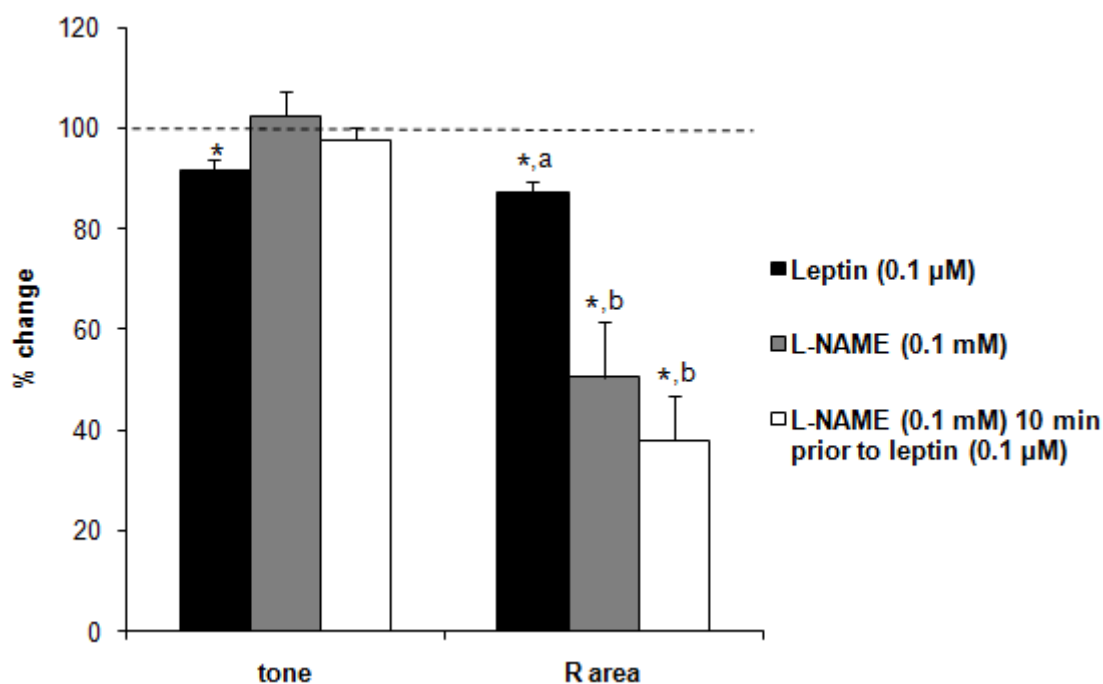


Figure 3: Effects of leptin (0.1 μM), L-NAME (0.1 mM) and leptin in the presence of L-NAME on basal tone and TNS-induced relaxation (R) of CMPC in rats. Data are expressed as % of control response (taken as 100%). *difference with control response ($P < 0.05$) by paired Student t-test. Values sharing common letters (^{a,b}) are not significantly different ($P > 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test.

b. Effect of leptin on cholinergic innervation

ACh (10 μM) induced a significant increase in basal tone of CMPC ($115 \pm 34 \%$, $n = 6$, $P < 0.05$; **Figure 4**). Exogenous leptin (0.1 μM) had no significant effect on the tonic contraction induced by ACh in CMPC ($P > 0.05$).

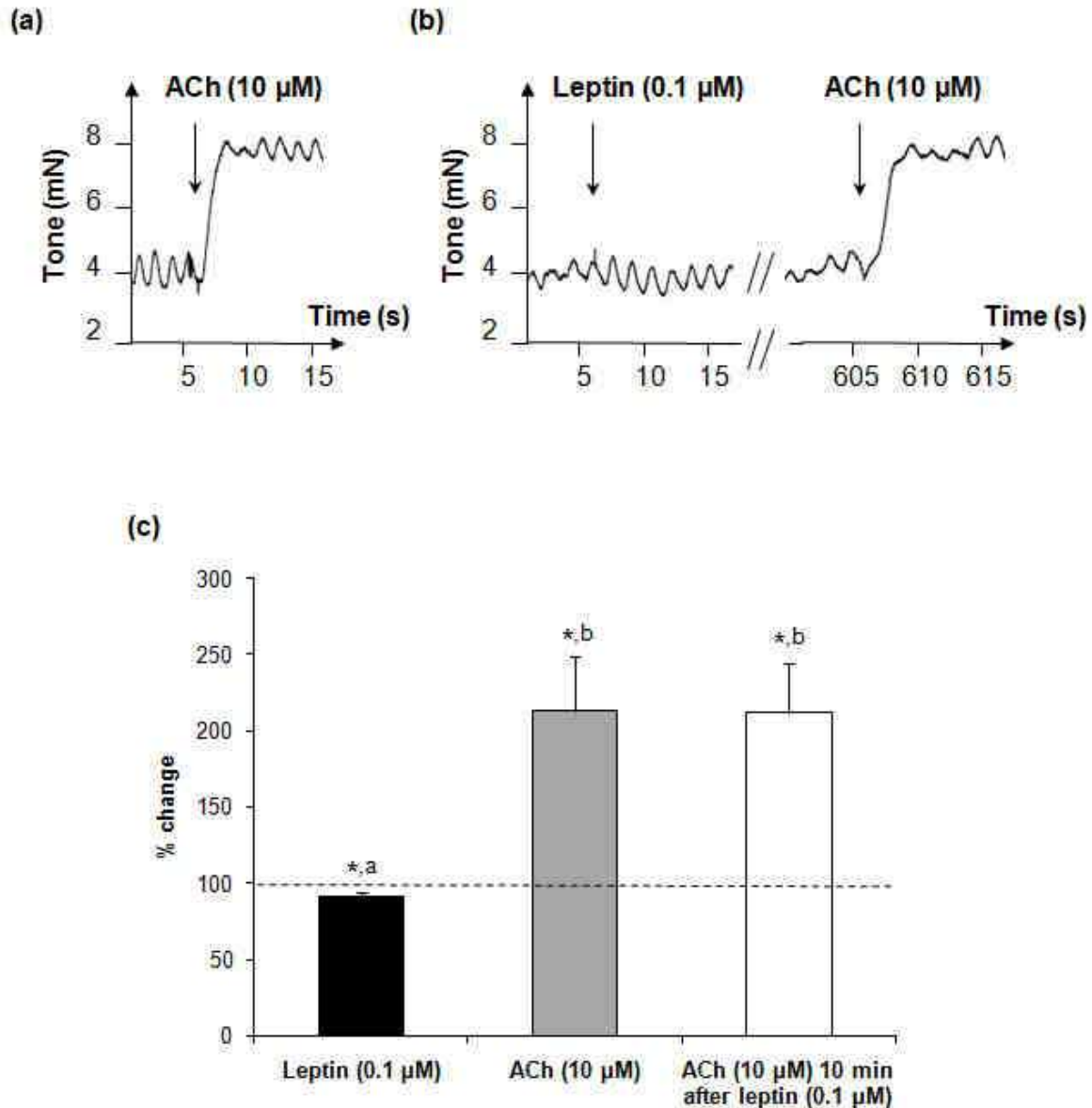


Figure 4: Effects of ACh (10 μ M) on basal tone of CMPC in rats (a) in normal Krebs solution and (b) in the presence of leptin. (c) The tone increase induced by ACh in the presence of leptin is not significantly different from those induced by ACh alone. Data are expressed as % of control basal tone (taken as 100%). *difference with control basal tone ($P < 0.05$) by paired Student t-test. Values sharing common letters (^{a,b}) are not significantly different ($P > 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test.

Hexamethonium (0.1 mM) induced a significant increase in the TNS-induced R of CMPC ($15 \pm 4 \%$, $n = 7$, $P < 0.05$; **Figure 5a**) whereas it had no effect on basal tone ($P > 0.05$). Leptin in the presence of hexamethonium induced an increase in CMPC-R ($20 \pm 5 \%$, $P < 0.05$) which was not significantly different from the increase induced by hexamethonium alone ($P > 0.05$).

Atropine (1 μM) induced a significant decrease in the basal tone ($-10 \pm 3 \%$, $n = 7$, $P < 0.05$; **Figure 5b**) whereas it had no effect on the TNS-induced R of CMPC ($P > 0.05$). The decrease in basal tone induced by leptin was not changed in the presence of atropine in CMPC ($P > 0.05$). The decrease in relaxation area induced by exogenous leptin was significantly inhibited in the presence of atropine in CMPC ($99 \pm 2 \%$, $n=7$, $P < 0.05$).

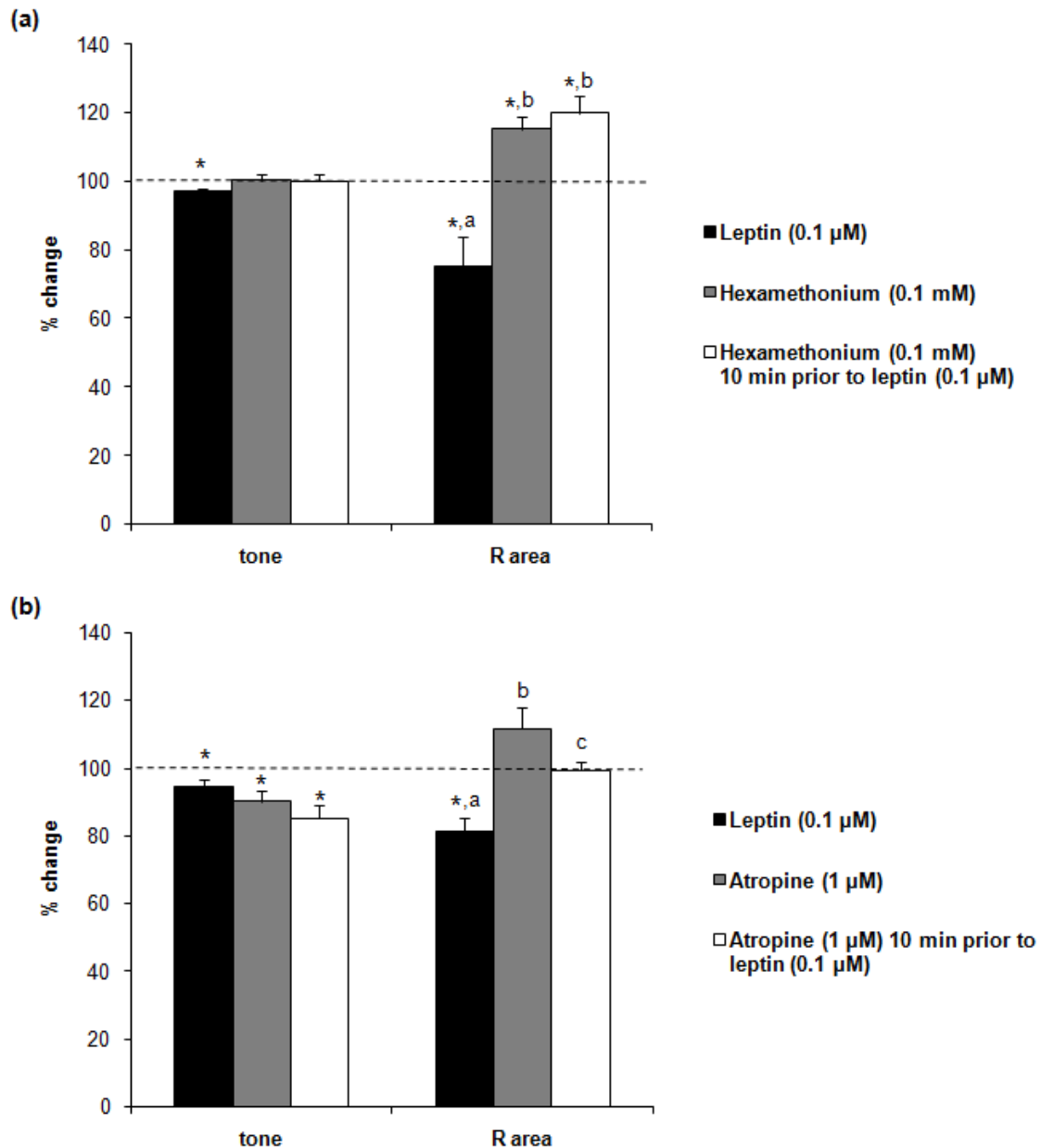


Figure 5: Effects of leptin (0.1 μM), cholinergic antagonists (a) hexamethonium and (b) atropine (10 μM) and leptin in the presence of these antagonists on basal tone and TNS-induced relaxation (R) of CMPC in rats. Data are expressed as % of control response (taken as 100%).*difference with control response ($P < 0.05$) by paired Student t-test. Values sharing common letters (^{a,b}) are not significantly different ($P > 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test.

c. Effect of leptin in the presence of capsazepine

Capsazepine (10 μM) induced a significant decrease in both basal tone and TNS-induced R of CMPC (respectively $-19 \pm 3\%$ and $-40 \pm 8\%$, $n = 7$, $P < 0.05$; **Figure 6**). Leptin in the presence of capsazepine induced a decrease in basal tone and R of CMPC (respectively $-18 \pm 3\%$ and $-47 \pm 10\%$, $n = 7$, $P < 0.05$). However, these effects were not significantly different from those induced by capsazepine alone ($P > 0.05$).

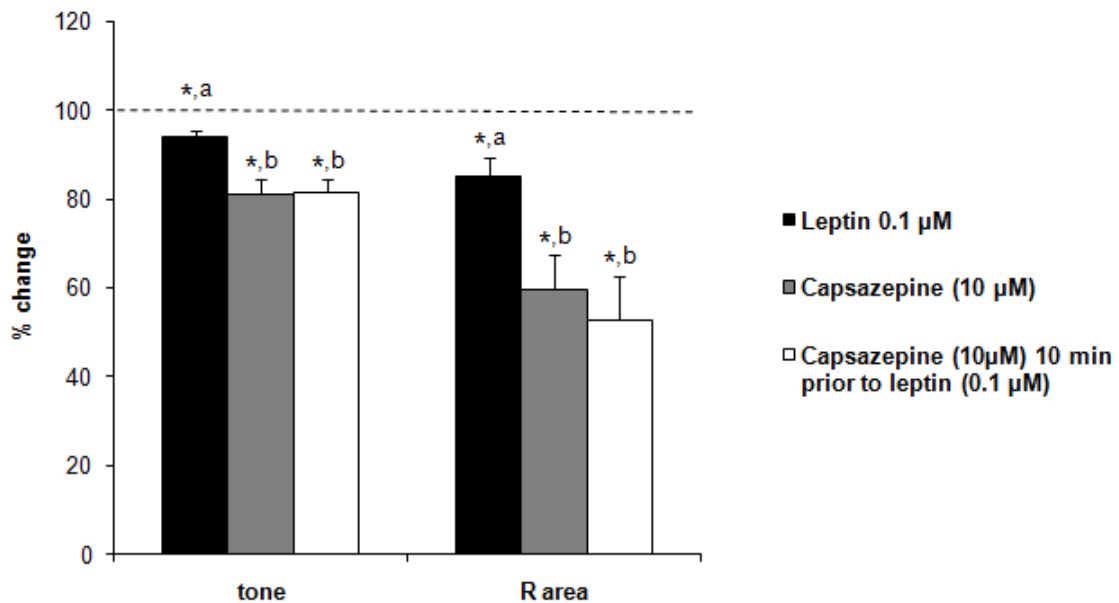


Figure 6: Effects of leptin (0.1 μM), capsazepine (10 μM) and leptin in the presence capsazepine on basal tone and TNS-induced relaxation (R) of CMPC in rats. Data are expressed as % of control response (taken as 100%). *difference with control response ($P < 0.05$) by paired Student t-test. Values sharing common letters (^{a,b}) are not significantly different ($P > 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test.

D. Discussion

1. Effects of leptin on GI tract motility

In the present study, the effects of leptin on colonic motility were investigated *in vitro* in rats. The possible mechanisms involved were analyzed. Leptin was shown to modify tone and TNS-induced response of CMPC. This effect seems to be mediated by nitrenergic inhibitory and cholinergic excitatory intramural neurons within the ENS. Capsazepine-sensitive neurons might also be involved in the effects of leptin.

This study shows that leptin decreased tone and TNS-induced relaxation and contraction in rat CMPC in a dose-dependent manner, indicating that leptin may act through peripheral mechanisms. If leptin is produced locally, for instance by adipocytes in colonic submucosa [33, 37] its receptors may be desensitized, which might explain the weak but significant effect of exogenous leptin on enteric neurons. Indeed, our results were consistent with those from previous studies showing that leptin modulates GI tract motility [24], hyperpolarize glucoresponsive enteric neurons [31] and excites enteric neurons of submucous and myenteric plexus [33].

For the present study, it was decided to use a concentration of leptin ($0.1 \mu\text{M} = 0.395 \mu\text{g.mL}^{-1}$) to characterize the mechanisms involved in leptin action on tone and TNS-induced relaxation even though this concentration has no effect on TNS-induced contraction. This concentration has previously been shown to activate anorexigenic pro-opiomelanocortin neurons in mice [38], enteric neurons in guinea-pig [33] and to stimulate vagal afferents in cats [29].

2. Effects of leptin on inhibitory motor neurons

Leptin in the presence of L-NAME induced a decrease in the relaxation that is significantly larger than the one induced by leptin alone but not different from the decrease induced by L-NAME alone. An effect of leptin on residual non-nitroergic neurotransmitters may not be excluded due to the weak effect of leptin on relaxation that is in the same way as L-NAME. However, leptin effect in the presence of L-NAME is not significantly different from those induced by L-NAME alone suggesting a specific effect on nitroergic neurons. In the intestine, stimulation of NANC inhibitory neurons resulting in muscle relaxation involves a number of substances that have been proposed as neurotransmitters in the rat colon (ATP, VIP, PACAP) [39–42]. However, a large number of studies have suggested that, in most cases, enteric NANC inhibitory neurotransmission was dependent on the activation of the NOS enzyme which was found to be present in nerves [43, 44] emphasizing the major role of NO in motor neurons innervating smooth muscle layers.

The effect of exogenous leptin on nitroergic neurons within the GI tract has never been observed before. However, it has recently been shown that leptin may exert a direct relaxant effect on the vasculature through endothelial NO release in rats [45, 46]. Furthermore, pre-

treatment of aorta rings with L-N^G-Nitroarginine methyl ester, another NOS inhibitor significantly attenuated the maximal relaxation induced by exogenous leptin in rabbits [47]. Moreover, leptin in high concentrations has been shown to display an enhancing effect on rabbit clitoral corpus cavernosal smooth muscle relaxation [48]. This process may occur through an NO-dependent mechanism and voltage-dependant calcium channel blockade [48].

3. Effects of leptin on interneurons or intrinsic primary afferent neurons (IPANs)

To investigate the hypothesis of an indirect effect of leptin, anti-cholinergic substances and capsazepine were tested. Capsazepine is a synthetic antagonist of a functional vanilloid receptor VR1 which is expressed by afferent neurons [49]. As we used an organ bath technique, the tissues were devoid of extrinsic innervations and capsazepine was used to investigate the role of intrinsic primary afferent neurons (IPANs). The present data showed that the possible effect of leptin on nitrenergic responses was blocked by hexamethonium but not by atropine in proximal colon. Moreover, no effect of leptin was observed on ACh-induced increase in tone. Furthermore, leptin, in the presence of capsazepine, induced a decrease in tone and in TNS-induced relaxation that is significantly larger than those induced by leptin alone but not different from the decrease induced by capsazepine alone.

Therefore, leptin may activate NO release through the activation of intramural cholinergic neurons and capsazepine-sensitive neurons. The inhibitory motor neurons in the GI tract receive inputs from descending interneurons and myenteric IPANs [50–52]. The primary neurotransmitter from IPANs to inhibitory motor neurons and between interneurons in the rat colon is ACh, acting mainly via nicotinic receptors [53]. Moreover, the role of leptin on afferent nerves has previously been shown. Indeed, leptin acts directly on chemosensitive mechanoreceptors via intestinal vagal afferent nerve fibres [29, 55], in cooperation with CCK [30]. It has also been shown that peripheral leptin exhibits, together with CCK, a potent gastroprotective activity which depends upon vagal activity and sensory nerves containing CGRP and NO [56]. Therefore, one hypothesis is that leptin, in addition with activation of vagal afferent neurons, may activate IPANs which may lead to NO release.

4. Conclusion

The present data give new information on the involvement of leptin in modulating the activities of intrinsic enteric neurons within the proximal colon of rats. For the past years, research on leptin has been a main topic in the field of obesity and nutrition by way of its actions on the central nervous system. More recently, the focus has been placed on the direct relation of leptin with the physiology of the digestive tract. Indeed, intestinal absorption of nutrients, mucus secretion, motility and inflammation, among other processes, are all influenced by leptin [24]. The precise role of the enteric nervous system in mediating the effects of leptin, however, has to be further investigated.

Acknowledgements

The authors sincerely thank Nicolas Chatelain for assistance in electrophysiological instrumentation and Aurélie Hranitsky for animal care.

References

- [1] M. Guerre-Millo, *J. Soc. Biol.* 200 (2006) 37–43.
- [2] K. Karastergiou, V. Mohamed-Ali, *Mol. Cell. Endocrinol.* 318 (2010) 69–78.
- [3] F. Lago, C. Dieguez, J. Gómez-Reino, O. Gualillo, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3 (2007) 716–724.
- [4] E.D. Rosen, B.M. Spiegelman, *Nature* 444 (2006) 847–853.
- [5] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J.M. Friedman, *Nature* 372 (1994) 425–432.
- [6] M.A. Pelleymounter, M.J. Cullen, M.B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone, F. Collins, *Science* 269 (1995) 540–543.
- [7] M. Barbier, S. Attoub, J.P. Galmiche, *Gastroenterol. Clin. Biol.* 24 (2000) 509–519.
- [8] A. Bado, S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J.-P. Laigneau, M.-N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel, M.J.M. Lewin, *Nature* 394 (1998) 790–793.
- [9] R.S. Ahima, C.B. Saper, J.S. Flier, J.K. Elmquist, *Front. Neuroendocrinol.* 21 (2000) 263–307.

- [10] T. Skurk, C. Alberti-Huber, C. Herder, H. Hauner, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 92 (2007) 1023–1033.
- [11] G.H. Lee, R. Proenca, J.M. Montez, K.M. Carroll, J.G. Darvishzadeh, J.I. Lee, J.M. Friedman, *Nature* 379 (1996) 632–635.
- [12] L.A. Tartaglia, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 6093–6096.
- [13] R. De Matteis, K. Dashtipour, A. Ognibene, S. Cinti, *Proc. Nutr. Soc.* 57 (1998) 441–448.
- [14] S. Galic, J.S. Oakhill, G.R. Steinberg, *Mol. Cell. Endocrinol.* 316 (2010) 129–139.
- [15] P.G. Cammisotto, C. Renaud, D. Gingras, E. Delvin, E. Levy, M. Bendayan, *J. Histochem. Cytochem.* 53 (2005) 851–860.
- [16] T. Aparicio, S. Kermorgant, D. Darmoul, S. Guilmeau, K. Hormi, D. Mahieu-Caputo, T. Lehy, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 90 (2005) 6177–6184.
- [17] J. Barrenetxe, A.C. Villaro, L. Guembe, I. Pascual, M. Muñoz-Navas, A. Barber, M.P. Lostao, *Gut* 50 (2002) 797–802.
- [18] G.H. Hansen, L.-L. Niels-Christiansen, E.M. Danielsen, *J. Histochem. Cytochem.* 56 (2008) 677–685.
- [19] S. Sitaraman, X. Liu, L. Charrier, L.H. Gu, T.R. Ziegler, A. Gewirtz, D. Merlin, *FASEB J.* 18 (2004) 696–698.
- [20] S.S. Yarandi, G. Hebbbar, C.G. Sauer, C.R. Cole, T.R. Ziegler, *Nutrition* 27 (2011) 269–275.
- [21] A. Asakawa, A. Inui, N. Ueno, S. Makino, M.A. Fujino, M. Kasuga, *Gastroenterology* 116 (1999) 1287–1292.
- [22] J.M. Kiely, J.H. Noh, S.J. Graewin, H.A. Pitt, D.A. Swartz-Basile, *J. Surg. Res.* 124 (2005) 98–103.
- [23] Y.H. Wang, Y. Tache, A.B. Sheibel, V.L. Go, J.Y. Wei, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 273 (1997) R833–R837.
- [24] J.B. Furness, C. Jones, K. Nurgali, N. Clerc, *Prog. Neurobiol.* 72 (2004) 143–164.
- [25] S. Gaigé, A. Abysique, M. Bouvier, *J. Physiol.* 543 (2002) 679–689.
- [26] S. Gaigé, A. Abysique, M. Bouvier, *J. Physiol.* 546 (2003) 267–277.
- [27] M. Liu, S. Seino, A.L. Kirchgessner, *J. Neurosci.* 19 (1999) 10305–10317.
- [28] C. Baudry, F. Reichardt, J. Marchix, A. Bado, M. Schemann, S.B. des Varannes, M. Neunlist, R. Moriez, *J. Physiol.* 590 (2012) 533–544.
- [29] F. Reichardt, D. Krueger, M. Schemann, *Neurogastroent. Motil.* 23 (2011) e165–e170.
- [30] R. Serio, M. Grazia Zizzo, F. Mulá, *Nitric Oxide* 8 (2003) 48–52.

- [31] A.M. Harrington, J.M. Hutson, B.R. Southwell, *Prog. Histochem. Cytochem.* 44 (2010) 173–202.
- [32] M.A. Cowley, J.L. Smart, M. Rubinstein, M.G. Cerdán, S. Diano, T.L. Horvath, R.D. Cone, M.J. Low, *Nature* 411 (2001) 480–484.
- [33] J.R. Grider, G.M. Makhlof, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 251 (1986) G40–G45.
- [34] J.R. Grider, S. Katsoulis, W.E. Schmidt, J.-G. Jin, *J. Auton. Nerv. Syst.* 50 (1994) 151–159.
- [35] L. Börjesson, S. Nordgren, D.S. Delbro, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291 (1999) 717–724.
- [36] K. Kumano, M. Fujimura, S. Oshima, H. Yamamoto, N. Hayashi, T. Nakamura, M. Fujimiya, *Peptides* 22 (2001) 91–98.
- [37] T. Kato, E. Nakamura, K. Imaeda, H. Suzuki, *J. Smooth Muscle Res.* 45 (2009) 249–268.
- [38] T. Takahashi, *J. Gastroenterol.* 38 (2003) 421–430.
- [39] K. Kimura, K. Tsuda, A. Baba, T. Kawabe, S. Boh-oka, M. Ibata, C. Moriwaki, T. Hano, I. Nishio, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273 (2000) 745–749.
- [40] C. Vecchione, A. Aretini, A. Maffei, G. Marino, G. Selvetella, R. Poulet, V. Trimarco, G. Frati, G. Lembo, *Hypertension* 42 (2003) 166–170.
- [41] A.S. Şahin, H. Bariskaner, *Fund. Clin. Pharmacol.* 21 (2007) 595–600.
- [42] S.Y. Lee, W.H. Chung, M.Y. Lee, S.C. Kim, H.W. Kim, S.C. Myung, *Korean J. Urol.* 52 (2011) 136–141.
- [43] S. Bevan, S. Hothi, G. Hughes, I.F. James, H.P. Rang, K. Shah, C.S. Walpole, J.C. Yeats, *Br. J. Pharmacol.* 107 (1992) 544–552.
- [44] O. Sterner, A. Szallasi, *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (1999) 459–465.
- [45] Z.S. Li, J.B. Furness, *Cell Tissue Res.* 299 (2000) 1–8.
- [46] J.B. Furness, G.J. Sanger, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2 (2002) 612–622.
- [47] E.E. Benarroch, *Neurology* 69 (2007) 1953–7.
- [48] X. Bian, J.C. Bornstein, P.P. Bertrand, *Neurogastroent. Motil.* 15 (2003) 161–171.
- [49] J.R. Grider, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 266 (1994) G1139–G1145.
- [50] J.H. Peters, R.C. Ritter, S.M. Simasko, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290 (2006) R1544–R1549.
- [51] T. Brzozowski, P.C. Konturek, R. Pajdo, S. Kwiecień, A. Ptak, Z. Sliwowski, D. Drozdowicz, M. Pawlik, S.J. Konturek, E.G. Hahn, *J. Physiol. Pharmacol.* 52 (2001) 583–602.

Résumé des résultats

Dans le muscle circulaire de côlon proximal (MCCP) de rat :

- la leptine entraîne une diminution du tonus de base et de la réponse à la NS (relaxation et contraction). Cet effet est dose-dépendant.
- les effets de la leptine sur le tonus et la relaxation induite par la NS sont inhibés en présence de L-NAME (inhibiteur de l'enzyme qui synthétise le NO : la NO synthase).
- la leptine n'a pas d'effet sur la contraction induite par l'ACh.
- les effets de la leptine sur le tonus et la relaxation induite par la NS sont bloqués en présence d'hexaméthonium (antagoniste cholinergique nicotinique) mais pas en présence d'atropine (antagoniste cholinergique muscarinique).
- les effets de la leptine sur le tonus et la relaxation induite par la NS sont bloqués en présence de capsazepine (antagoniste du récepteur VR1 exprimé principalement par les IPANs)

IV. Résultats complémentaires

Dans cette partie de l'étude, nous avons déterminé les effets de la leptine sur le SNE du jéjunum de rat. Pour ce faire, nous avons évalué les effets d'une dose unique $0,1 \mu\text{M}$ ($0,395 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de leptine sur le tonus de base ainsi que la relaxation et la contraction en réponse à la NS dans le muscle longitudinal du jéjunum (MLJ). Nous avons également déterminé les mécanismes d'action de la leptine. Nous avons utilisé le même lot d'animaux que celui présenté dans l'article scientifique (lot 1) ainsi qu'un second lot de rats de même souche, sexe et âge (lot 2). Les effets de la leptine seule ont été évalués sur les rats des deux lots. Les effets de la leptine ont été évalués en présence d'atropine ou de capsazepine sur le lot 1 et en présence de L-NNA (un autre inhibiteur de la NO synthase) ou de pancuronium (un autre antagoniste nicotinique) sur le lot 2. L'analyse des données a été réalisée comme dans l'article scientifique A. Compte tenu des effectifs réduits ($n = 4$), aucune analyse statistique n'a été menée sur les effets du pancuronium, de l'atropine et de la capsazepine.

A. Influence de la leptine sur le tonus basal et la réponse induite par la NS

La NS induit les mêmes réponses dans le MLJ que dans le MCCP (**Figure 23**). La leptine à la dose unique de $0,1\mu\text{M}$ induit une diminution significative du tonus basal de $3 \pm 1\%$, de la relaxation de $20 \pm 3\%$ et de la contraction induite par la NS de $23 \pm 8\%$ ($n = 14$; $P < 0,05$). Il n'existe pas de différence d'effet de la leptine entre les lots ($P > 0,05$).

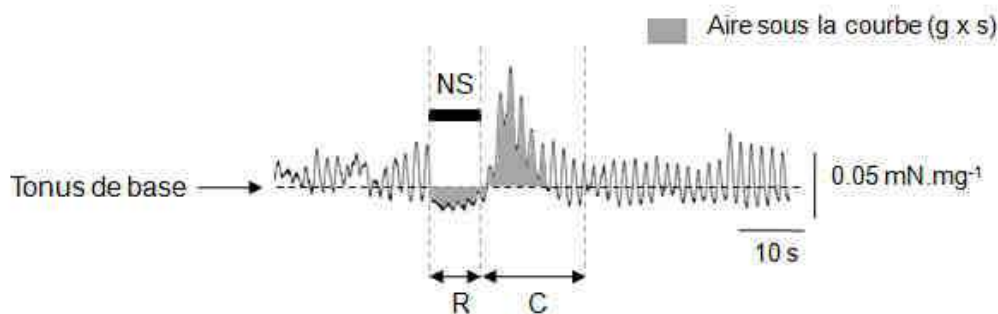


Figure 23 : Tracé illustrant la réponse mécanique à la neurostimulation (NS) développée par le MLJ de rat dans une solution de Krebs. La réponse mécanique à la NS est constituée d'une relaxation (R) suivie d'une contraction (C) à la fin de la stimulation.

B. Effets de la leptine sur les neurones nitrergiques

Le L-NNA ($0,1\text{mM}$) entraîne une diminution significative de la relaxation induite par la NS du MLJ ($-58 \pm 10\%$, $n = 8$, $P < 0,05$; **Figure 24**) alors qu'il n'a pas d'effet sur le tonus de base ou la contraction induite par la NS ($P > 0,05$). La leptine en présence de L-NNA induit une diminution de la relaxation ($-58 \pm 8\%$, $P < 0,05$) et n'a pas d'effet sur la contraction. Ces paramètres ne sont pas significativement différents de ceux induits par le L-NNA seul ($P > 0,05$).

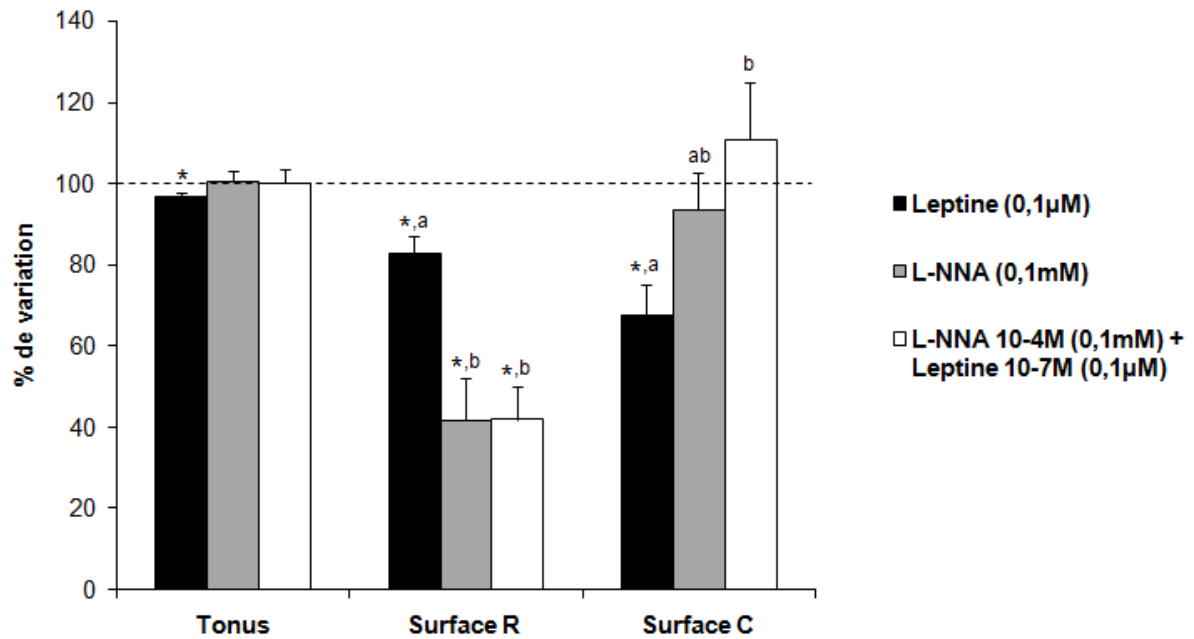


Figure 24 : Effets de la leptine (0,1 µM), du L-NNA (0,1mM) et de la leptine en présence de L-NNA sur le tonus de base, la relaxation (R) et la contraction (C) induites par la neurostimulation du muscle longitudinal du jéjunum chez le rat. Les données sont exprimées en % de variation de la réponse contrôle (correspondant à 100%). *différence avec la réponse contrôle ($P < 0.05$) par un test t apparié. Les valeurs qui partagent la même lettre (^{a,b}) ne sont pas significativement différentes par une ANOVA suivie d'un test de Tukey pour comparaisons multiples.

C. Effets de la leptine sur l'innervation cholinergique

Le pancuronium (10µM) semble provoquer une augmentation de la relaxation induite par la NS ($104 \pm 36\%$) et une réduction de la contraction ($-27 \pm 7\%$) sans avoir d'effet sur le tonus basal (**Figure 25a**). Les effets de la leptine en présence de pancuronium ne sont pas différents de ceux observés avec le pancuronium seul. Les effets de l'atropine (1µM) seule semblent relativement similaires à ceux du pancuronium (**Figure 25b**). Compte tenu du faible effectif et de la variation intraspécifique il est difficile de déterminer si les effets de la leptine en présence d'atropine sont différents des effets de l'atropine seule.

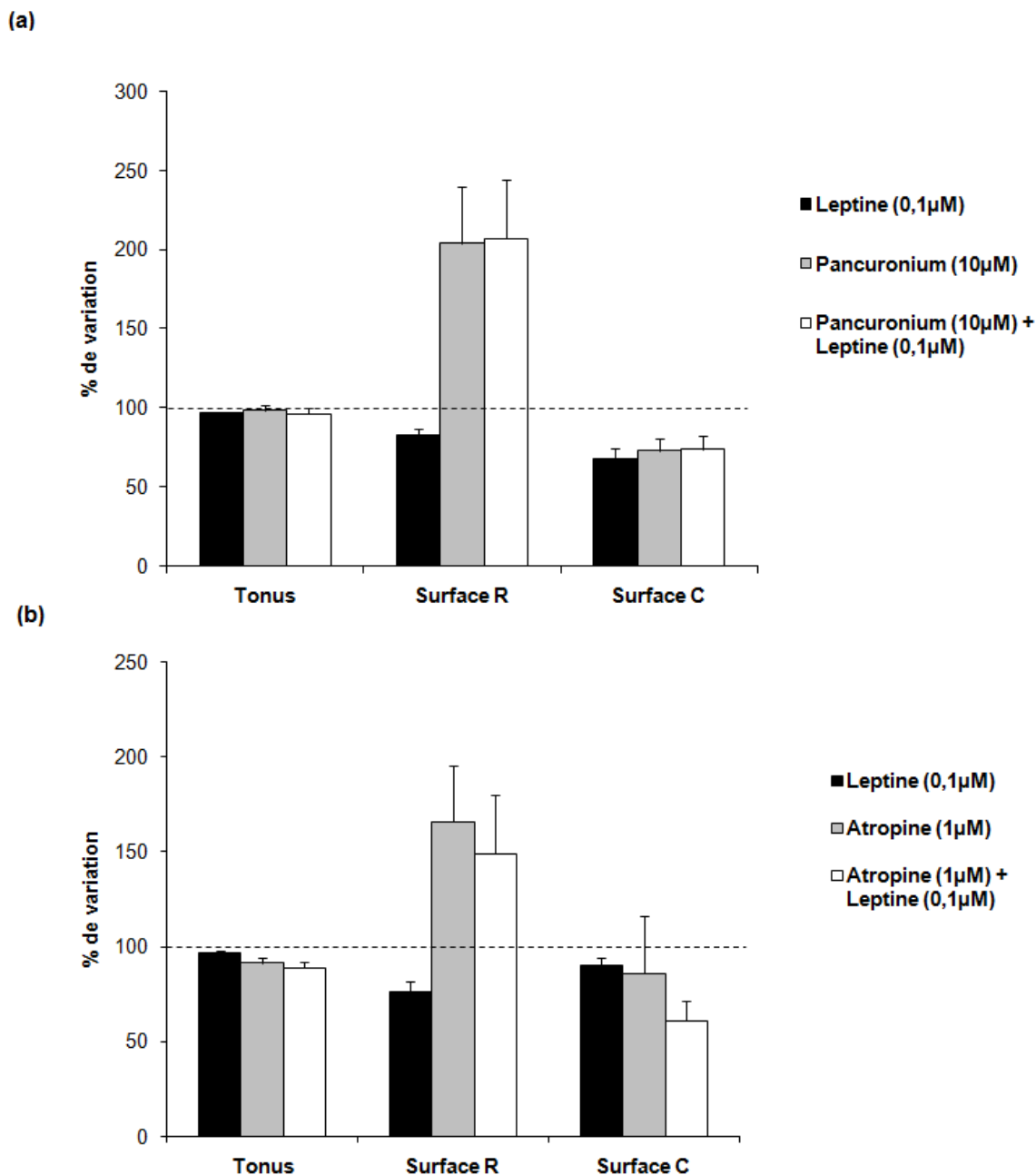


Figure 25 : Effets de la leptine (0,1 µM), des antagonistes cholinergiques (a) pancuronium (10µM) ou (b) atropine (1µM) et de la leptine en présence de ces antagonistes sur le tonus de base, la relaxation (R) et la contraction (C) induites par la neurostimulation du muscle longitudinal du jéjunum chez le rat. Les données sont exprimées en % de variation de la réponse contrôle (correspondant à 100%) et aucune statistique n'a été réalisée.

D. Effets de la leptine en présence de capsazepine

La capsazepine (10 μ M) semble entraîner une diminution de la relaxation induite par la NS (-46 \pm 12%) sans avoir d'effet sur la contraction et le tonus de base (**Figure 26**). Il est difficile de se prononcer sur les effets de la leptine en présence de capsazepine.

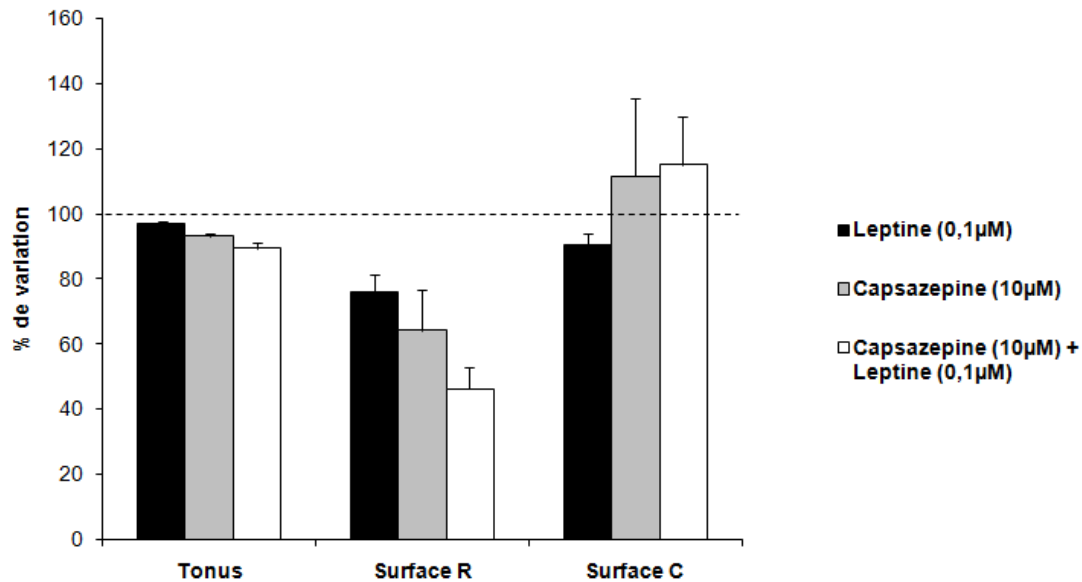


Figure 26 : Effets de la leptine (0,1 μ M), de la capsazepine (10 μ M) et de la leptine en présence de capsazepine sur le tonus de base, la relaxation (R) et la contraction (C) induites par la neurostimulation du muscle longitudinal du jéjunum chez le rat. Les données sont exprimées en % de variation de la réponse contrôle (correspondant à 100%).

V. Discussion : modulation de la neurotransmission dans le SNE du rat par la leptine

L'ensemble de nos résultats apporte des arguments en faveur d'effets modulateurs de la leptine sur l'activité motrice gastro-intestinale *ex vivo* et de celle des neurones entériques chez le rat. En effet, nous avons montré que la leptine diminue le tonus basal ainsi que la relaxation et la contraction induites par la NS, que ce soit du MCCP de rat de manière dose-dépendante ou du MLJ à une dose unique de 0.1 μ M. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui ont montré que la leptine module la motricité du TD (Yarandi *et al.*, 2011), hyperpolarize les neurones entériques sensibles au glucose (Liu *et al.*, 1999) et excite les neurones entériques des plexus sous-muqueux et myentériques (Reichardt *et al.*, 2011).

A. Modes d'action de la leptine

1. La leptine inhibe la relaxation

Les inhibiteurs de la NO synthase réduisent la relaxation induite par la NS. La leptine en présence de ces inhibiteurs n'exerce pas d'effet inhibiteur supplémentaire. Par conséquent, la réduction de la relaxation induite par la leptine pourrait résulter de la stimulation de la libération de NO par les neurones moteurs inhibiteurs du côlon proximal et du jéjunum. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude montre que la leptine est impliquée dans la modulation de la relaxation dans le TD. Cependant, plusieurs autres études ont montré que la leptine avait un effet relaxant sur le muscle lisse d'autres tissus tels que l'aorte ou le corps caverneux clitoridien du lapin, via une action sur la libération de NO (Kimura *et al.*, 2000 ; Şahin & Bariskaner, 2007 ; Lee *et al.*, 2011).

Afin de déterminer si l'action de la leptine sur les neurones entériques est directe ou indirecte, nous avons déterminé les effets de la leptine en présence d'antagonistes cholinergiques ou de capsazepine. Nous avons montré que les effets de la leptine sont inhibés en présence d'un antagoniste nicotinique mais pas d'un antagoniste muscarinique dans le côlon et que les effets de la leptine en présence de capsazepine ne sont pas différents de ceux induits par la capsazepine seule dans le côlon. Compte tenu du faible effectif et de la forte variabilité individuelle obtenue dans le jéjunum de rat, il est difficile d'affirmer que les effets sont identiques, même s'ils s'en rapprochent. Malgré cela, ces résultats tendent à montrer que la leptine stimule indirectement la libération de NO en activant des neurones cholinergiques entériques dans le côlon proximal et potentiellement dans le jéjunum. En effet, les neurones moteurs inhibiteurs sont modulés par des interneurons ou par des IPANs dont le neurotransmetteur principal est l'ACh qui agit principalement via les récepteurs nicotiniques (Li & Furness, 2000 ; Furness & Sanger, 2002 ; Bian *et al.*, 2003 ; Benarroch, 2007). Par conséquent, la leptine pourrait activer des interneurons et/ou des IPANs qui projettent vers des neurones moteurs excitateurs. De la même manière, il a été montré que la leptine module l'activité neuronale dans les ganglions pancréatiques chez le chien et cet effet résulte probablement de la facilitation de la transmission cholinergique nicotinique par la leptine (Sha & Szurszewski, 1999). La leptine pourrait plus particulièrement moduler l'activité des récepteurs sensitifs muqueux des IPANs de la même manière qu'elle agit directement sur certains mécanorécepteurs de fibres nerveuses afférences vagales (Gaigé *et al.*, 2002 ; Gaigé *et al.*, 2003 ; Peters *et al.*, 2006). Reichardt *et al.*, (2011) ont montré que les neurones sous-

muqueux et myentériques qui répondent à la leptine sont, en partie seulement, stimulés par la nicotine, suggérant ainsi que la leptine active plusieurs sous-populations de neurones entériques dans le côlon transverse du cobaye. Par conséquent, il est possible que la leptine stimule des neurones moteurs nitrergiques directement et indirectement via l'activation d'interneurones et/ou d'IPANs qui agissent sur leurs récepteurs nicotiques.

2. La leptine inhibe la contraction

La leptine diminue significativement la contraction induite par la NS dans le jéjunum à une concentration de $0,1\mu\text{M}$ et dans le côlon proximal à une concentration de $1\mu\text{M}$. Cela pourrait être dû simplement à une baisse du rebond due à une diminution de l'amplitude de la relaxation. Néanmoins, la contraction induite par la NS résulte également de la libération de neurotransmetteurs, notamment d'ACh et de tachykinines, par les neurones moteurs excitateurs (Goyal, 2000). La contribution de ces trois composantes varie en fonction des conditions expérimentales et de la région du TD. Par conséquent, la leptine pourrait agir en inhibant l'activité de certains neurones moteurs excitateurs. De tels effets ont été rapportés dans d'autres tissus : la vasodilatation induite par l'ACh dans l'artère coronaire de chien est atténuée en présence de leptine (Knudson *et al.*, 2005) et des modifications de neurotransmetteurs dans les neurones cholinergiques (augmentation de la choline acétyltransférase) sont induites par la leptine dans le SNC (Di Marco *et al.*, 2000). A l'heure actuelle, les données que nous possédons ne nous permettent pas de déterminer précisément le mécanisme d'action de la leptine sur les neurones moteurs excitateurs.

B. Réponse à la leptine dans le TD : relation structure/fonction

Au cours de cette expérience, nous avons montré que la leptine stimule les neurones entériques du jéjunum et du côlon proximal. La dose de leptine que nous avons décidé d'utiliser pour la plupart des expériences ($0,1\mu\text{M} = 0,395\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) entre dans la gamme de concentration qui active les neurones anorexigènes POMC dans le cerveau de la souris (Cowley *et al.*, 2001), les neurones entériques du côlon distal du cobaye (Reichardt *et al.*, 2011) et les neurones afférents vagues du chat (Gaigé *et al.*, 2002). Néanmoins, dans notre étude, il semble que la concentration nécessaire à l'activation des neurones entériques ne soit pas la même dans le jéjunum et le côlon proximal. En effet, une dose unique de $0,1\mu\text{M}$ de

leptine entraîne une diminution de la relaxation induite par la NS de 20% et de la contraction de 23% dans le jéjunum alors qu'elle n'implique pas de changement de la contraction et une diminution de la relaxation de seulement 13% dans le côlon proximal. Il faut utiliser une dose 10 fois plus importante (1 μ M) dans le côlon pour obtenir les mêmes effets (diminution de la relaxation de 21% et de la contraction de 25%) que dans le jéjunum.

1. Les récepteurs à la leptine dans le TD

Une des hypothèses permettant d'expliquer ces différences est que le nombre de récepteurs à la leptine est plus important dans le jéjunum que dans le côlon proximal. Dans ce cas, nous pouvons supposer, d'une part, que le nombre de récepteurs par neurone n'est pas différent entre les tissus mais que c'est la densité des neurones sensibles à la leptine qui diminue le long du tube digestif. En effet, les neurones dans les circuits nerveux de l'intestin grêle et du côlon sont relativement semblables à l'exception de certaines classes d'interneurones : trois classes d'interneurones descendants et une classe d'ascendants ont été identifiées dans le jéjunum du cobaye alors que quatre classes d'interneurones descendants et trois d'ascendants ont été mis en évidence dans le côlon (Lomax & Furness, 2000). De plus, la proportion des neurones varie en fonction de la région du tube digestif (Lomax & Furness, 2000). Par conséquent, la variation de la proportion de certains types de neurones porteurs du récepteur à la leptine entre l'intestin et le côlon pourrait entraîner les variations de réponse observées. D'autre part, nous pouvons supposer que les récepteurs à la leptine dans le SNE sont répartis selon un gradient de densité le long du tube digestif. A notre connaissance, il n'existe pas de donnée quantitative concernant les récepteurs à la leptine sur les neurones entériques dans le tube digestif. De manière générale dans le TD, même si Yarandi *et al.* (2011) affirment que les récepteurs à la leptine sont plus spécialement abondants dans la partie proximale de l'intestin, l'étude de Hansen *et al.* (2008) ne semble pas faire apparaître de différence de densité de leptine et de son récepteur entre le jéjunum et le côlon transverse de porc.

2. Origine de la leptine impliquée dans les fonctions digestives

La leptine intervient dans de nombreuses fonctions dans le TD, qui sont particulièrement importantes dans le jéjunum (Yarandi *et al.*, 2011). Par conséquent, il n'est pas étonnant que la leptine soit plus efficace dans le jéjunum que dans le côlon. D'autre part, l'origine de la leptine qui module les fonctions digestives et plus particulièrement l'activité des neurones entériques reste controversée. En effet, la leptine provenant des adipocytes serait libérée tardivement et participerait à la gestion des réserves lipidiques et de la prise alimentaire, notamment en agissant dans le tissu adipeux et dans le cerveau. A l'inverse, la sécrétion rapide de la leptine gastrique servirait à la modulation des fonctions digestives et de la prise alimentaire via une action locale (revue dans Buyse *et al.*, 2002 ; Yarandi *et al.*, 2011). Ainsi, la sécrétion de leptine gastrique au cours du repas est principalement exocrine : une fois dans la lumière gastrique, la leptine n'est pas totalement dégradée par l'environnement acide et peut agir dans le TD. D'une part, elle peut agir localement dans l'estomac en activant les afférences vagues viscéro-sensitives pour produire des signaux de satiété. Ces signaux sont intégrés dans le NTS et traités soit dans le noyau moteur dorsal du nerf vague pour assurer un contrôle parasympathique des fonctions viscérales par un réflexe vago-vagal, soit dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus pour contrôler la prise alimentaire (**Figure 27**). Cette action locale de la leptine amplifierait l'action des récepteurs à la CCK expliquant la synergie de la leptine et la CCK dans l'induction précoce de la satiété. D'autre part, la leptine gastrique peut transiter vers l'intestin et le côlon sous forme libre ou liée à des macromolécules où elle interagit avec ses récepteurs pour contrôler la motricité digestive, l'absorption, le développement de l'épithélium intestinal ainsi que la réponse immunitaire. Ainsi, la leptine peut moduler les fibres vagues en présence de CCK afin de stimuler la motricité intestinale chez le chat (Gaigé *et al.*, 2002 ; Gaigé *et al.*, 2003). De plus, la leptine favorise l'absorption intestinale des protéines au détriment de celle des lipides, ce qui aurait pour conséquence de réduire la prise alimentaire (théorie aminostatique, **Figure 26** ; Buyse *et al.*, 2004). Elle possède également un rôle de facteur trophique, peut altérer les réponses du système immunitaire et participerait à la physiopathologie des cancers et des maladies inflammatoires intestinales (revue dans Yarandi *et al.*, 2011).

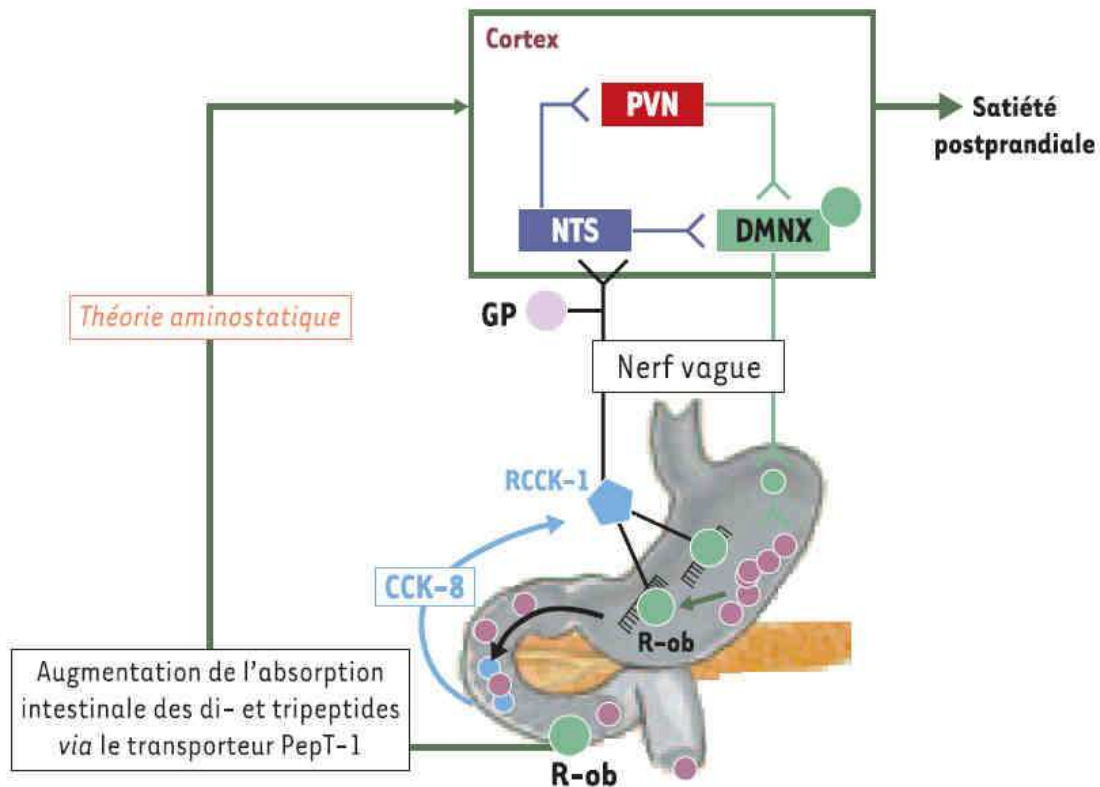


Figure 27 : Modèle hypothétique d'action de la leptine gastrique sur la satiété post-prandiale. ● leptine gastrique libérée par le repas, ● récepteurs à la leptine (R-ob), ● CCK-8, ◆ récepteur à la CCK (RCKK-1), DMNX : noyau moteur dorsal du nerf vague, GP : ganglion plexiforme, NTS : noyau du tractus solitaire, PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. D'après Buyse *et al.*, 2004.

Une dernière hypothèse a été émise récemment sur l'origine de la leptine activant les neurones entériques du côlon (Reichardt *et al.*, 2011). Elle repose sur l'existence d'adipocytes dans la sous-muqueuse du côlon essentiellement (Harisinghani *et al.*, 2003). Ces adipocytes sont situés à proximité des ganglions du plexus sous-muqueux et il semble qu'il y ait des voies de signalisation entre ces adipocytes et les ganglions nerveux (Hanani *et al.*, 2007 ; Schemann *et al.*, 2010) . Ainsi, la leptine pourrait être libérée par les adipocytes sous-muqueux et avoir une action paracrine sur les neurones entériques du côlon (Reichardt *et al.*, 2011). Néanmoins, ces adipocytes étant peu nombreux dans l'iléon (Harisinghani *et al.*, 2003), ce mode d'action n'expliquerait pas à lui seul les différences d'effets de la leptine observées entre les tissus.

VI. Conclusion et perspectives

Afin de confirmer le mode d'action de la leptine sur les neurones moteurs inhibiteurs du MLJ de rat et de déterminer le mode d'action de la leptine sur les neurones moteurs excitateurs, il est nécessaire de réaliser une nouvelle expérience. Dans cette expérience, le nombre de données concernant les effets de la leptine à la dose de 0,1 μ M sur ces paramètres, en présence des substances précédemment testées, devra être augmenté afin de pouvoir confirmer ou infirmer les résultats obtenus et ce de manière significative.

Afin de vérifier les hypothèses sur le mode d'action de la leptine en relation avec la structure et la fonction du TD, des études d'immunohistochimie (méthode de localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu au moyen d'anticorps) pourraient être menées. D'une part, afin de déterminer l'origine de la leptine stimulant les neurones entériques, une forme de leptine marquée pourrait être injectée à des rats soit par voie intraveineuse (ou intra-artérielle) soit par voie intra-gastrique (Yuan *et al.*, 2000 ; Gaigé *et al.*, 2003). Après euthanasie et prélèvement du TD, la quantité de cellules coexprimant un marqueur neuronal (par exemple l'énolase), le récepteur à la leptine et la leptine marquée, pourrait être déterminée dans chaque condition (injection sanguine ou gastrique), comme cela a été décrit précédemment dans l'ARC (Fernández-Galaz *et al.*, 2010). D'autre part, afin de déterminer sur quel(s) type(s) de neurones la leptine est capable de se fixer ainsi que la proportion de ces neurones et la densité des récepteurs à la leptine le long du TD, des doubles marquages, l'un correspondant au récepteur à la leptine et l'autre à une protéine intervenant dans le métabolisme d'un neurotransmetteur particulier (par exemple NO synthase, ACh transférase), pourraient être réalisés et comparés entre les deux tissus. Finalement, une réaction de polymérase en chaîne quantitative (qPCR : méthode permettant l'amplification génique et la quantification d'ADN) pourrait permettre de déterminer le rapport de l'expression du gène codant pour le récepteur à la leptine entre le jéjunum et le côlon proximal.

L'axe cerveau-intestin constitue le lien entre les processus digestifs et le comportement alimentaire. En particulier, la leptine joue un rôle physiologique dans la régulation de cet axe en modulant l'activité des neurones entériques. Ainsi, une altération de l'axe cerveau-intestin pourrait conduire à d'importants troubles périphériques associés à des maladies psychiatriques telles que la schizophrénie.

Chapitre 2

Conséquences périphériques d'une lésion néonatale de l'hippocampe ventral chez le rat

I. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, la schizophrénie est une maladie psychiatrique caractérisée par une altération des fonctions mentales, des émotions et du comportement et de certains des mécanismes impliqués dans la perception et le jugement (Tamminga & Holcomb, 2005 ; Meyer & Feldon, 2010). La schizophrénie est le résultat comportemental à l'âge adulte d'une aberration périnatale dans les processus neurodéveloppementaux causée par l'interaction d'une prédisposition génétique et de facteurs de risques environnementaux (Tsuang *et al.*, 2001 ; Rapoport *et al.*, 2005). En plus de troubles comportementaux et cognitifs, la schizophrénie a été associée à des perturbations périphériques. Ainsi, les troubles cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité chez les patients atteints de cette maladie (Hennekens *et al.*, 2005). Plus récemment, des études ont mis en évidence un lien entre les troubles cardiovasculaires, alimentaires et métaboliques chez ces patients (Thakore, 2004). La schizophrénie a également été associée à des troubles gastro-intestinaux tels qu'une inflammation ou une perturbation de la motricité digestive (Peupelmann *et al.*, 2009a). Nous avons vu précédemment que ces fonctions alimentaires, métaboliques et digestives ne sont pas indépendantes et sont régulées par l'axe cerveau-intestin. Cependant, à notre connaissance, l'origine des altérations de ces fonctions chez les patients schizophrènes n'a jamais été étudiée.

Par conséquent, les objectifs de cette étude étaient de caractériser la nature des troubles métaboliques et intestinaux chez un modèle animal de schizophrénie et d'envisager un mécanisme à l'origine de ces altérations. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle de lésion néonatale de l'hippocampe ventral chez le rat. En effet, ce modèle est le modèle animal heuristique de schizophrénie le mieux caractérisé à l'heure actuelle. De plus, des perturbations de la balance énergétique sont prévisibles chez les rats NVHL car d'une part ces animaux présentent des troubles du comportement alimentaire (Lecourtier *et al.*, 2012) et d'autre part la lésion détruit des fibres nerveuses qui innervent directement ou indirectement l'hypothalamus, centre de régulation de la balance énergétique (Van Groen & Wyss 1990 ; Chiba 2000).

II. Modèle NVHL

A. Stratégie expérimentale

Le modèle animal heuristique de la schizophrénie repose sur la lésion néonatale et bilatérale de l'hippocampe ventral chez le rat. La lésion est induite par injection d'une substance excitotoxique (acide iboténique) qui entraîne une altération et une destruction par hyperactivation des neurones glutamatergiques dans la zone où il a été injecté. Des animaux âgés de 7 jours (jour postnatal 7 : PN7 ; 15-20 g) sont utilisés car cet âge critique correspond à la phase de vulnérabilité au cours du développement de l'hippocampe chez le fœtus humain (deuxième ou troisième trimestre de grossesse ; Tseng *et al.*, 2009). Enfin, la lésion est réalisée dans l'hippocampe ventral qui correspond à l'hippocampe antérieur chez l'Homme, zone qui présente des anomalies anatomiques chez les patients atteints de schizophrénie.

Comme nous l'avons vu précédemment, la validité du modèle a été vérifiée précédemment en comparant les modifications comportementales, physiologiques et moléculaires chez les rats NVHL à celles des patients atteints de schizophrénie (**Figure 20**).

B. Procédure

Pendant la procédure chirurgicale, les animaux sont maintenus sous anesthésie (inhalation d'isoflurane à 5% puis 3%), sur une couverture chauffante et dans un cadre stéréotaxique (**Figure 28A**). On injecte 0,3 μ L d'acide iboténique (rats NVHL) ou de liquide céphalorachidien (rats pseudo-lésés ou *Sham*) sur une période de 3 minutes de manière bilatérale dans l'hippocampe ventral (distance postérieure de 3,0 mm, latérale de 3,5 mm et ventrale de 5,0 mm du bregma). Suite à cette injection, la peau est suturée (**Figure 28B**). Après leur réveil, les rats sont retournés à la femelle allaitante. Entre PN40 et PN90, les rats sont anesthésiés comme précédemment et sont soumis à une imagerie par résonance magnétique pour petit animal (**Figure 28C**). Une série de 10 coupes (512 * 512 pixels) sur une section de 1 cm de long du cerveau est ainsi obtenue (**Figure 29A**). Après analyse de ces coupes, seuls les rats présentant une lésion symétrique bilatérale de l'hippocampe sont sélectionnés. A l'âge adulte (PN > 56), ces rats sont sacrifiés et différents tissus sont prélevés pour la suite des expériences. Des coupes de cerveau sont réalisées et colorées au crésyl violet : elles permettent de déterminer l'étendue des lésions à un âge plus tardif, en accord avec ce qui fait référence dans la littérature (**Figure 29B**).

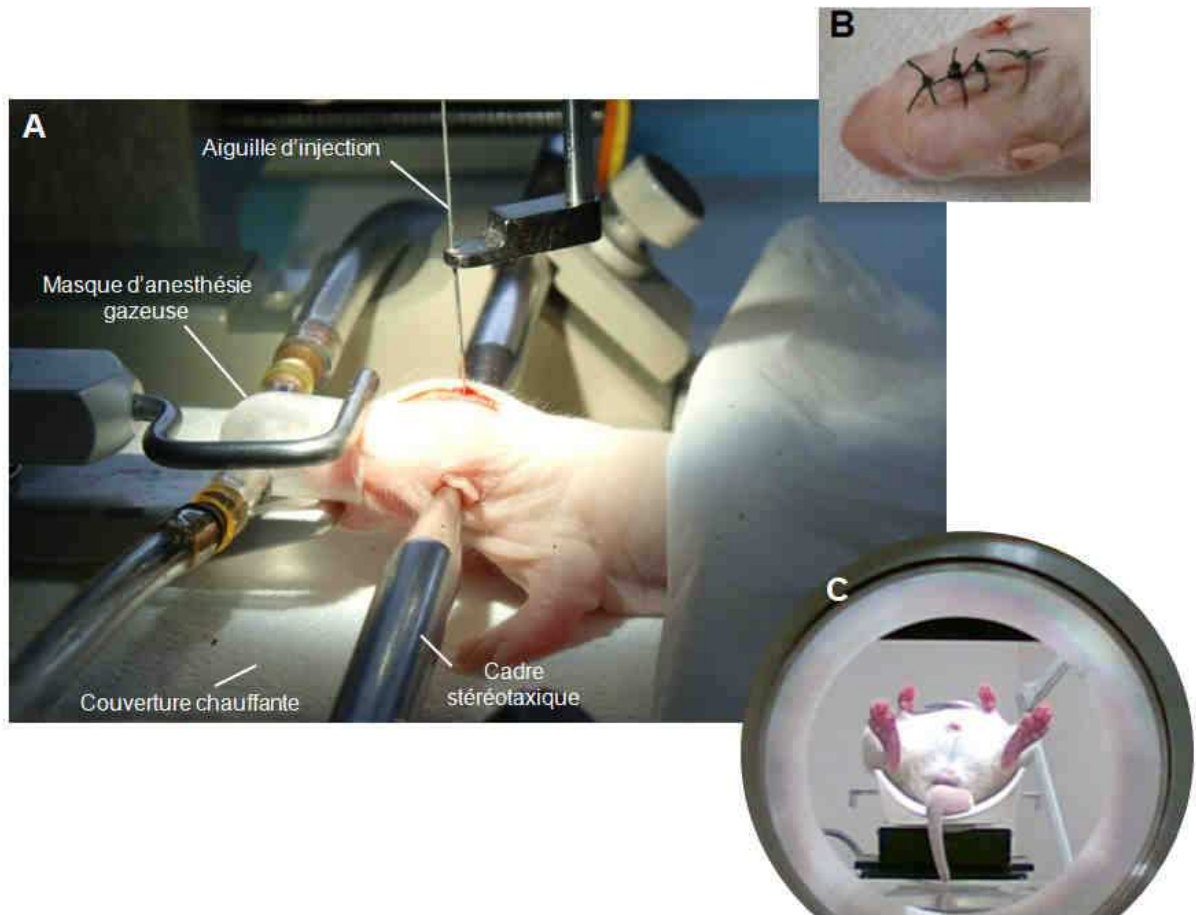


Figure 28 : Procédure expérimentale de lésion néonatale bilatérale de l'hippocampe ventral chez le rat. **A** : injection d'acide iboténique dans l'hippocampe, **B** : suture crânienne, **C** : sélection des animaux présentant une lésion bilatérale de l'hippocampe après imagerie par résonance magnétique. Crédit photo : Florian Voinot (A et B), Guy Sandner (C).

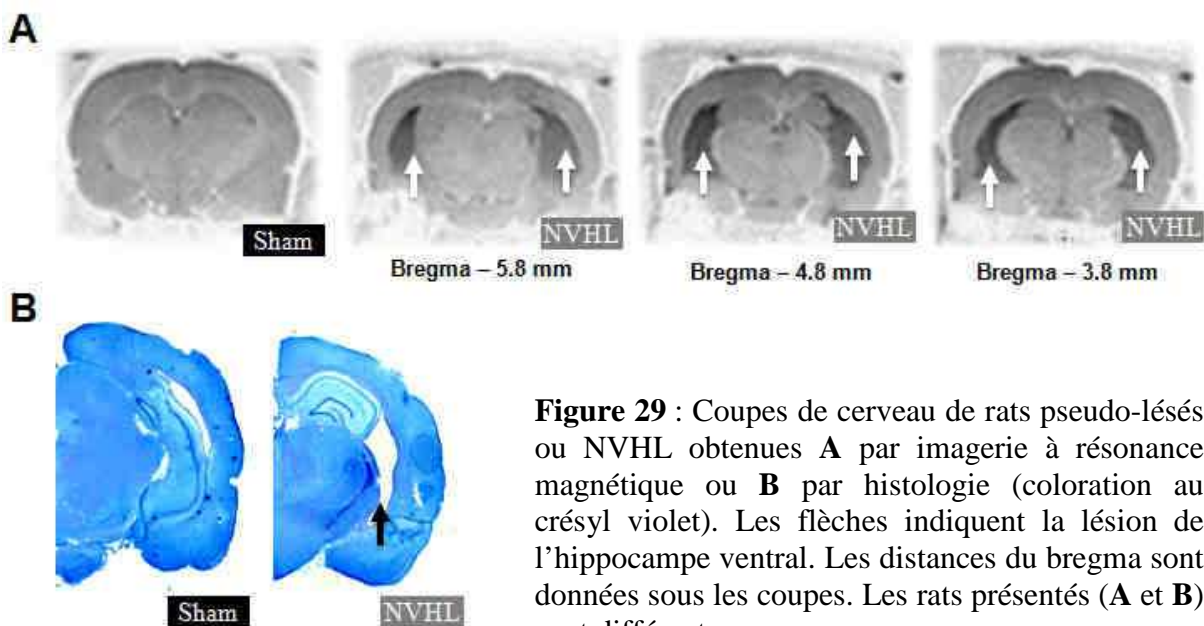


Figure 29 : Coupes de cerveau de rats pseudo-lésés ou NVHL obtenues **A** par imagerie à résonance magnétique ou **B** par histologie (coloration au crésyl violet). Les flèches indiquent la lésion de l'hippocampe ventral. Les distances du bregma sont données sous les coupes. Les rats présentés (**A** et **B**) sont différents.

III. Article de recherche B

**METABOLIC AND INTESTINAL CONSEQUENCES OF THE
NEONATAL VENTRAL HIPPOCAMPAL LESION (NVHL) IN
RATS**

Florian Voinot^{1,3}, Marie-Josée Angst^{2,4}, Caroline Habol^{1,3}, Blandine Guignard^{2,5},
Thierry Guiberteau^{2,5}, Guy Sandner^{2,4} and Fabielle Angel^{1,3}

¹ Université de Strasbourg, IPHC, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France.

² Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg, France

³ CNRS, UMR7178, Strasbourg, France

⁴ INSERM, U666, Strasbourg, France

⁵ CNRS, UMR7237, Strasbourg, France



Article information: In preparation for submission in *Psychoneuroendocrinology*

Abstract

Schizophrenia is a neurodevelopmental disorder becoming manifest through cognitive disorders. Moreover, a diversity of feeding habits and gastrointestinal disorders was observed in schizophrenic patients. Therefore, the present work was aimed at documenting the metabolic and intestinal consequences of the neonatal ventral hippocampal lesion (noted NVHL), known to mimic schizophrenia in rats. Energy storage systems (organ weights, triglycerides and glucose levels) together with circulating hormones governing food intake (cholecystokinin, ghrelin, insulin, leptin, adiponectin and corticosteroids) were evaluated. Several anatomical (muscle layers, mast cells number) and functional (mechanical activities) properties of the digestive tract were also determined. The present data show that NVHL rats weighted less and had less adipose tissue than sham lesioned rats. Decreased plasmatic levels of triglycerides but normal glycaemia were observed in NVHL rats. The plasmatic levels of leptin and adiponectin were low (marginal for the latter). The plasmatic levels of CCK and cortisol were enhanced whereas those of ghrelin, ACTH and corticosterone were unchanged. Moreover, mast cells number and MPO activity were increased in the jejunum of NVHL rats. These alterations were associated with changes in intestinal smooth muscle widths and contractile activities. Our results show that hormonal and neural alterations associated with metabolic and intestinal disorders are observed in NVHL rats, considered as a model of schizophrenia. Further studies need to be undertaken to decipher the mechanisms involved.

Keywords

schizophrenia, NVHL, feeding behaviour, metabolic syndrome, leptin, intestine, inflammation, enteric neurons.

A. Introduction

As suggested by epidemiological studies, schizophrenia is a type of neurodevelopmental disorder originating in the prenatal period of life (Meyer and Feldon, 2010). It becomes manifest in young adults through cognitive perturbations such as attention and memory impairments and minor alterations of sensory-motor capacities (Meyer and Feldon, 2010). A diversity of perturbations of feeding habits was observed in patients. In particular, in a small number of cases, co-morbidity with anorexia nervosa has been reported (Ferguson and Damluji, 1988). More recently, there is growing evidence that a “metabolic syndrome” may occur in schizophrenic patients. The metabolic syndrome is a combination of several factors, such as abdominal obesity, dyslipidemia, high blood pressure and hyperglycemia, that has been correlated with eating disorders (Roehrig et al., 2009) and reduction in energy expenditure (Hamilton et al., 2007). As a treatment by atypical neuroleptics is known to induce a metabolic syndrome, the link between schizophrenia, metabolic and feeding disorders independently from any treatment remains controversial (Thakore, 2004; Sengupta et al., 2008; Padmavati et al., 2010). Furthermore, evidence has been given that some conditions in schizophrenia are associated with an altered appetite, indicating changes in appetite regulation mechanisms (Anselmo et al., 2008). Bruch et al. (1966) suggested that overeating in schizophrenia may be an adaptive defense against stress in the maintenance of self-control which may lead to higher rates of metabolic syndrome components than in the general population (Newcomer, 2007). Despite this evidence, the mechanisms involved in these malfunctions or eating behavior in schizophrenic patients is not yet understood.

Schizophrenia has also been associated with gastrointestinal disorders. In particular, gastrointestinal inflammation has been reported both *post-mortem* (Buscaino, 1953) and *in vivo* in schizophrenic patients in presence or in absence of any antipsychotic treatment (Severance et al., 2012). Moreover, alterations in gastrointestinal tract motility, probably resulting from impaired functions of autonomic nervous system, have been observed in schizophrenic patients (Peupelmann et al., 2009). It is now well known that the brain and periphery interact constantly through somatomotor, autonomic, and neurohumoral pathways and this interaction is involved in energy intake, expenditure and storage. The gastrointestinal tract plays a major role in this context (Konturek et al., 2004).

Neonatal lesioning of the ventral hippocampus (NVHL) in rats is known to produce an animal model currently used to illustrate the neurodevelopmental hypothesis of

schizophrenia (Tseng et al., 2009). It consists in causing hippocampal damage at the end of the first week of life. The lesion indirectly elicits some modifications in brain development which are now regarded as crucial for the validity of this model (Meyer and Feldon, 2010). Its behavioural effects were reversed with atypical neuroleptic drugs (Le Pen and Moreau, 2002). Relevant for the purpose of the present research is the observation of contradictory body weight perturbations following hippocampal lesion. Indeed, adults rats with lesions of the ventral hippocampus exhibited enhanced food intake and body weight (Davidson et al., 2009). But, several authors reported that NVHL rats lost weight (Lecourtier et al., 2012). By analogy to what was found in patients, we postulated that this could reflect a modification of the management of the peripheral functions by the central nervous system through the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and vagal nerves or an expansion of the neuro-developmental disorder produced by the lesion to the autonomic nervous system.

The present work is therefore aimed at documenting the metabolic and intestinal consequences in the NVHL model. Energy storage systems (organ weights, triglycerides and glucose levels) together with circulating hormones governing food intake (cholecystokinin, ghrelin, insulin, leptin, adiponectin and corticosteroids) were evaluated. Several anatomical (muscle layers, mast cells number) and functional (mechanical activities) properties of the digestive tract were also determined.

B. Methods

1. Ethical considerations, surgeries and selection of the subjects

All procedures had been approved by the ethic committee of Strasbourg (CREMEAS-AL/03/03/02/10). They complied with the 1986 European Council Directive (86/609/EEC), in keeping with the “Declaration of Helsinki”. They were conducted by researchers approved by the French Ministry of Agriculture. Every effort was made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Five Sprague Dawley dam rats, each with six male pups, were purchased from Charles River, France, and housed on a 14/10-hour light/dark cycle (lights on at 0700h) with food and water available *ad libitum*. The pups were microinjected with ibotenate or artificial cerebrospinal fluid at the age of seven days (see surgeries, below). Magnetic Resonance

Imaging (MRI) was conducted for evaluating the aspect and size of the lesions for selecting the subjects. At six weeks, they were weaned and kept two per cage.

Surgical procedures, similar to those used by others (review in Tseng et al., 2009), were performed at PN7 under isoflurane anaesthesia as detailed previously (Sandner et al., 2010). Ibotenic acid (Sigma, France, 0.3 μ L, 10 μ g/mL, pH 7.4) in the case of NVHL rats (n = 18), or artificial cerebrospinal fluid in the case of sham lesioned control rats (n = 12) was infused bilaterally into the ventral hippocampus. The skin was sutured, and the pups were allowed to recover on a heating pad before being returned to their dam.

One month old rats injected with ibotenic acid were subjected to a MRI session under isoflurane anaesthesia using a scanner dedicated to small animals operating at 4.7 T (TR/TE/TEeff: 3000/ 30 ms/ 60 ms) and belonging to the Biophysics Department (UMR 7191) of Strasbourg University Faculty of Medicine. A series of 10 slices (512 x 512 pixels) was generated over a 1 cm long section of the brain, rostral to the cerebellum-cerebrum gap. Only 9/18 rats presenting a quasi-symmetrical bilateral lesion were included in the study (see **Figure 1**).

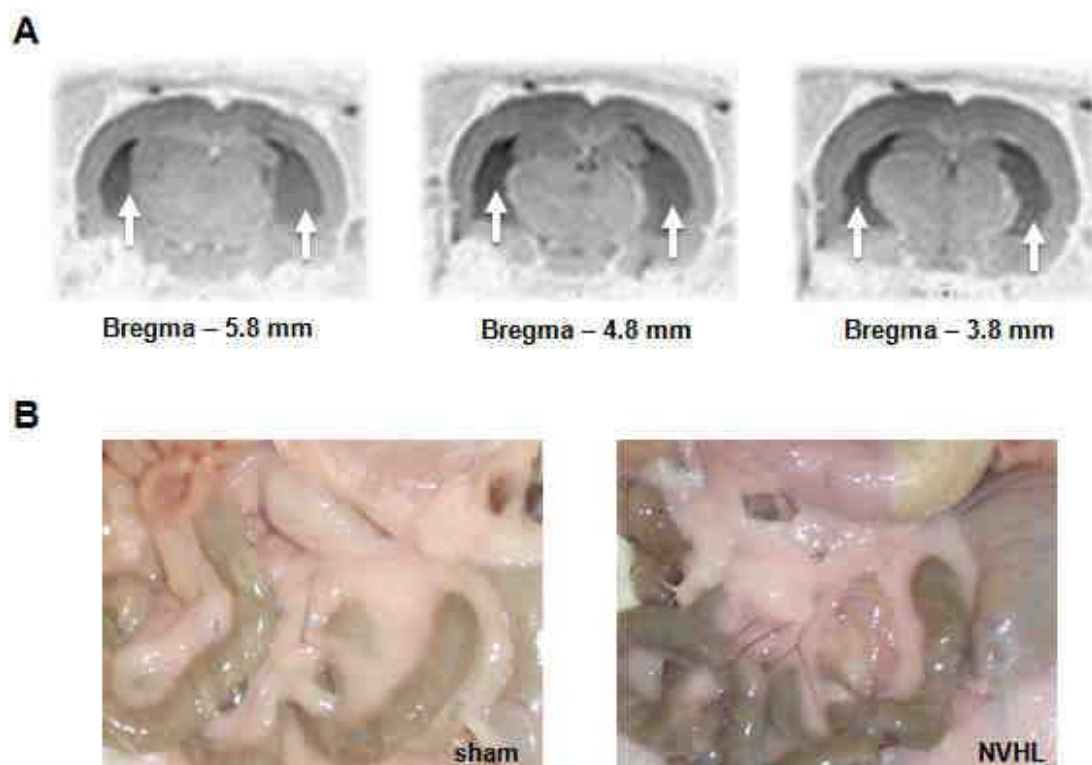


Figure 1: Anatomical observations in sham and NVHL rats. **A** MRI reconstructions of a typical lesion used to select rats for the experiments. The arrows point to the lesioned ventral hippocampus. The distance from bregma is indicated under each section. **B** Photographs showing the ischemic-looking appearance of the intestine of sham (left) compared to NVHL rats (right).

The MRI sections served also to evaluate the volume of the lesions. This procedure was considered more reliable than histological procedures insofar as the slicing process modifies the size of the lesions. Lesioned areas were drawn on brain MRI coronal slices. The number of pixels was added together and represents the volume estimates on which statistical tests were conducted (Sandner et al., 2010).

2. Tissue and blood plasma sampling

NVHL (n = 9) and sham lesioned (n = 9) adult rats (3 to 4 month old) rats were anaesthetized with 2% isoflurane and were decapitated. Blood was immediately collected and centrifuged before the supernatant was collected and stored at -80°C. The jejunum and proximal colon were photographed (see **Figure 1**), removed, placed onto an ice-cold plate for histological and motility analyses. Visceral organs were removed and weighted. The brains of the NVHL rats were also collected.

3. Plasma and tissue assays

Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) were carried out according to the manufacturer's protocol to determine the plasmatic levels of insulin (Rat insulin ultrasensitive ELISA Kit; Alpco Diagnostics, Salem, USA), ghrelin (Rat unacylated Ghrelin ELISA Kit; Biovondor, Heidelberg, Germany), adiponectin (Rat adiponectin ELISA kit, Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France), leptin (Rat leptin ELISA kit, Millipore, St. Charles, USA), cortisol (Cortisol ELISA kit; Demeditec diagnostics, Kiel-Wellsee, Germany), CCK (Cholecystokinin octapeptide 26-33, non-sulfated, EIA Kit) and ACTH (Adrenocorticotrophic hormone ELISA kit; Phoenix Pharmaceuticals, Strasbourg, France) and corticosterone, (Corticosterone ELISA kit ; Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France). The plasmatic levels of triglycerides and glucose (Triglycerides and Glucose detection kit, Randox, Mauguio, France) were assessed using colorimetric detection kits.

The extent of neutrophil infiltration in the jejunum and proximal colon was evaluated by measuring MPO activity. Briefly, frozen tissue samples were weighted and suspended (25 mg/mL) in 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexa-1,6-bis-decyltrimethylammonium bromide (HTAB, Sigma-Aldrich, Lyon, France). The suspension was freeze-thawed three times and centrifuged at 14 000 rpm for 8 min at 4°C. The

supernatant was then added to a solution of 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma) and hydrogen peroxide in a 96 well microplate. The reaction was terminated by adding sulphuric acid. The absorbance of the colorimetric reaction was measured at 450 nm using a spectrophotometer (Infinite M200, Tecan, Lyon, France). Results were expressed as change in optical density per g of tissue.

4. *Ex vivo* organ bath studies

Jejunum and proximal colon segments were placed in a Petri dish containing a physiological Krebs solution (in mM: 119.8 NaCl, 16.2 C₆H₁₂O₆, 15.5 NaHCO₃, 5.8 KCl, 2.5 CaCl₂.H₂O, 2.0 NaH₂PO₄.H₂O, 1.2 MgCl₂.H₂O, pH 7.4). The segments were then rinsed off their intra-luminal content. Longitudinally oriented muscle strips from jejunum (LMJ; 10 x 5 mm) and circular oriented muscle strips from proximal colon (CMPC; 3 mm) were mounted in organ bath chambers containing 10 ml of warmed (37°C) and gassed (95% O₂, 5% CO₂) Krebs solution. Smooth muscle mechanical activities of jejunum and proximal colon were measured by means of an isometric force transducer (Fort25, WPI, Aston, UK) and amplifier (Lab-Trax-4/24T, WPI, Aston, UK) and were visualized on a computer (HP Compaq 8000, Hewlett-Packard, USA).

At the beginning of each experiment, strips were stretched to their optimal resting tension (value of tone with optimal contractile responses), which was achieved by step-wise increases in tension until basal tone reached stable amplitude of 9.8 mN. Strips were allowed to equilibrate for 60 min. Transmural electrical nerve stimulation (TNS) was applied via two stainless steel electrodes, placed 10 mm apart. Square wave pulses of 15 V intensity, 10 Hz frequency and 200 µs duration during 10 s periods were used.

Data Analyses were performed using Datatrax (Datatrax 2.0, WPI, Aston, UK). Spontaneous mechanical activities (SMA) were analyzed by measuring the tone and the amplitude and frequency of spontaneous contractions. Tone and contraction amplitudes were expressed in millinewtons per mg of fresh tissue (mN/mg). Frequency of contractions was expressed in contractions per minute (cpm). The relaxation and the off-contraction induced by TNS were measured as the area under the curve (in g.s-1). Amplitude of each component of the TNS-induced response varied considerably from one strip to another; therefore, each muscle strip was considered as its own control. Motility parameters were evaluated on two to four jejunal and colonic strips per animal.

5. Histology

Jejunum and proximal colon samples (2 cm) were fixed for at least 6 h in 3% paraformaldehyde at 4°C, then dehydrated and embedded in paraffin for tissue sectioning. Tissue sections (5 µm thick) were then cleared of paraffin and rehydrated. For measuring the width of each layer of jejunum and colon, trichrome staining was performed following a standard protocol. Fifty different areas were examined. For visualizing tissue mast cells (MC), jejunal and colonic sections were stained with 0.5% toluidine blue (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France,) in 0.5 N HCl for 30 min, rinsed in water for 5-10 min, differentiated in 95% alcohol before being cleared and mounted in Eukitt (EMS, Hatfield, USA). The slides were then observed under a microscope (Zeiss Axioplan, Zeiss, Le Pecq, France), before twenty high-power fields (x 630) were randomly selected. Then, the number of MC was determined.

The lesioned brain region was stored for a few days in 4% formalin with 20% sucrose, sliced into 20 µm coronal sections, and then stained with cresyl violet.

6. Data and statistical analyses

The results report data from groups of 9 rats except for the *ex vivo* experiment having its sham lesioned group reduced to 8 subjects because of technical difficulties. Data were expressed as mean ± SEM.

When only one parameter and one organ were considered, a t-Test was used for comparing data from NVHL to sham lesioned rats. When the same measurement was obtained from several organs, for instance their weight, an ANOVA was computed with the lesion status as a between group factor and all organs as within group factor, for instance colon versus jejunum. When several measurements were done in the same organ we considered them as another within group factor, for instance longitudinal versus circular muscles. The results for the main “organ factor” will not be mentioned below in the result section because highly predicted, for instance the difference in dimension between colon and jejunum is obvious. A regression was computed and plotted between each measured parameter and the lesion size. The statistical threshold was set to $p < 0.05$.

C. Results

1. Macroscopic aspects of the brain lesions and of the digestive tract of NVHL rats

Figure 1A shows the aspect of typical lesions visualized with MRI techniques. Histology confirmed the extension of the lesions. They destroyed partially or totally the ventral hippocampus bilaterally. **Figure 1B** illustrates the difference of the aspect of the digestive tract in NVHL and sham lesioned rats. These photographs show the ischemic-looking appearance of the intestine of NVHL rats.

2. Body, organ weights and muscle layer widths

The body weight (BW) of adult rats with NVHL was 12% less than in sham-lesioned rats (461 ± 13 g versus 522 ± 11 g; $t = -3.56$, $p < 0.01$). It is illustrated by the bar graph of **Figure 2A**. The lesion yielded a significant effect ($F_{1, 16} = 8.57$, $p < 0.01$) and it interacted with the organ factor ($F_{7, 112} = 11.04$, $p < 0.0001$) indicating that lesion had a differential effect according to the organ considered. Visceral adipose tissue weighed less in NVHL rats compared to sham-lesioned rats (3.54 ± 0.31 versus 4.60 ± 0.29 mg/g BW; $t = -2.51$, $p < 0.05$). But the stomach (2.06 ± 0.11 versus 1.34 ± 0.13 mg/g BW; $t = 4.16$, $p < 0.001$), testicles (0.81 ± 0.03 versus 0.73 ± 0.03 mg/g BW; $t = 2.17$, $p < 0.05$) and epididymis (0.14 ± 0.02 versus 0.12 ± 0.02 mg/g BW; $t = 2.16$, $p < 0.05$) were heavier in NVHL rats compared to sham-lesioned rats. The difference was marginal for the livers ($p \# 0.06$, NVHL < sham lesioned rats) and not significant for heart, kidneys and spleen. An illustration is provided in the form of bar graphs of **Figure 2B**.

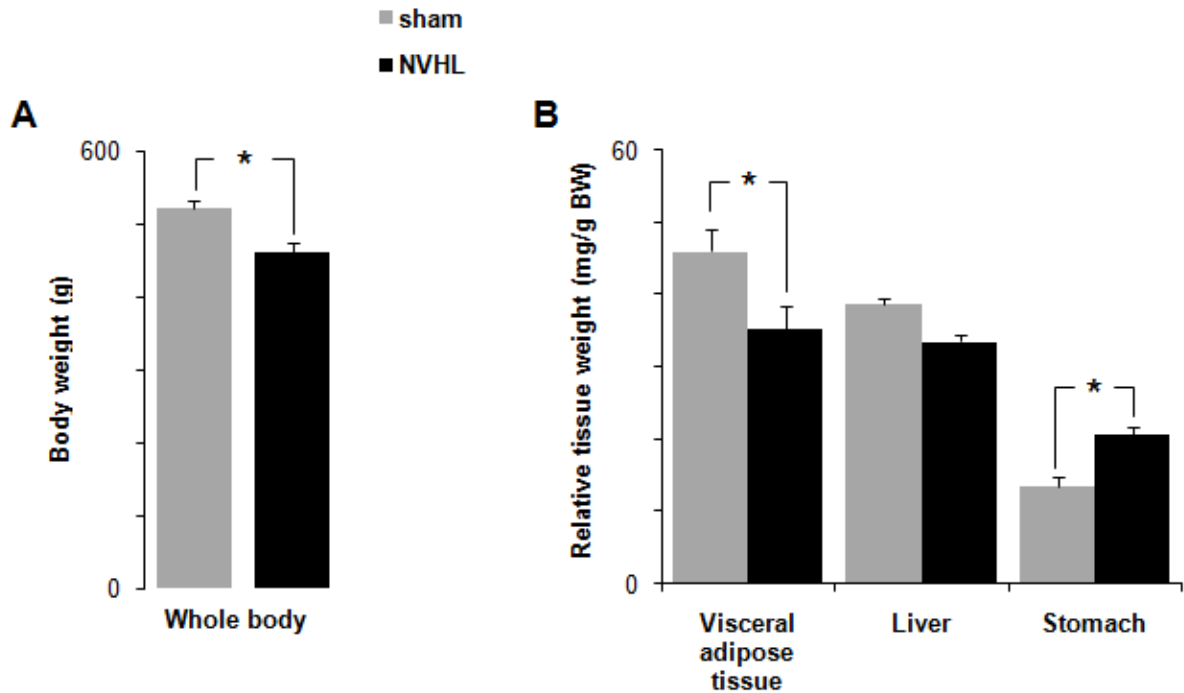


Figure 2: **A** Body and **B** tissue weights in sham (open bar) and NVHL rats (filled bar). Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, statistically significant difference between NVHL and sham rats.

The lesion yielded a differential effect on gut smooth muscles width according to the organ considered, namely jejunum or colon ($F_{1,16} = 22.55$, $p < 0.001$), the orientation of the muscle considered, namely longitudinal or circular ($F_{1,16} = 7.00$, $p < 0.05$). The triple interaction lesion \times organ \times muscle was significant ($F_{1,16} = 16.42$, $p < 0.001$) indicating that the intestine was differently affected by the lesion according to the muscle considered. The circular and longitudinal muscles of the jejunum were thinner whereas these muscles were thicker in the colon of NVHL rats. This is illustrated in **Figure 3A** and **3B** respectively. In other words, jejunum and colon showed totally opposite muscle sizes. This confirmed the aspect of these organs noticed during the autopsy. The thickness of the mucosa did not differ between NVHL and sham lesioned rats ($F_{1,16} = 0.08$, NS, interaction: $F_{1,16} = 1.65$, NS). **3.3.**

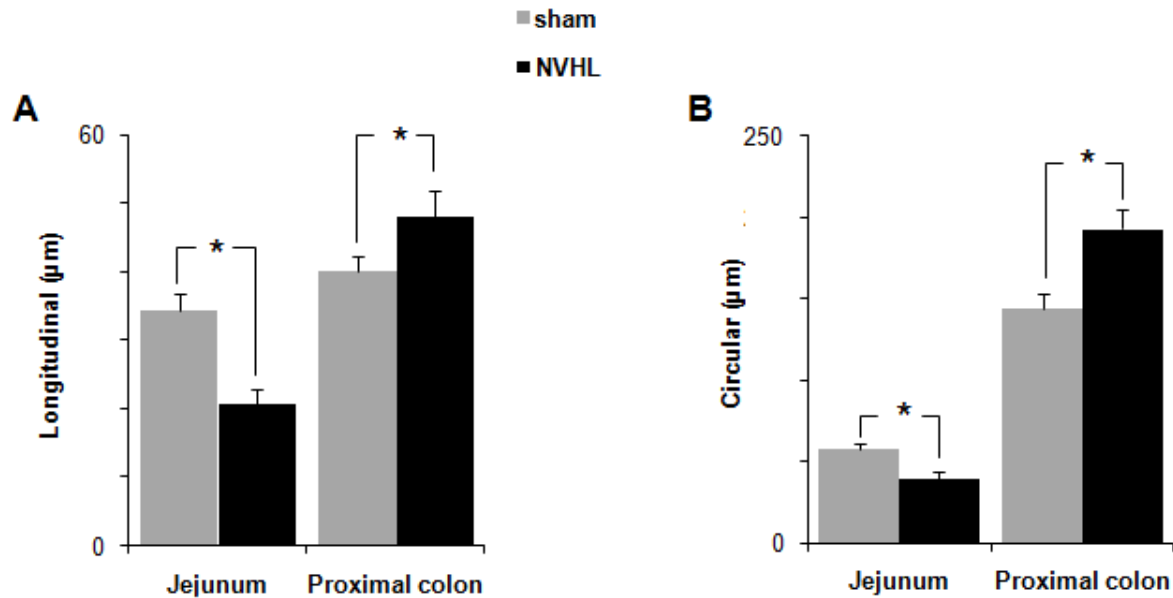


Figure 3: Smooth muscle layers of jejunum and proximal colon in sham (open bar) and NVHL rats (filled bar). The width of **A** longitudinal and **B** circular smooth muscles were measured. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, statistically significant difference between NVHL and sham rats.

3. Plasmatic assays

NVHL rats showed decreased plasmatic levels of triglycerides ($t = -2.22$, $p < 0.05$), but same glycaemia compared to sham lesioned rats ($t = -0.48$, NS). The plasmatic levels of leptin were significantly lower ($t = -3.08$, $p < 0.01$). The plasmatic level of adiponectin was only marginally lower ($t = -2.00$, $p \# 0.06$). The plasmatic levels of cortisol and CCK were higher (respectively $t = 2.38$, $p < 0.05$ and $t = 2.40$, $p < 0.05$). The plasmatic levels of insulin, ghrelin, corticosterone and ACTH were not significantly different between both groups of rats (respectively $t = 0.42$, -0.69 , 1.72 and -0.18). Detailed results are given in **Table 1**.

Circulating substance	Sham	NVHL
Triglycerides (mg/dl)	195,1 \pm 12,2	155,8 \pm 12,2 *
Glucose (mg/dl)	174,3 \pm 4,5	191,8 \pm 4,7
Insulin (pg/mL)	804 \pm 82	875 \pm 117
Ghrelin (pg/ml)	1363 \pm 179	1202 \pm 150
CCK-8 (pg/ml)	322 \pm 18	369 \pm 13 *
Adiponectin (ng/ml)	14463 \pm 1180	11798 \pm 695
Leptin (pg/ml)	2946 \pm 336	1608 \pm 276 *
Cortisol (ng/ml)	39,7 \pm 6,0	62,6 \pm 8,9 *
Corticosterone (ng/mL)	90,7 \pm 7,2	116,8 \pm 10,9
ACTH (pg/ml)	7909 \pm 802	7919 \pm 715

Table 1: Plasmatic levels of several circulating substances in sham and NVHL rats. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$, statistically significant difference between NVHL and sham rats.

4. Inflammatory substances in the jejunum and colon

MPO activity was significantly higher in the jejunum of NVHL rats ($F_{1,16} = 28.64$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{1,16} = 29.33$, $p < 0.0001$). This is illustrated by the bar graph of **Figure 4A**. ANOVAs showed an increased density in mast cells number, but in the jejunum only in NVHL rats ($F_{1,16} = 7.18$, $p < 0.05$; interaction: $F_{1,16} = 11.41$, $p < 0.01$). This is illustrated by the bar graph of **Figure 4B**.

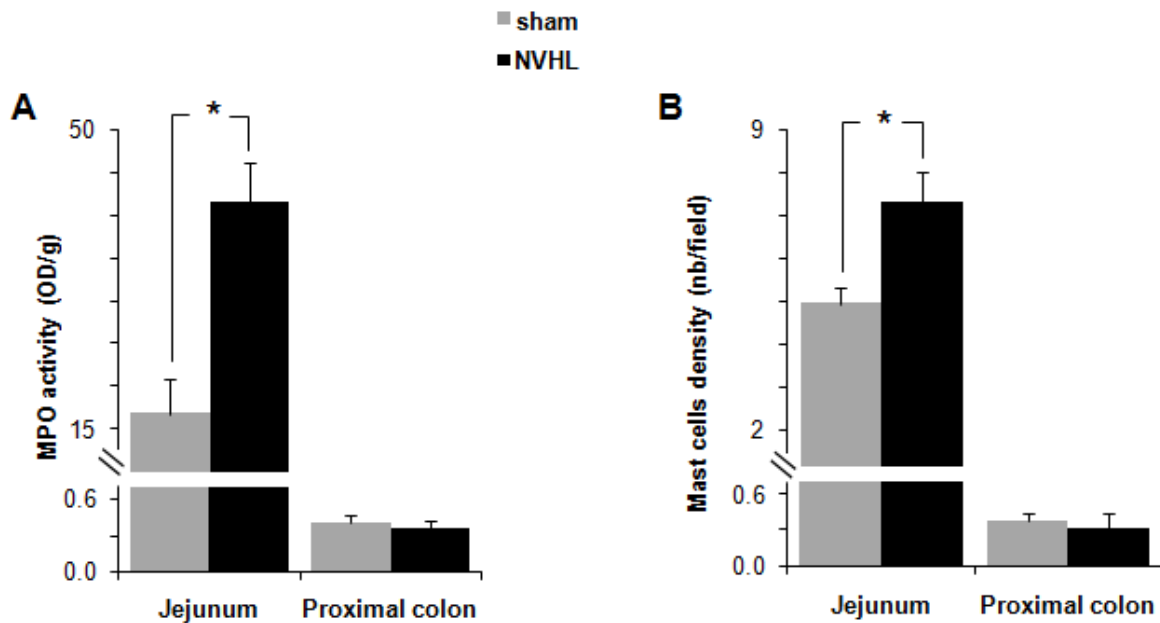


Figure 4: Inflammatory markers in jejunum and proximal colon of sham (open bar) and NVHL rats (filled bar). **A** Myeloperoxidase (MPO) activity and **B** mast cells number per visual field were determined. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, statistically significant difference between NVHL and sham rats.

5. Organ bath studies

The jejunum longitudinal muscle layer developed SMA characterized by a spontaneous tone (defined as basal tone) and small rhythmic contractions (frequency: 33 ± 0.5 cpm). Likewise, the CMPC showed SMA characterized by a basal tone but large contractions (frequency: 1.2 ± 0.3 cpm), superimposed on the small rhythmic contractions (frequency: 11 ± 0.3 cpm). The frequencies were unaffected by the lesion ($F_{1,15} = 0.26$, NS; interaction: $F_{1,15} = 1.28$, NS).

According to the results of ANOVAs, the basal tone was higher in NVHL rats, but only in the jejunum ($F_{1,15} = 0.89$, NS; interaction: $F_{1,15} = 11.08$, $p < 0.01$). The amplitudes

of the spontaneous small contractions were larger in NVHL rats both in the jejunum and the colon ($F_{1,15} = 15.38$, $p < 0.01$; interaction: $F_{1,15} = 0.17$, NS). The amplitude of the large spontaneous contractions of the colon did not differ between NVHL and sham lesioned rats ($t = 1.38$, NS).

Electrical stimulation applied to intramural enteric neurons elicited muscle mechanical responses. These responses consisted in a phase of relaxation followed by contraction just after the end of stimulation ("off-stimulation" response). According to the results of the ANOVAs, the contraction induced by TNS was higher in NVHL rats but only in the proximal colon ($F_{1,15} = 8.9$, $p < 0.05$; interaction: $F_{1,15} = 0.83$, NS). Detailed results are given in **Table 2**.

Group	SMA					Mechanical response to TNS	
	Basal tone (mN/mg)	Small rhythmic contractions		Large contractions		R area (g/s)	C area (g/s)
		Amplitude (mN/mg)	Frequency (cpm)	Amplitude (mN/mg)	Frequency (cpm)		
LMJ							
Sham	0.150 ± 0.13	0.015 ± 0.002	33.1 ± 0.5	/	/	0.010 ± 0.001	2.8 ± 0.3
NVHL	0.197 ± 0.14 *	0.027 ± 0.005 *	33.2 ± 0.5	/	/	0.013 ± 0.003	1.9 ± 0.4
CMPC							
Sham	0.120 ± 0.10	0.035 ± 0.002	10.1 ± 0.3	1.6 ± 0.1	0.151 ± 0.017	0.027 ± 0.008	24.3 ± 2.7
NVHL	0.092 ± 0.05	0.053 ± 0.005 *	11.0 ± 0.3 *	1.4 ± 0.2	0.179 ± 0.023	0.028 ± 0.006	33.9 ± 4.1 *

Table 2: *Ex vivo* organ bath studies of jejunum and proximal colon in sham and NVHL rats. Longitudinal smooth muscle of jejunum (LMJ) and circular smooth muscle of proximal colon (CMPC) in sham rats developed spontaneous mechanical activities (SMA) and mechanical responses to electrical transmural nerve stimulation (TNS) in normal Krebs solution. Mechanical response to TNS is composed of a relaxation (R) and an off-contraction (C) at the end of stimulation. Data are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$, statistically significant difference between NVHL and sham rats.

D. Discussion

To summarize, the present data show that NVHL rats weighed less than sham lesioned rats, according to previous study (Lecourtier et al., 2012). This constituted the main objective of the present study intended at getting insight into the causes of this light weight deficit. Even expressed relative to the body weight, NVHL rats had less adipose tissue and their livers weighed marginally less. A number of other organs were unaffected, for instance heart,

kidneys and spleen; some were even heavier, for instance the stomach, testicles and epididymis. Decreased plasmatic levels of triglycerides were observed in NVHL rats, although they had a normal glycaemia. Taken together this indicates a decreased stock in energy storage substances. Concerning the circulating hormones regulating food intake, the plasmatic levels of leptin and adiponectin were low, although marginal for the latter. The plasmatic levels of CCK were enhanced, but not those of ghrelin. Contrasting with enhanced cortisol in NVHL rats, ACTH and corticosterone levels were not significantly different from those in sham lesioned controls.

Concerning a possible contribution of modified intestinal functions, several anatomical and functional properties were considered. Muscle widths were smaller in the jejunum but larger in the colon of NVHL rats. The jejunum developed increased basal tone in NVHL rats. The spontaneous contractions displayed larger amplitudes both in the jejunum and the colon. The excitatory response to electrical intrinsic nerve stimulation was increased in the proximal colon. Indices of inflammation in the jejunum consisted in an increased density of mast cells. Furthermore, MPO activity was increased in NVHL rat jejunum.

1. Hormonal and metabolic alterations in NVHL rats

The plasmatic level of adiponectin was lower in NVHL rats (-18%) compared to that in sham lesioned rats. This result is contradictory to the fact that NVHL rats displayed lower level of circulating triglycerides (-20%) as well as loss of weight of body (-12%) and adipose tissue (-23%). Indeed, hypoadiponectinemia has been shown to be associated with the prevalence of metabolic syndrome-related disorders, in particular obesity (Weyer et al., 2001) and dyslipidemia (Matsubara et al., 2002). On the other hand, adiponectin can attenuate chronic inflammation through modulating the function and phenotype of macrophages (Ohashi et al., 2012). The low levels of plasmatic adiponectin may explain the maintenance of intestinal inflammation (see below). Moreover, an association between low levels of adiponectin and psychiatric diseases, in particular depression, has been suggested (Taylor and MacQueen, 2010). Although the adiponectin receptors have been localized in the hypothalamus, brainstem, cortical neurons, in pituitary extracts and in the hippocampus (Jeon et al., 2009; Thundyil et al., 2012), the role of their signaling in the brain and the consequences on brain disorders are not yet understood. One hypothesis is that these receptors

are altered in NVHL rats. Further experiments are needed to elucidate why low levels of adiponectin are correlated with reduced body weights.

The plasmatic levels of leptin were significantly decreased in NVHL rats (-45%). This result is consistent with the studies showing that leptin is mainly secreted by white adipose tissue in direct proportion to the amount of stored body fat and body weight (Considine et al., 1996). Circulating leptin has been shown to act on the hypothalamus, involved in energy balance regulation and autonomic functions, and on the hippocampus to suppress food intake (Kanoski et al., 2011; Pénicaud et al., 2012). In our study, leptin may signal that the body of NVHL rats does not dispose of enough energizing substances or is unable to store them. But, the conditions for this storage were preserved. Indeed, the blood levels of glucose and insulin were not altered. In these conditions, the low level of leptin should have triggered feeding behaviours except if this property was cancelled out by another hormone or if leptin did not meet functional receptors in the hippocampus (Lathe, 2001) or in the medio-basal hypothalamus (Williams et al., 2009), for instance due to a modification of the brain directly or indirectly elicited by the neonatal lesion. Moreover, leptin may act on a variety of brain areas to influence mood, emotions, motivation, learning, memory and cognitive function (Morrison, 2009) and leptin deficiency may contribute to the pathophysiology of depression (Lu, 2007). Thus, the potential dysregulation of leptin signalling in the hippocampus might be associated to the alteration of these functions observed in NVHL rats.

The plasmatic levels of CCK were significantly increased in NVHL rats (+15 %). CCK is released by the duodenal and jejunal mucosa (Liddle et al., 1985), decreases food intake and therefore is considered as a hunger suppressant hormone (Tsujino et al., 2005). Combined with the absence of increase of circulating ghrelin, an important hunger stimulator, CCK could have a determinant hunger suppression effect which supports the first of these hypotheses. Testing the alternate or complementary hypothesis, namely modified sensitivity of the hypothalamus to leptin and/or CCK and/or ghrelin, require complementary histochemical studies.

Concerning the involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, there was no difference between NVHL rats and sham lesioned controls as indicated by the level of ACTH and corticosterone, the main glucocorticoid in rats that is involved in regulation of fuel, immune reactions, and stress responses (Hadley and Levine, 2007). Contrasting with this hormone, cortisol appeared enhanced in the blood of NVHL rats (59% more than sham

lesioned rats) which is difficult to interpret. But studies on circadian rhythms have provided evidence that adrenal secretion is not only regulated by ACTH but also sympathetic innervation (Engeland and Arnhold, 2005). If we assume the possibility for the latter pathway to differentially control the production of cortisol versus corticosterone in rats, for instance at the level of the 17α -hydroxylase enzyme, then we have also to accept the suggestion of a modified management of the neurovegetative nervous system in NVHL (Engeland and Arnhold, 2005). This aspect of our results has also a clinical relevance as such dissociation between ACTH and cortisol was observed in patients with schizophrenia (Brunelin et al., 2008).

2. Functional and morphological modifications of the intestine of NVHL rats

Firstly, the observation of an “ischemic” aspect of the intestine in NVHL rats may reflect a chronic inflammatory state. Indeed, diminished vascular perfusion of the mucosal surface has been described in chronic inflammatory states in humans leading to hypoxia and damages of the intestinal mucosa (Funayama et al., 1999). However, the intestinal mucosa seems to be macroscopically unaltered in the present experiments. Therefore, the question remains about the origin and the cause of the “ischemic”-like appearance of the intestine in NVHL rats.

Secondly, two signs of inflammation were observed only in the jejunum of NVHL rats: an enhanced level of MPO activity and a high density of mast cells. Enhanced sensitivity of the immune system may correspond to reduced vagal activity because of a neuronal control of the intestine known as the cholinergic anti-inflammatory pathway (De Winter and De Man, 2010). Indeed, the vagus nerve is the primary neuroanatomical substrate in the gut–brain axis, connecting the intestine with the brain stem to coordinate digestive functions (Schwartz, 2000) and to modulate the immune system (Dantzer et al., 2000). Indeed, intestinal inflammation is detected by vagal afferents triggering activation of the nucleus of the solitary tract and generating in return a specific vagal control to decrease inflammation (Cailotto et al., 2011). Therefore, if the brain-gut axis function is impaired in the NVHL model, it can be expected that the vagus nerve will not exert anymore its anti-inflammatory action.

Thirdly, the present data give evidence for alterations in motility pattern of intestine and colon of NVHL rats. Spontaneous contractions and basal tone were enhanced in the

jejunum. Moreover, spontaneous contractions as well as excitatory response to electrical intrinsic nerve stimulation were increased in the proximal colon. It was also observed that smooth muscle layer widths of the jejunum were thinner whereas the smooth muscle layer widths of the colon were thicker. It is known that there is a complex multidirectional interaction between immune and inflammatory cells, neurons and smooth muscle cells in the inflamed intestine (De Winter and De Man, 2010). It has been shown that inflammation induces functional changes in the enteric nervous system (Torrents and Vergara, 2000), through a dysfunction in neuronal regulatory mechanisms (De Man et al., 2003). An increase in wall thickness due to hyperplasia and hypertrophy in intestinal smooth muscles has also been observed in inflammatory states (Blennerhassett et al., 1992) which is not consistent with the present data on the inflamed intestine of NVHL rats which is thinner and the non-inflamed colon which seems to be hypertrophied. This particular point has to be further investigated.

3. Conclusions and prospects.

Our results showed that hormonal and neural alterations associated with peripheral and intestinal disorders are observed in NVHL rats, a model of schizophrenia. Despite rapidly growing evidence supporting a link between psychological disorders and visceral physiopathology (North et al., 2007; Taylor and MacQueen, 2010; Wu, 2012), the mechanisms underlying these interactions remain infrequently studied and rather poorly understood. The possible causal link involves functional abnormalities in various components of the brain-gut axis, which may include hormonal (from the gastrointestinal tract, the adipose tissue, the pancreas and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis) as well as neural system (sympathetic, parasympathetic and enteric nervous system).

We are conscious about the complex picture that emerges from the present observations on the neurovegetative aspect of the regulation of food intake and digestion in NVHL rats. But, it is of major importance to have shown and started to explore the neurovegetative consequences of the neonatal hippocampus lesion. It opens the gate to more specific studies. The subsequent reflections generate prospects for studies on patients. On another hand, better insight in the reciprocal modification of the top-down management of the digestive tract as well as other neurovegetative targets of the vagus nerve may constitute another interesting target for future studies. Understanding how the lesion produced such

effects and how they affect behaviour may help to imagine what happens in the modeled disease even if, at first glance, some of aspects of the comparison between the model and the disease are extremely controversial.

Acknowledgements

This study was financially supported by INSERM and CNRS. Careful technical assistance of Caroline Fischer and Camille Schmidt is gratefully acknowledged.

References

- Anselmo, K., Stip, E., Mancini-Marie, A., Mendrek, A., Ait Bentaleb, L., Lipp, O., Letourneau, G., Léouffre, P., Pampoulova, T., Feltrin, C., Delisle, M.C., Lalonde, P., 2008. Ghrelin and leptin serum levels in olanzapine-induced eating behavior control disinhibition: A prospective study. *Schizophr. Res.* 98, 22.
- Blennerhassett, M.G., Vignjevic, P., Vermillion, D.L., Collins, S.M., 1992. Inflammation causes hyperplasia and hypertrophy in smooth muscle of rat small intestine. *Am. J. Physiol.* 262, G1041–1046.
- Bruch, H., 1966. Eating disorders and schizophrenia, in: *Psychoneurosis and Schizophrenia*. G.L. Usdin, H. Bruch (Eds.), J.B. Lippincott, Philadelphia, pp. 113–124.
- Brunelin, J., d' Amato, T., van Os, J., Cochet, A., Suaud-Chagny, M.-F., Saoud, M., 2008. Effects of acute metabolic stress on the dopaminergic and pituitary–adrenal axis activity in patients with schizophrenia, their unaffected siblings and controls. *Schizophr. Res.* 100, 206–211.
- Buscaino, V.M., 1953. Patologia extraneurale della schizofrenia: fegato, tubo digerente, sistema reticolo-endoteliale. *Acta Neurologica* 8, 1–60.
- Cailotto, C., Costes, L.M.M., van der Vliet, J., VAN Bree, S.H.W., VAN Heerikhuizen, J.J., Buijs, R.M., Boeckxstaens, G.E., 2011. Neuroanatomical evidence demonstrating the existence of the vagal anti-inflammatory reflex in the intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 191–e93.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., 1996. Serum

- immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334, 292–295.
- Dantzer, R., Konsman, J.-P., Bluthé, R.-M., Kelley, K.W., 2000. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton. Neurosci.* 85, 60–65.
- Davidson, T.L., Chan, K., Jarrard, L.E., Kanoski, S.E., Clegg, D.J., Benoit, S.C., 2009. Contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to energy and body weight regulation. *Hippocampus.* 19, 235–252.
- De Man, J.G., Seerden, T.C., De Winter, B.Y., Van Marck, E.A., Herman, A.G., Pelckmans, P.A., 2003. Alteration of the purinergic modulation of enteric neurotransmission in the mouse ileum during chronic intestinal inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 139, 172–184.
- De Winter, B.-Y., De Man, J.-G., 2010. Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: effect on gastrointestinal motility. *World J. Gastroenterol.* 16, 5523–5535.
- Engeland, W.C., Arnhold, M.M., 2005. Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine.* 28, 325–332.
- Ferguson, J.M., Damluji, N.F., 1988. Anorexia nervosa and schizophrenia. *Int. J. Eat. Disord.* 7, 343–352.
- Funayama, Y., Sasaki, I., Naito, H., Fukushima, K., Matsuno, S., Masuda, T., 1999. Remodeling of Vascular Wall in Crohn's Disease. *Digestive Diseases and Sciences* 44, 2319–2323.
- Hadley, M.E., Levine, J.E., 2007. *Endocrinology.* Pearson Prentice Hall.
- Hamilton, M.T., Hamilton, D.G., Zderic, T.W., 2007. The role of low energy expenditure and sitting on obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes.* 56, 2655–2667.
- Jeon, B.T., Shin, H.J., Kim, J.B., Kim, Y.K., Lee, D.H., Kim, K.H., Kim, H.J., Kang, S.S., Cho, G.J., Choi, W.S., Roh, G.S., 2009. Adiponectin protects hippocampal neurons against kainic acid-induced excitotoxicity. *Brain Res. Rev.* 61, 81–88.
- Kanoski, S.E., Hayes, M.R., Greenwald, H.S., Fortin, S.M., Gianessi, C.A., Gilbert, J.R., Grill, H.J., 2011. Hippocampal leptin signaling reduces food intake and modulates food-related memory processing. *Neuropsychopharmacology* 36, 1859–1870.
- Konturek, S.J., Konturek, J.W., Pawlik, T., Brzozowski, T., 2004. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J. Physiol. Pharmacol.* 55, 137–154.

- Lathe, R., 2001. Hormones and the hippocampus. *J. Endocrinol.* 169, 205–231.
- Le Pen, G., Moreau, J.-L., 2002. Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine, olanzapine and risperidone but not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology.* 27, 1–11.
- Lecourtier, L., Antal, M.-C., Cosquer, B., Schumacher, A., Samama, B., Angst, M.-J., Ferrandon, A., Koning, E., Cassel, J.-C., Nehlig, A., 2012. Intact neurobehavioral development and dramatic impairments of procedural-like memory following neonatal ventral hippocampal lesion in rats. *Neuroscience.* 207, 110–123.
- Liddle, R.A., Goldfine, I.D., Rosen, M.S., Taplitz, R.A., Williams, J.A., 1985. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J. Clin. Invest.* 75, 1144–1152.
- Lu, X.-Y., 2007. The leptin hypothesis of depression: a potential link between mood disorders and obesity? *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 648–652.
- Matsubara, M., Maruoka, S., Katayose, S., 2002. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2764–2769.
- Meyer, U., Feldon, J., 2010. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog. Neurobiol.* 90, 285–326.
- Morrison, C.D., 2009. Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochim. Biophys. Acta.* 1792, 401–408.
- Newcomer, J.W., 2007. Metabolic considerations in the use of antipsychotic medications: a review of recent evidence. *J. Clin. Psychiatry.* 68 Suppl 1, 20–27.
- North, C.S., Hong, B.A., Alpers, D.H., 2007. Relationship of functional gastrointestinal disorders and psychiatric disorders: implications for treatment. *World. J. Gastroenterol.* 13, 2020–2027.
- Ohashi, K., Ouchi, N., Matsuzawa, Y., 2012. Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie.* Available online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.008>.
- Padmavati, R., McCreadie, R.G., Tirupati, S., 2010. Low prevalence of obesity and metabolic syndrome in never-treated chronic schizophrenia. *Schizophr. Res.* 121, 199–202.
- Pénicaud, L., Meillon, S., Brondel, L., 2012. Leptin and the central control of feeding behavior. *Biochimie* Available online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.013>.
- Peupelmann, J., Quick, C., Berger, S., Hocke, M., Tancer, M.E., Yeragani, V.K., Bär, K.-J., 2009. Linear and non-linear measures indicate gastric dysmotility in patients

- suffering from acute schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 1236–1240.
- Roehrig, M., Masheb, R.M., White, M.A., Grilo, C.M., 2009. The metabolic syndrome and behavioral correlates in obese patients with binge eating disorder. *Obesity*. 17, 481–486.
- Sandner, G., Host, L., Angst, M.-J., Guiberteau, T., Guignard, B., Zwiller, J., 2010. The HDAC inhibitor phenylbutyrate reverses effects of neonatal ventral hippocampal lesion in rats. *Front. Psychiatry*. 153.
- Schwartz, G.J., 2000. The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition*. 16, 866–873.
- Sengupta, S., Parrilla-Escobar, M.A., Klink, R., Fathalli, F., Ying Kin Ng, Stip, E., Baptista, T., Malla, A., Joober, R., 2008. Are metabolic indices different between drug-naïve first-episode psychosis patients and healthy controls? *Schizophr. Res.* 102, 329–336.
- Severance, E.G., Alaedini, A., Yang, S., Halling, M., Gressitt, K.L., Stallings, C.R., Origoni, A.E., Vaughan, C., Khushalani, S., Leweke, F.M., Dickerson, F.B., Yolken, R.H., 2012. Gastrointestinal inflammation and associated immune activation in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 138, 48–53.
- Taylor, V.H., MacQueen, G.M., 2010. The role of adipokines in understanding the associations between obesity and depression. *Journal of Obesity* 2010, 1–6.
- Thakore, J.H., 2004. Metabolic disturbance in first-episode schizophrenia. *Br. J. Psychiatry*. 184, s76–s79.
- Thundyil, J., Pavlovski, D., Sobey, C.G., Arumugam, T.V., 2012. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br. J. Pharmacol.* 165, 313–327.
- Torrents, D., Vergara, P., 2000. In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 279, G543–G551.
- Tseng, K.Y., Chambers, R.A., Lipska, B.K., 2009. The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 204, 295–305.
- Tsujino, N., Yamanaka, A., Ichiki, K., Muraki, Y., Kilduff, T.S., Yagami, K., Takahashi, S., Goto, K., Sakurai, T., 2005. Cholecystokinin activates orexin/hypocretin neurons through the cholecystokinin A receptor. *J. Neurosci.* 25, 7459–7469.
- Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R.E., Tataranni, P.A., 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association

with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1930–1935.

Williams, K.W., Scott, M.M., Elmquist, J.K., 2009. From observation to experimentation: leptin action in the mediobasal hypothalamus. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 985S–990S.

Wu, J.C., 2012. Psychological co-morbidity in functional gastrointestinal disorders: epidemiology, mechanisms and management. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 18, 13–18.

Résumé des résultats

Une lésion néonatale bilatérale de l'hippocampe ventral conduit à :

- une diminution de la masse corporelle et de la masse de tissu adipeux ainsi qu'une augmentation de la masse de l'estomac.
- une diminution des concentrations plasmatiques de triglycérides et de leptine ainsi qu'une augmentation de celles de CCK et de cortisol.
- une coloration inhabituelle de l'intestin ainsi qu'une augmentation de l'activité de la myéloperoxidase et du nombre de mastocytes dans le jéjunum uniquement.
- une diminution de l'épaisseur des muscles lisses circulaire et longitudinal du jéjunum et leur augmentation dans le côlon proximal.
- une augmentation du tonus de base du LMJ, des contractions spontanées du LMJ et du CMPC ainsi que de la contraction induite par la NS dans le CMPC.

IV. Article de recherche C

ALTERATION IN ENTERIC GABAERGIC NEUROTRANSMISSION IN THE NEONATAL VENTRAL HIPPOCAMPAL LESION RAT MODEL OF SCHIZOPHRENIA

Florian Voinot^{1,3}, Marie-Josée Angst^{2,4}, Mathilde Arrivé^{1,3}, Thierry Guiberteau^{2,5},
Blandine Guignard^{2,5}, Guy Sandner^{2,4} and Fabielle Angel^{1,3}

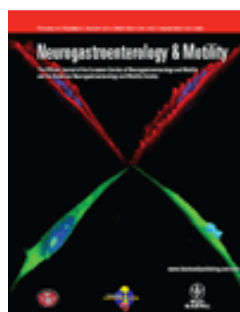
¹ Université de Strasbourg, IPHC, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France.

² Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg, France

³ CNRS, UMR7178, Strasbourg, France

⁴ INSERM, U666, Strasbourg, France

⁵ CNRS, UMR7237, Strasbourg, France



In preparation for submission in *Neurogastroenterology & Motility*

Abstract

Background Alterations in several neurotransmitters system in the brain, including gamma-aminobutyric acid (GABA), have been associated with the pathophysiology of schizophrenia. In particular, patients show altered expression of the enzyme that catalyses GABA synthesis, of GABA receptors and transporters. Schizophrenia has also been linked with various gastrointestinal disorders. Abnormalities in the enteric nervous system (ENS) have been hypothesized to explain these disorders. Thus, schizophrenia may lead to enteric GABAergic system dysfunctions. Therefore, the aim of the present study was to investigate the possible alterations in intestinal and colonic GABAergic neurotransmission and metabolism components expression in schizophrenia. **Methods** An *ex vivo* organ bath associated with pharmacological tools and real time quantitative polymerase chain reaction techniques were performed in adult rats with neonatal ventral hippocampal lesion (NVHL), known to mimic pathophysiology of schizophrenia. **Key Results** The present data show changes in mechanical activities of jejunum and proximal colon of NVHL rats. Moreover, an alteration of GABA-A and GABA-B receptors on motor neurons was observed in these rats. Finally, a significant increase in GABA-B2 receptor mRNA level in the proximal colon and an increase in the GAD67 mRNA level in the jejunum were shown in NVHL rats. **Conclusions & Inferences** Altogether, these data suggest that the enteric GABAergic system including synthesis, reception and possibly transport of GABA may be altered in the intestine and colon of NVHL rats. Further studies are needed to determine the precise role of different branches of the autonomic nervous system and the clinical consequences of enteric dysfunction.

Keywords

intestine, colon, enteric nervous system, psychiatric disorder, gamma-aminobutyric acid, parasympathetic activity.

A. Introduction

Schizophrenia is a neuropsychiatric disorder affecting one percent of population in the world. It is characterized by disturbances in cognitive processes, such as impairments in attention, memory and executive functions at adulthood (1). These abnormalities may be the result of abnormal structure and function in several brain regions (2). In particular, alterations in the gamma-aminobutyric acid (GABA) neurotransmitter system in the brain have been associated with schizophrenia. After the synthesis catalyzed by glutamic acid decarboxylase (GAD), GABA is released from interneurons, exerts its effect via GABA-A and GABA-B receptors and is removed from the extracellular space by transporters (GAT). In schizophrenic patients, the expression of the 67-kDa isoforms of GAD (GAD67), GAT-1 and GABA-B receptor was shown to decrease whereas GABA-A receptor and GAT-3 were overexpressed in the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (3,4). These data are consistent with a decrease in GABAergic inhibition that may contribute to the physiopathology of the schizophrenia (3,5).

Schizophrenia has also been associated with an increased risk of cardiovascular disease (6) or respiratory diseases (7), as well as various gastrointestinal (GI) disorders, such as GI inflammation or gastric dysmotility (8–11). Abnormalities in the enteric nervous system (ENS) may be associated with GI symptoms observed in some central neurological diseases (12). For instance, a decrease in dopaminergic myenteric neurons and in dopamine levels in colon lead to chronic constipation in Parkinson's disease (13). However, nothing is known about the possible alteration of ENS neuronal activities in relation with schizophrenia. It is well known that GABA is localized in nerve terminals within the ENS (14,15). It modulates biological effects such as motility and mucosal function *via* GABA-A and GABA-B receptors, localized on a subpopulation of myenteric and submucosal interneurons in the rat intestine (15–17). However, no data are available on the effects of schizophrenia on enteric GABAergic innervation.

Numerous studies have focused on neonatal lesion of the ventral hippocampus (NVHL) as a relevant model to mimic the primary insult postulated in schizophrenia (18). In adulthood, the lesion is associated with multiple symptoms of schizophrenia, such as psychomotor, social and cognitive deficits (19). These behavioural alterations are partly alleviated with antipsychotics (18,20). NVHL also reproduces neurochemical and molecular disturbances observed in the brain of patients with schizophrenia such as dysfunction of the

GABAergic system. Indeed, decreased prefrontal cortex (PFC) expression of GAD67 (19) and increased expression of GABA-A receptor (21) have been reported in NVHL rats but no variation of GAT-1 (22) were observed. Therefore, alterations in GABAergic neurotransmission in this model are relevant to schizophrenia pathophysiology.

The aim of the present study was to investigate the alterations in intestinal and colonic GABAergic neurotransmission and metabolism components expression in NVHL rats using an *ex vivo* organ bath technique associated with pharmacological tools and real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

B. Materials and methods

1. Ethical considerations, surgery, selection of the subjects and tissues sampling

All procedures had been approved by the official committee of ethics of Strasbourg (CREMEAS-AL/03/03/02/10). They complied with the 1986 European Council Directive (86/609/EEC), in keeping with the “Declaration of Helsinki”. They were conducted by researchers approved by the French Ministry of Agriculture. Every effort was made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Five Sprague Dawley dam rats, each with six male pups, were purchased from Charles River, France, and housed on a 14/10-hour light/dark cycle (lights on at 0700h) with food and water available *ad libitum*. The pups were microinjected with ibotenate or artificial cerebrospinal fluid at the age of seven days, noted PD7 (see surgeries, below). Magnetic Resonance Imaging (MRI) was conducted for evaluating the aspect and size of the lesions for selecting the subjects. At six weeks, they were weaned and kept two per cage. Surgical procedures, similar to those used by others (19,23), were performed at PD7 under isoflurane anaesthesia as detailed previously (22,24). Ibotenic acid (Sigma, France, 0.3 μ L, 10 μ g.mL⁻¹, pH 7.4) in the case of NVHL rats (n = 18), or artificial cerebrospinal fluid in the case of sham lesioned control rats (n = 12) was infused bilaterally into the ventral hippocampus. The skin was sutured, and the pups were allowed to recover on a heating pad before being returned to their dam.

One month One month old rats injected with ibotenic acid were subjected to a MRI session under isoflurane anaesthesia using a scanner dedicated to small animals operating at

4.7 T (TR/TE/TEeff: 3000/ 30 ms/ 60 ms) and belonging to the Biophysics Department (UMR 7191) of Strasbourg University Faculty of Medicine. A series of 10 slices (512 x 512 pixels) was generated over a 1 cm long section of the brain, rostral to the cerebellum-cerebrum gap. Only 9/18 rats presenting a quasi-symmetrical bilateral lesion were included in the study (**Figure 1**).

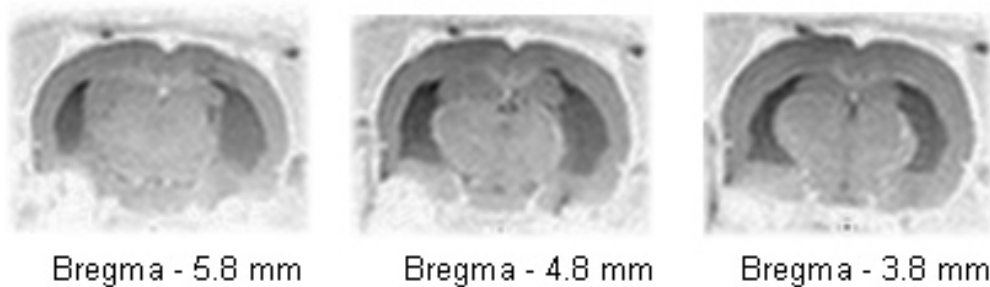


Figure 1: MRI reconstructions of a typical lesion used to select the rats for the experiments. The arrows point to the lesioned ventral hippocampus. The distance from bregma is indicated under each section.

The MRI sections served also to evaluate the volume of the lesions. This procedure was considered more reliable than histological procedures insofar as the slicing process modifies the size of the lesions. Lesioned areas were drawn on brain MRI coronal slices. The number of pixels was added together and represents the volume estimates on which statistical tests were conducted (22,24).

Once adults (3 to 4 months old), 9 NVHL and 9 sham lesioned rats were anaesthetized with 2% isoflurane and were decapitated. The jejunum and proximal colon were immediately removed and placed onto an ice-cold plate for dissections.

2. Organ bath studies

Jejunum and proximal colon samples were immersed in a Petri dish containing a chilled physiological Krebs solution (in mM: 119.8 NaCl, 16.2 C₆H₁₂O₆, 15.5 NaHCO₃, 5.8 KCl, 2.5 CaCl₂.H₂O, 2.0 NaH₂PO₄.H₂O, 1.2 MgCl₂.H₂O, pH 7.4) oxygenated with 95% O₂/5% CO₂. Then, 8 strips of longitudinal muscle from jejunum (LMJ, 10 x 5 mm) and circular muscle (3 mm) from proximal colon (CMPC) were cut, rinsed of intraluminal content and mounted in organ bath chambers containing 10 ml of warmed (37 °C) and gassed (95% O₂/5% CO₂) Krebs solution. Smooth muscle mechanical activities of jejunum and proximal

colon were measured by means of an isometric force transducer (Fort25, WPI, Aston, UK) and amplifier (Lab-Trax-4/24T, WPI, Aston, UK) and were visualized using computer (HP Compaq 8000, Hewlett-Packard, USA). Transmural nerve stimulation (TNS) was applied via two steel electrodes, placed 10 mm apart from the tissue. Square wave pulses of 15 V intensity, 10 Hz frequency and 200 μ s duration, during 10 s period of time, were used (stimulator designed by the Metrology and Instrumentation in Biology and Environment department, IPHC, CNRS, Strasbourg, France).

At the beginning of the experiment, each muscle strip was stretched incrementally to its optimal length, until spontaneous mechanical activities (noted SMA; basal tone and spontaneous rhythmic contractions) and contractile responses to TNS were stable. Strips without SMA or response to TNS were excluded from the study. Strips were finally allowed to equilibrate for 60 min after which the effects of various pharmacological agents on basal tone and responses to TNS were investigated. Bath solution was replaced every 15 minutes.

Tone and TNS-induced responses were analysed 10 minutes after the addition of several pharmacological agents: GABA (0.1 mM), muscimol (0.1 mM), bicuculline (30 μ M), CGP 52432 (0.1 μ M) and baclofen (50 μ M) in both groups. After each experiment, tissues were washed out by replacing the bath solution several times with fresh Krebs solution and muscle strips were allowed to equilibrate for 30 minutes. Recovery of smooth muscle strips was regularly verified by stimulating enteric nerves.

The drugs were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK) and were dissolved in distilled water. Solvent vehicle was added to the bath (in a volume of 100 μ L in 10 mL) for control experiments. It showed no effect on spontaneous contractile activities or responses to TNS in both LMJ and CMPC.

Analysis was performed using Datatrax (Datatrax 2.0, WPI, Aston, UK). Tone was evaluated for 2 min before TNS. Tone was expressed in millinewtons per mg of fresh tissue ($\text{mN}\cdot\text{mg}^{-1}$). The parameters of the TNS-induced response were measured as the area under the curve (in $\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$, **Figure 2**). The effects of the pharmacological agents are given as the percentage change from control basal tone or from area under the curve for TNS responses (defined as 100%; **Figure 2**).

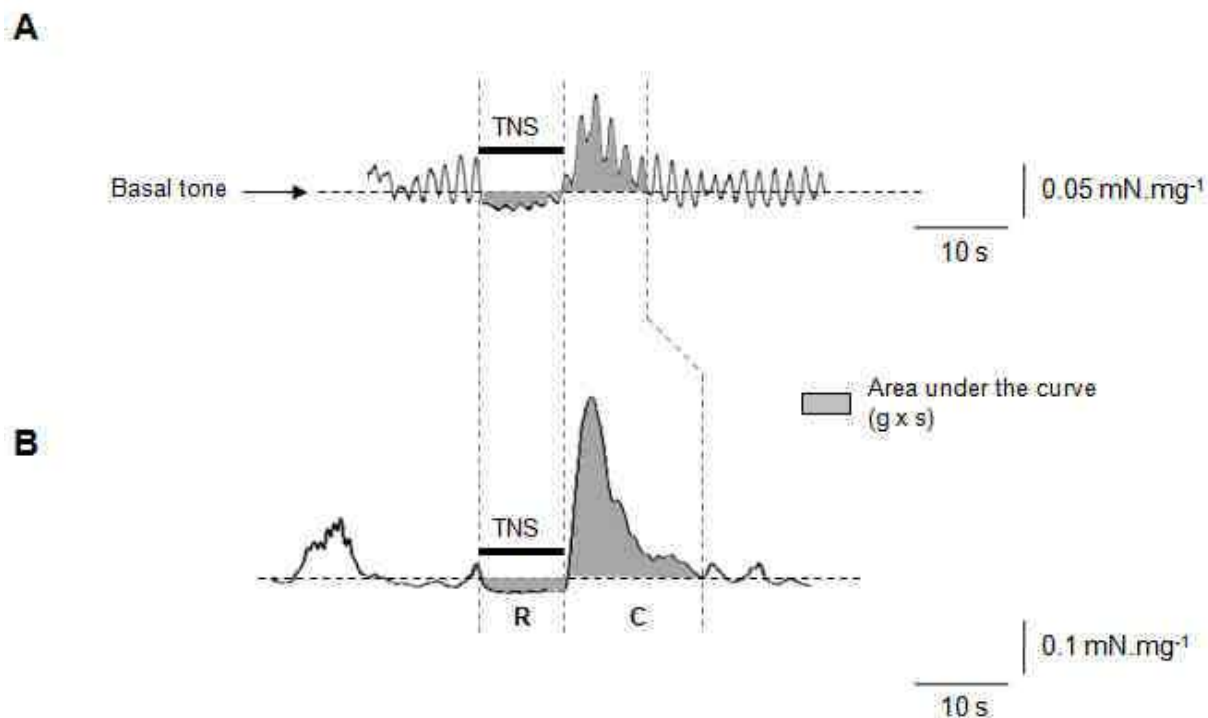


Figure 2: *Ex vivo* organ bath studies in Sham rats. **A** Longitudinal smooth muscle of jejunum (LMJ) and **B** circular smooth muscle of proximal colon (CMPC) developed tone and mechanical response to electrical transmural nerve stimulation (TNS) that could be divided in relaxation (R) and off-contraction (C) in normal Krebs solution.

3. Real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) studies

qPCR analysis was undertaken on 8 NVHL and 8 Sham rats. Fragments of jejunum and proximal colon from both groups were homogenized and total RNA was extracted using TRIzol[®] Reagent (Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. Integrity of RNAs was assessed by electrophoresis on an agarose gel. The cDNA was synthesized from 2 μg of the total RNA using AMV-Reverse Transcriptase (Thermo Fischer Scientific) and oligo(dT)₁₈ primer (Thermo Fischer Scientific). qPCR were run *via* a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) using QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and QuantiTect[®] primers validated in rats (Qiagen). qPCR was conducted under the following conditions: 95°C for 15 min, followed by 50 cycles at 94°C for 15 s, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s. Fluorescence was measured at the end of each cycle. Finally a melting curve allowed checking the specificity of the PCR reactions. Expression levels of seven genes of interest and of two housekeeping genes were examined: GAD-65 (QT00190778), GAD-67 (QT00194600), GAT-1 (QT00182343), GAT-2 (QT00185885), GAT-3 (QT00181139), GABA-B1 (QT00189014)

and GABA-B2 (QT00196476) as well as β -actin (QT00193473) and GAPDH (QT00199633). qPCR reactions were run in duplicate and delta Cts (cycle threshold) were calculated using the qPCR Ct value for each gene of interest minus the geometric mean of the Ct for housekeeping genes. Fold changes between two groups were calculated by $2^{(\text{Delta Delta Ct})}$ method.

4. Data Analyses

The results report data from groups of 5 to 9 rats. Data were expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was carried out using R (R Foundation, Vienna, Austria). Differences between groups were evaluated using unpaired t-test. For organ bath, the effect of the drug was evaluated by paired t-test since each muscle strip was considered as its own control. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (noted *).

C. Results

1. Organ bath studies

a. Effects of the lesion on tone and mechanical responses of jejunum and proximal colon to TNS

TNS applied to intramural enteric neurons elicited mechanical responses consisting in a phase of relaxation (R) followed by contraction (C) at the end of stimulation (“off-stimulation” response). A typical example is shown in **Figure 2**. The basal tone amplitude was more important in LMJ but not in CMPC of NVHL rats ($p < 0.05$). There was no difference in the amplitude of the relaxation, in both LMJ and CMPC ($p > 0.05$). The contraction amplitude was significantly higher in CMPC of NVHL rats ($p < 0.05$) whereas it was unchanged in LMJ ($p > 0.05$). Detailed results are given in **Table 1**.

Group	Basal tone (mN/mg)	Mechanical response to TNS	
		R (g/s)	C (g/s)
<i>LMJ</i>			
Sham	0.150 ± 0.13	0.010 ± 0.001	2.8 ± 0.3
NVHL	0.197 ± 0.14 *	0.013 ± 0.003	1.9 ± 0.4
<i>CMPC</i>			
Sham	0.120 ± 0.10	0.027 ± 0.008	24.3 ± 2.7
NVHL	0.092 ± 0.05	0.028 ± 0.006	33.9 ± 4.1 *

Table 1: Characteristics of basal tone and mechanical responses to electrical transmural nerve stimulation (TNS) of longitudinal muscle from jejunum (LMJ) and circular muscle from proximal colon (CMPC) in Sham and NVHL rats. See Figure 1 for details. Data are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$, statistically significant difference between NVHL and Sham rats.

To evaluate the involvement of GABA in altered contractile responses in NVHL rats, tone and TNS-induced responses were determined in the presence of GABA, muscimol (GABA-A receptor agonist), baclofen (GABA-B receptor agonist), bicuculline (GABA-A receptor antagonist) and CGP 52432 (GABA-B receptor antagonist).

b. Effects of the lesion on enteric GABAergic innervation

GABA (0.1 mM) had no effect on tone either on TNS-induced responses in both LMJ and CMPC of Sham rats (**Figure 3**, $p > 0.05$). GABA induced a significant decrease in CMPC tone and R of NVHL rats ($p < 0.05$, respectively $-9 \pm 3\%$ and $-20 \pm 4\%$) whereas it had no effect on the other parameters ($p > 0.05$). Basal tone of CMPC in NVHL rats was significantly different compared to Sham ($p < 0.05$).

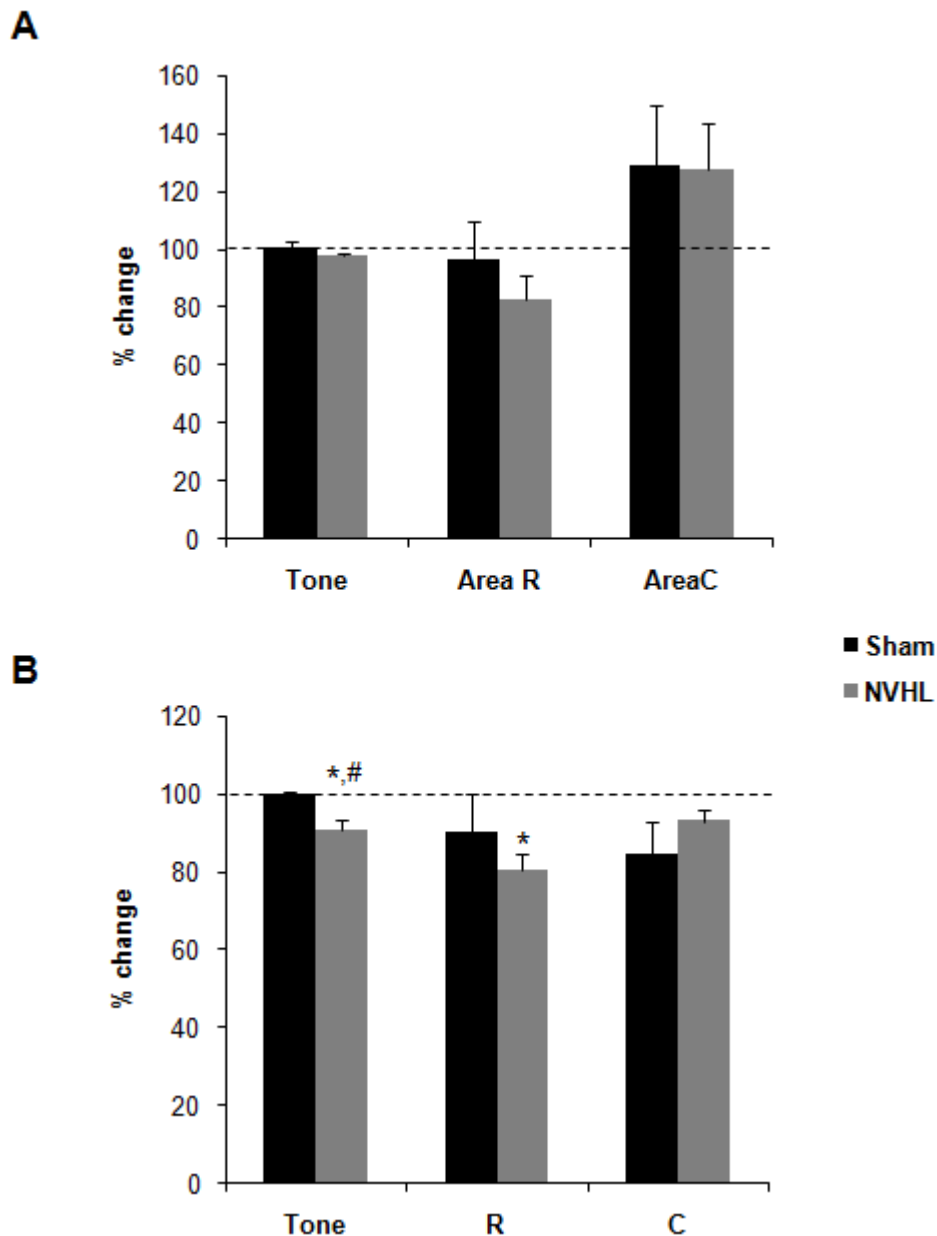


Figure 3: Effects of GABA (0.1 mM) on tone and mechanical responses to transmurial nerve stimulation of **A** LMJ and **B** CMPC in Sham (respectively $n = 6$ and $n = 7$) and in NVHL rats (respectively $n = 7$ and $n = 9$). 100% indicates the level of control responses. * $p < 0.05$ statistically significant difference from control responses; # $p < 0.05$, statistically significant difference between NVHL and Sham rats.

Muscimol (0.1 mM) did not significantly alter the parameters studied in Sham rats ($p > 0.05$). It induced a decrease in CMPC-R of NVHL rats ($p < 0.05$) that was not significantly different compared to that in Sham rats ($p > 0.05$).

Baclofen (50 μ M) induced a significant decrease in LMJ-C of Sham rats ($p < 0.05$, $-21 \pm 8\%$) whereas it had no effect on the other parameters ($p > 0.05$; **Figure 4**). In NVHL rats,

baclofen induced a significant decrease in R in both LMJ and CMPC and an increase in LMJ-C ($p < 0.05$, respectively $-21 \pm 6 \%$, $-31 \pm 6 \%$ and $16 \pm 7 \%$) that were significantly different compared to Sham ($p < 0.05$).

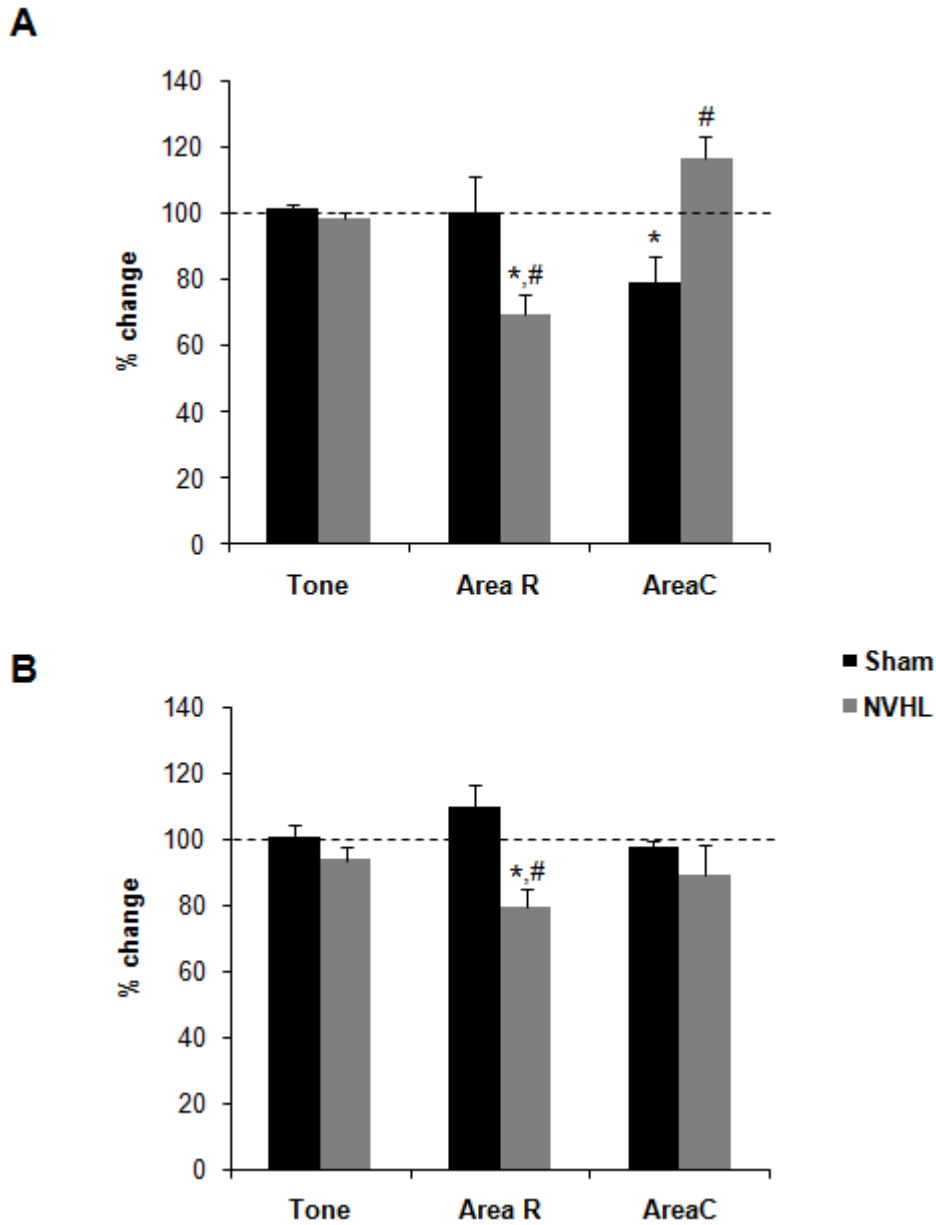


Figure 4: Effects of baclofen (50 μ M) on tone and mechanical responses to transmural nerve stimulation of **A** LMJ and **B** CMPC in Sham (respectively $n = 7$ and $n = 7$) and in NVHL rats (respectively $n = 5$ and $n = 8$). 100% indicates the level of control responses. * $p < 0.05$ statistically significant difference from control responses; # $p < 0.05$, statistically significant difference between NVHL and Sham rats.

Bicuculline (30 μ M) induced a significant decrease in LMJ-R and CMP-R as well as an increase in CMPC-C ($p < 0.05$, respectively $-55 \pm 1 \%$, $-42 \pm 11 \%$ and $41 \pm 14\%$) without affecting the other parameters in Sham rats ($p > 0.05$; **Figure 5**). Bicuculline had no effect on LMJ of NVHL rats ($p > 0.05$) whereas it induced a decrease in CMPC tone and CMPC-R as well as an increase in CMPC-C ($p < 0.05$, respectively $-12 \pm 4\%$, $-36 \pm 9\%$ and $10 \pm 2\%$). However, LMJ-R and CMPC-C were significantly different in NVHL compared to Sham rats.

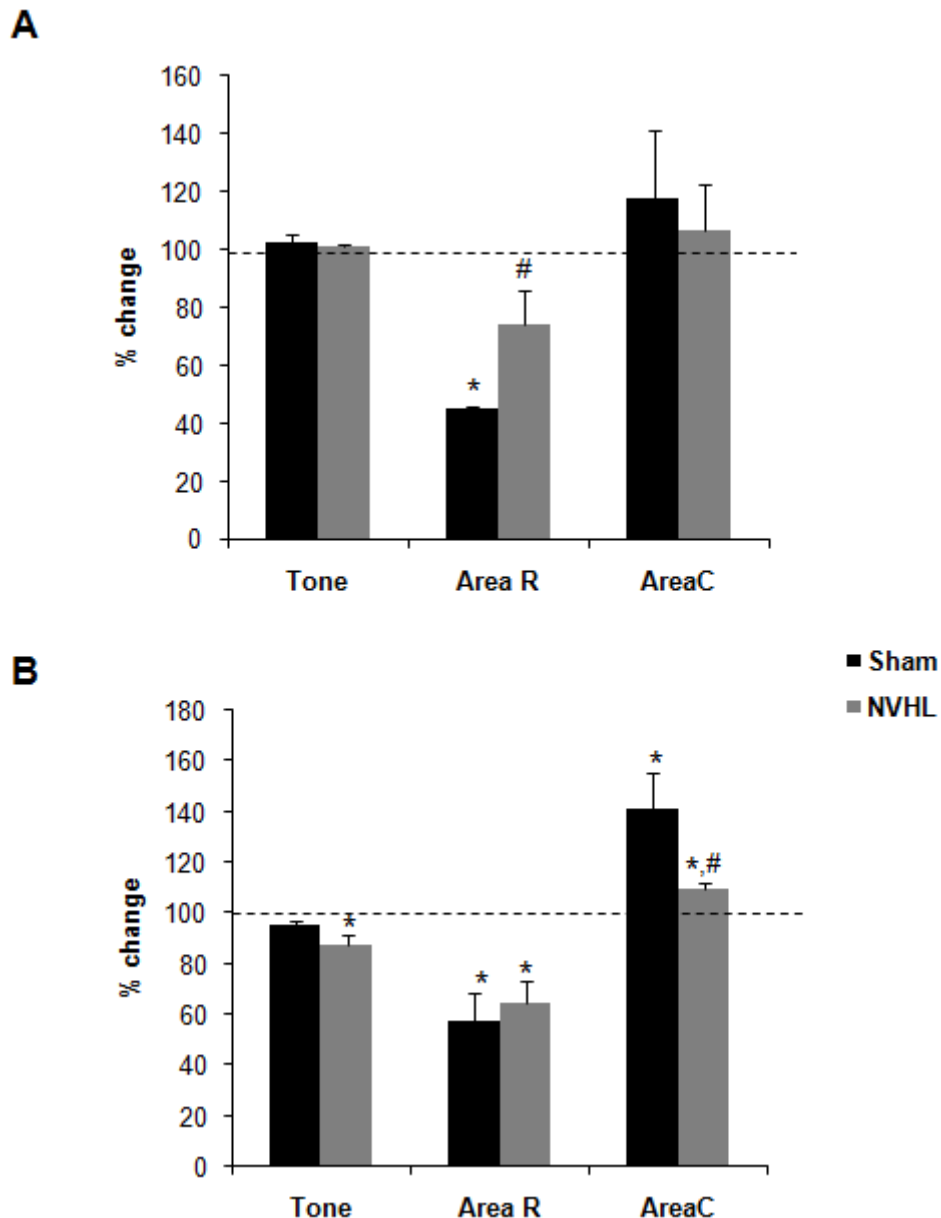


Figure 5: Effects of bicuculline (30 μ M) on tone and mechanical responses to transmural nerve stimulation of **A** LMJ and **B** CMPC in Sham (respectively $n = 5$ and $n = 6$) and in NVHL rats (respectively $n = 5$ and $n = 7$). 100% indicates the level of control responses. * $p < 0.05$ statistically significant difference from control responses; # $p < 0.05$, statistically significant difference between NVHL and Sham rats.

CGP 52432 (0.1 μ M) had no significant effect either in Sham rats or NVHL rats ($p < 0.05$).

2. qPCR studies

qPCR analysis was performed in order to determine levels of mRNA for seven genes, GAD-65, GAD-67, GAT-1, GAT-2, GAT-3, GABA-B1 and GABA-B2 in tissue from Sham and NVHL rats. Significant differences in gene expression emerged. Increases in the expression levels of GAD67 in the jejunum (1.60 fold) and GABA-B2 (1.49) in the proximal colon were detected in NVHL rats compared to Sham rats (**Table 2**, $p < 0.05$), while no significant difference was detected concerning the other genes, although a trend towards a decrease was detected for GAT-3 (0.63) and GABA-B1 (0.82) and towards an increase for GAT-1 (3.14) in the proximal colon of NVHL rats. The expression level of GAD-65 was too low to be detected.

<i>Transcript (abbreviation)</i>	<i>Accession</i>	<i>Tissue</i>	<i>Pvalue</i>	<i>Foldvariation</i>
Glutamate decarboxylase 65 kDa (GAD65)	NM_017007	Jejunum		NT
		Proximal colon		
Glutamate decarboxylase 67 kDa (GAD67)	NM_017007	Jejunum	0.04	1.60
		Proximal colon	0.32	
GABA transporter 1 (GAT1)	NM_012563	Jejunum	0.21	
		Proximal colon	0.09	3.14
GABA transporter 2 (GAT2)	NM_133623	Jejunum	0.37	
		Proximal colon	0.46	
GABA transporter 3 (GAT3)	NM_024372	Jejunum	0.41	
		Proximal colon	0.09	0.63
GABA-A receptor associated protein (GABARAP)	NM_172036	Jejunum	0.58	
		Proximal colon	0.45	
GABA B receptor subunit 1 (GABA-B1)	NM_031028	Jejunum	0.23	
		Proximal colon	0.09	0.82
GABA B receptor subunit 2 (GABA-B2)	NM_031802	Jejunum	0.82	
		Proximal colon	0.02	1.49

Table 2: Changes in DNA quantities for GABAergic system components of NVHL rats compared to Sham rats obtained from the real-time quantitative PCR on the jejunum and proximal colon. Fold changes were calculated by $2^{(\Delta\Delta Ct)}$ method if p value < 0.10 .

D. Discussion

We have shown that NVHL induced changes in basal tone of jejunum and proximal colon, as well as TNS-induced contraction in colon. These alterations in enteric mechanical activities may be related to GI disorders observed in schizophrenic patients. As brain GABAergic alterations have been associated with schizophrenia, we investigated the enteric GABAergic system of NVHL adult rats. We found the enteric GABAergic system including synthesis, reception and transport of GABA was altered in the intestine and colon of NVHL rats.

GABA has been shown to induce both excitatory and inhibitory effects on various GI functions such as secretion and motility (15,25). Indeed, GABA may lead to smooth muscle contraction or relaxation depending on the species studied and the localization within the GI tract.

In our study, GABA had no effect either on tone or on TNS-induced parameters in Sham rats, as it has been shown before in distal colon (26) whereas it has been shown to affect tone in duodenum, jejunum or ileum (27,28). In addition, GABA induced only a decrease in colonic tone in NVHL rats compared to Sham rats. The lack of effects of GABA in our experimental conditions does not necessarily mean that GABAergic system is not involved in the TNS-induced muscle response and is not altered in NVHL rats. Indeed, as enteric GABA receptors are distributed on both excitatory and inhibitory motor neurons, endogenous GABA may induce simultaneous release of excitatory and inhibitory neurotransmitters during the TNS that could explain that no effect of GABA on muscle responses and that no difference may be visible between the two groups of rats. Thus, the effects of GABA receptor subtypes, GABA-A and GABA-B, agonists and antagonists have been investigated.

Baclofen, a GABA-B agonist, induced a reduction in jejunal TNS-induced contraction in rats as it has previously been shown in the small intestine (27,28) but, more surprising, had no effect on colonic contraction (26). These data confirmed that activation of the myenteric GABA-B receptor system decreases acetylcholine release from myenteric cholinergic motor neurons (29) at least in the jejunum of rats. The baclofen-induced decrease in jejunal contraction was inhibited and a significant decrease in jejunal and colonic relaxation was observed in NVHL rats. These results seemed to show that NVHL induced a decrease in the

number and/or activity of GABA-B receptors on the excitatory motor neurons in the jejunum. Although baclofen had no effect on tone or TNS-induced relaxation in intestine of Sham rats, which is consistent with previous studies (26,28), it induced a significant decrease in this relaxation in both jejunum and proximal colon in NVHL rats. This difference of baclofen effects on jejunal and colonic TNS-induced relaxation between Sham and NVHL rats might be explained by an alteration of GABA-A receptor activities. Indeed, some GABA receptors-mediated effects have been shown to be countered by other GABA receptors: for instance, the GABA-B mediated inhibitory effect on the twitch response by baclofen is countered by GABA-A receptors and this was recovered to some extent in the presence of the GABA-A receptor antagonist, bicuculline (30). CGP52432, a GABA-B antagonist, had no effect on the TNS-induced response in both Sham and NVHL rats.

GABA-A receptor agonists have been shown to stimulate enteric cholinergic excitatory and non-adrenergic non-cholinergic inhibitory motor neurons in several species (21). It has been also demonstrated that GABA inhibits neural nitric oxide synthesis in rat ileum through GABA-A receptors (31). Furthermore, GABA was shown to increase TNS-induced contraction but not to change tone or relaxation in rat distal colon (26). It has to be noted that in our study, muscimol had no effect on enteric mechanical activities either in Sham or in NVHL rats. However, bicuculline, a GABA-A antagonist, induced a significant increase in TNS-induced contraction in proximal colon whereas in jejunum it induced a decrease in relaxation and a non-significant increase in contraction as it has previously been observed in guinea-pig distal colon or ileum (32,33) but not in rat distal colon (26). In NVHL rats, the effects of bicuculline on jejunal TNS-induced relaxation and colonic TNS-induced contraction were significantly reduced compared to those in Sham rats. These data showed a possible decrease in number and/or the activity of GABA-A receptors on jejunal inhibitory and on colonic excitatory motor neurons in NVHL rats.

Finally, a significant increase in the GABA-B2 mRNA levels was observed as well as a slight but a non-significant decrease in GABA-B1 levels in the proximal colon of NVHL compared to Sham rats. In addition, a significant increase in the GAD67 mRNA levels in the jejunum of NVHL rats was observed as well as non-significant increase in the GAT-1 levels and decrease in the levels of GAT-3 in the proximal colon. GAD-65 and GAD-67 have previously been shown to be expressed in the rat intestine (34). Furthermore, GAT-2 and GAT-3 have been localized in the myenteric plexus of rat intestine (35). Altogether, these

data showed that the enteric GABA receptors as well as the GABA synthesis and possibly GABA transport were altered in NVHL rats depending on the localization within the gastrointestinal tract.

The differences observed in the responses to GABA receptors agonists and antagonists as well as mRNA levels of GABAergic system components in the jejunum and the proximal colon in both Sham and NVHL rats may be explained by the regional distribution of enteric nerve circuits (36). Moreover, the distribution of GABA receptors in adult rat is heterogeneous, and reflects the varied physiological/pharmacological profile of GABA-mediated transmission in both regions (17).

Abnormalities in neurotransmission in the ENS have previously been associated with neurological diseases (12). These changes in neuronal structure and function are encompassed under the term *neuronal plasticity* and may be a response to alterations of input. As the ENS receives autonomic nervous system input (37,38), sympathetic or parasympathetic impairment in NVHL rats may induce alterations in enteric GABAergic system and finally GI disorders. A decreased vagal modulation of the cardiovascular system (39), the cardio-respiratory coupling (7) or the pupillary function (40) has previously been shown in schizophrenic patients. In addition, a decrease in parasympathetic and an increase in sympathetic activities within the ENS have been observed in patients with schizophrenia and gastric dysmotility (10,41).

In conclusion, this is the first study investigating the enteric GABAergic system in an animal model of schizophrenia. The present data show that enteric GABA receptors, GABA synthesis and possibly GABA transport are altered in NVHL rats. These results may be linked to decreased parasympathetic activity as it has been previously reported in schizophrenia. However, further studies are needed to determine the influence of the NVHL and schizophrenia on different branches of the autonomic nervous system and clinical consequences of enteric dysfunction.

Acknowledgments

This study was financially supported by INSERM and CNRS. The authors sincerely thank Camille Schmidt and Caroline Fischer for technical assistance.

References

1. Elvevåg B, Goldberg TE. Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit. Rev. Neurobiol.* 2000;14(1):1-21.
2. Fatemi SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr. Bull.* 2009;35(3):528-48.
3. Wassef A, Baker J, Kochan L. GABA and schizophrenia: A review of basic science and clinical studies. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2003;23(6):601-40.
4. Schleimer SB, Hinton T, Dixon G, Johnston GAR. GABA transporters GAT-1 and GAT-3 in the human dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Neuropsychobiology.* 2004;50(3):226-30.
5. Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005;6(4):312-24.
6. Hennekens CH, Hennekens AR, Hollar D, Casey DE. Schizophrenia and increased risks of cardiovascular disease. *Am. Heart J.* 2005;150(6):1115-21.
7. Peupelmann J, Boettger MK, Ruhland C, et al. Cardio-respiratory coupling indicates suppression of vagal activity in acute schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2009;112(1-3):153-7.
8. Eaton W. Coeliac disease and schizophrenia: population based case control study with linkage of Danish national registers. *BMJ.* 2004;328(7437):438-9.
9. Ozdemir V, Jamal M, Osapay K, et al. Cosegregation of gastrointestinal ulcers and schizophrenia in a large national inpatient discharge database: revisiting the « brain-gut axis » hypothesis in ulcer pathogenesis. *J. Investig. Med.* 2007;55(6):315-20.
10. Peupelmann J, Quick C, Berger S, et al. Linear and non-linear measures indicate gastric dysmotility in patients suffering from acute schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2009;33(7):1236-40.
11. Severance EG, Alaedini A, Yang S, et al. Gastrointestinal inflammation and associated immune activation in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2012;138(1):48-53.
12. Giaroni C, De Ponti F, Cosentino M, Lecchini S, Frigo G. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology.* 1999;117(6):1438-58.
13. Singaram C, Ashraf W, Gaumnitz EA, et al. Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet.* 1995;346(8979):861-4.
14. Jessen KR, Hills JM, Saffrey MJ. Immunohistochemical demonstration of GABAergic neurons in the enteric nervous system. *J. Neurosci.* 1986;6(6):1628-34.

15. Krantis A. GABA in the Mammalian Enteric Nervous System. *Physiology*. 2000;15(6):284-90.
16. Nakajima K, Tooyama I, Kuriyama K, Kimura H. Immunohistochemical demonstration of GABAB receptors in the rat gastrointestinal tract. *Neurochem. Res.* 1996;21(2):211-5.
17. Poulter MO, Singhal R, Brown LA, Krantis A. GABA(A) receptor subunit messenger RNA expression in the enteric nervous system of the rat: implications for functional diversity of enteric GABA(A) receptors. *Neuroscience*. 1999;93(3):1159-65.
18. Lipska BK. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J. Psychiatry. Neurosci.* 2004;29(4):282-6.
19. Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*. 2000;23(3):223-39.
20. Le Pen G, Moreau J-L. Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine, olanzapine and risperidone but not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27(1):1-11.
21. Endo K, Hori T, Abe S, et al. Alterations in GABAA receptor expression in neonatal ventral hippocampal lesioned rats: Comparison of prepubertal and postpubertal periods. *Synapse*. 2007;61(6):357-66.
22. François J, Ferrandon A, Koning E, et al. Selective reorganization of GABAergic transmission in neonatal ventral hippocampal-lesioned rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2009;12(8):1097-110.
23. Tseng KY, Chambers RA, Lipska BK. The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 2009;204(2):295-305.
24. Angst M-J, Macedo CE, Guiberteau T, Sandner G. Alteration of conditioned emotional response and conditioned taste aversion after neonatal ventral hippocampus lesions in rats. *Brain Res.* 2007;1143:183-92.
25. Hyland NP, Cryan JF. A gut feeling about GABA: focus on GABAB receptors. *Front. Pharmacol.* 2010;1:124.
26. Bayer S, Jellali A, Crenner F, Aunis D, Angel F. Functional evidence for a role of GABA receptors in modulating nerve activities of circular smooth muscle from rat colon in vitro. *Life Sci.* 2003;72(13):1481-93.
27. Krantis A, Harding RK. GABA-related actions in isolated in vitro preparations of the rat small intestine. *European Journal of Pharmacology*. 1987;141(2):291-8.

28. Bayer S, Raul F, Boehm N, Klein A, Angel F. Modulatory effects of polyamines and GABA on rat ileal motility in vitro. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 1999;23(8-9):824-31.
29. Erdo SL, Bowery NG. GABAergic mechanisms in the mammalian periphery. New-York: Raven Press; 1986.
30. Allan RD, Dickenson HW. Evidence that antagonism by delta-aminovaleric acid of GABAB receptors in the guinea-pig ileum may be due to an interaction between GABAA and GABAB receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 1986;120(1):119-22.
31. Kurjak M, Fichna J, Harbarth J, et al. Effect of GABA-ergic mechanisms on synaptosomal NO synthesis and the nitrenergic component of NANC relaxation in rat ileum. *Neurogastroenterol. Motil.* 2011;23(5):e181-e190.
32. Frigo GM, Galli A, Lecchini S, Marcoli M. A facilitatory effect of bicuculline on the enteric neurones in the guinea-pig isolated colon. *Br. J. Pharmacol.* 1987;90(1):31-41.
33. Tonini M, Crema A, Frigo GM, et al. An in vitro study of the relationship between GABA receptor function and propulsive motility in the distal colon of the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 1989;98(4):1109-18.
34. Williamson S, Faulkner-Jones BE, Cram DS, Furness JB, Harrison LC. Transcription and translation of two glutamate decarboxylase genes in the ileum of rat, mouse and guinea pig. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1995;55(1-2):18-28.
35. Fletcher E, Clark M, Furness J. Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. *Cell and Tissue Research.* 2002;308(3):339-46.
36. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012;9(5):286-94.
37. Lundgren O. Sympathetic input into the enteric nervous system. *Gut.* 2000;47(S4):33-35.
38. Chang HY, Mashimo H, Goyal RK. Current concepts of vagal efferent projections to the gut. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003;284(3):G357-G366.
39. Bär K-J, Boettger MK, Berger S, et al. Decreased baroreflex sensitivity in acute schizophrenia. *J. Appl. Physiol.* 2007;102(3):1051-6.
40. Bär K-J, Boettger MK, Schulz S, et al. The interaction between pupil function and cardiovascular regulation in patients with acute schizophrenia. *Clin. Neurophysiol.* 2008;119(10):2209-13.
41. Berger S, Hocke M, Bär K-J. Gastric dysmotility in healthy first-degree relatives of patients with schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2010;34(7):1294-9.

Résumé des résultats

Une lésion néonatale de l'hippocampe ventral conduit à :

- une augmentation du tonus de base du LMJ et de la contraction induite par la NS dans le CMPC.
- une diminution du tonus de base en présence de GABA dans le CMPC.
- une diminution de la relaxation induite par la NS dans le LMJ et dans le CMPC ainsi qu'une augmentation de la contraction du CMPC en présence de baclofen.
- une perte de la diminution de la relaxation induite par la NS dans le LMJ et une réduction de l'augmentation de la contraction du CMPC en présence de bicuculline.
- une absence d'effet du muscimol et du CGP 52432.
- une augmentation de l'expression de GAD67 dans le jéjunum et du récepteur GABA-B2 dans le côlon proximal.

V. Discussion : altérations périphériques chez les rats NVHL

Dans cette partie, nous discuterons des résultats présentés dans les articles B et C.

A. Hippocampe et régulation de la prise alimentaire

La régulation de la prise alimentaire nécessite l'intégration des signaux périphériques dans des structures neuroanatomiques clés comme l'hypothalamus et le tronc cérébral (revue dans Luquet & Cruciani-Guglielmacci, 2009). Elle dépend également du traitement de ces informations dans d'autres structures cérébrales contrôlant le comportement. L'hippocampe est une structure impliquée dans l'apprentissage et la mémoire dont le rôle dans la régulation énergétique a fait l'objet d'une attention particulière. En effet, l'hippocampe dorsal reçoit des informations sensibles du cortex alors que l'hippocampe ventral est associé aux aires sous-

corticales impliquées dans la régulation énergétique, et plus particulièrement aux noyaux hypothalamiques comme l'ARC (Davidson *et al.*, 2005 ; Cenquizca & Swanson, 2006). L'hippocampe a également accès à des signaux qui sont transmis au NTS via les afférences vagales ou spinales provenant du TD. Des récepteurs à de nombreuses hormones circulantes ont été mis en évidence dans l'hippocampe (Lathe, 2001). Ces hormones sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire mais également dans la modulation de l'apprentissage et la mémoire dans l'hippocampe (Davidson *et al.*, 2009). Finalement, Kanoski *et al.* (2011) ont montré que l'hippocampe ventral contribue aux procédés neuronaux associés à l'apprentissage et au souvenir d'un lieu où la nourriture a été consommée et que ce type de mémoire est modulé par des signaux hormonaux qui informent le cerveau du statut énergétique de l'organisme. Ainsi, il existe deux raisons de s'intéresser à l'hippocampe dans le cadre de la régulation de la balance énergétique : cette structure est impliquée directement dans la régulation de la prise alimentaire et indirectement via ses connections avec l'hypothalamus et le NTS . Par conséquent, des dommages dans cette structure peuvent entraîner des altérations dans la réception ou la transmission des informations impliquées dans la régulation énergétique (Davidson *et al.*, 2009).

1. Lésion de l'hippocampe et profil hormonal chez le rat

A notre connaissance, aucune étude n'a évalué l'impact d'une lésion de l'hippocampe sur le profil hormonal chez le rat ou chez l'Homme. Seules quelques études ont mis en évidence des corrélations entre la taille de l'hippocampe et les concentrations plasmatiques en certaines hormones associées à la prise alimentaire.

Nous avons montré que la lésion de l'hippocampe ventral chez le rat conduit à une augmentation de la concentration plasmatique en CCK. La masse de l'estomac (avec le bol alimentaire) est également significativement plus élevée chez les rats NVHL ce qui traduit une distension gastrique résultant probablement d'un ralentissement de la vidange gastrique. Ces résultats sont en accord avec les études qui montrent que l'inhibition de la vidange gastrique par la CCK génère une sensation de satiété et finalement inhibe la prise alimentaire (Moran & Kinzig, 2004 ; Ghishan *et al.*, 2006 ; Dockray, 2009b). Dans l'hippocampe, la CCK se fixe à ses récepteurs et inhibe la prise alimentaire (Parrott & Baldwin, 1981 ; Lathe, 2001 ; Lee & Soltesz, 2011). De plus, la distension et la stimulation gastrique augmentent l'expression de la CCK dans cette structure (Xu *et al.*, 2008). Les neurones contenant la CCK

dans l'hippocampe participent donc à l'intégration de la satiété dans les circuits neuronaux composés du NTS, de l'hypothalamus et du système limbique. Ils jouent ainsi sur les signaux afférents gastriques qui parviennent à l'hippocampe (Xu *et al.*, 2008). Par conséquent, l'augmentation de la concentration plasmatique en CCK pourrait résulter d'une compensation, en périphérie, de la perte du signal induit par la CCK dans l'hippocampe.

La concentration plasmatique en ghréline n'est pas modifiée chez les rats NVHL. En plus d'une action sur les afférences vagales ou sur l'hypothalamus (Date *et al.*, 2005), la ghréline circulante stimule la prise alimentaire en se fixant sur ses récepteurs dans l'hippocampe (Carlini *et al.*, 2004 ; Zigman *et al.*, 2006). Les expériences sur lesquelles se basent ces conclusions et celles qui mettent en évidence les variations les plus importantes en ghréline circulante sont réalisées chez des rats ayant subi une privation alimentaire (Sánchez *et al.*, 2004) tandis que nos animaux avaient libre accès à la nourriture. Nous suggérons donc de reprendre ces mesures dans les mêmes conditions que celles utilisées dans la littérature, même si cela soulève quelques problèmes méthodologiques.

Chez les rats NVHL, la concentration plasmatique en leptine et en triglycérides ainsi que la masse de tissu adipeux blanc sont diminuées. Ces résultats sont confirmés par les études qui ont montré que les concentrations plasmatiques en triglycérides, en cholestérol et en leptine sont corrélées à la masse de tissu adipeux (Terry *et al.*, 1989 ; Ahima *et al.*, 1996). Dans l'hippocampe ventral, la leptine se fixe à ses récepteurs (Lathe, 2001) ce qui conduit à une suppression de la prise alimentaire et une réduction de la masse corporelle chez les rats (Kanoski *et al.*, 2011). Nos résultats sont en accord avec les études montrant une corrélation positive entre la taille de l'hippocampe et la concentration plasmatique en leptine chez l'Homme (Narita *et al.*, 2009).

La concentration plasmatique en adiponectine est réduite chez les rats NVHL. L'adiponectine a un rôle anorexigène dans l'hypothalamus (Kadowaki *et al.*, 2006 ; Dridi & Taouis, 2009). A l'heure actuelle, on sait seulement qu'en se fixant sur ses récepteurs dans l'hippocampe (Jeon *et al.*, 2009), l'adiponectine protège et stimule la prolifération neuronale (Qiu *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2011). Dans un premier temps, la réduction de la concentration plasmatique en adiponectine peut sembler contradictoire avec les réductions de tissu adipeux et de leptine circulante (Phillips *et al.*, 2003). Néanmoins, Masaki *et al.* (in press) ont mis en évidence une association entre le volume de l'hippocampe et la concentration plasmatique en adiponectine chez des patients diabétiques de type 2, ce qui

laisse penser que l'adiponectine et l'hippocampe interagissent et se stimulent mutuellement. Ainsi, cette interaction pourrait expliquer qu'une lésion néonatale de l'hippocampe ventral conduit à la réduction de la concentration plasmatique en adiponectine.

Les concentrations plasmatiques en insuline et en glucose chez les rats NVHL ne sont pas modifiées. Or, l'insuline est une hormone pancréatique synthétisée en réponse à l'augmentation de la glycémie et qui conduit à une diminution de la prise alimentaire et de la masse corporelle (Woods *et al.*, 1979 ; Porte & Woods, 1981 ; Baskin *et al.*, 1999). A l'heure actuelle, bien que des récepteurs à l'insuline aient été mis en évidence dans l'hippocampe, son rôle dans la régulation de la prise alimentaire dans cette structure a été peu étudié. On sait seulement que l'activation de l'hippocampe après une stimulation avec des images d'aliments à haute teneur calorique correspond à une augmentation d'insuline plasmatique chez l'Homme (Wallner-Liebmann *et al.*, 2010). Dans cette étude, l'insuline est dosée à jeun tandis que nos animaux avaient libre accès à la nourriture. Nous suggérons donc également de doser l'insuline et le glucose après une période de privation alimentaire.

Nous n'avons pas mis en évidence de changement de concentration plasmatique en corticostérone (glucocorticoïde principal chez le rat) et en hormone corticotrope (ou adrénocorticotrophine) chez les rats NVHL. A l'inverse, nous avons montré une augmentation de la concentration plasmatique en cortisol. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Chrasupta *et al.* (2003) qui montre que certaines réponses nerveuses et neuroendocrines au stress se prolongent chez les rats NVHL bien que la concentration plasmatique basale en corticostérone ne varie pas. Ainsi, la lésion néonatale de l'hippocampe ventral pourrait affecter la formation du circuit central du stress et favoriser l'émergence des aberrations comportementales observées. Au-delà de la régulation du stress, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien participe à la régulation de la prise alimentaire. Ainsi, il a été montré que les glucocorticoïdes stimulent la prise alimentaire chez l'Homme (Tataranni *et al.*, 1996 ; Dallman *et al.*, 2004) alors que chez le rat la corticostérone stimule la prise alimentaire (Gemmill *et al.*, 2003) mais le cortisol l'inhibe via une réduction de l'hormone corticotrope et de la corticostérone (Bagdy *et al.*, 1989 ; Chen, 2011). Des récepteurs aux glucocorticoïdes et plus particulièrement au cortisol ont été mis en évidence dans l'hippocampe chez le rat (Zhe *et al.*, 2008) et participent à la régulation de la balance énergétique (Holmes *et al.*, 1997 ; Makino *et al.*, 2001). Différentes études ont montré que des taux élevés de cortisol sont associés à des volumes réduits de l'hippocampe chez l'Homme (Starkman *et al.*, 1992 ; Wiedenmayer *et al.*, 2006), ce qui semble être en accord avec nos résultats.

2. Lésion de l'hippocampe, prise alimentaire et masse corporelle chez le rat

Nous avons mis en évidence une réduction de la masse corporelle chez les rats NVHL, comme cela a été montré précédemment par Sandner *et al.* (2010) et Lecourtier *et al.* (2012). La réduction de la masse corporelle chez ces rats pourrait être le résultat d'une diminution de la prise alimentaire et/ou d'une augmentation de la dépense énergétique (Näslund & Hellström, 2007). Par conséquent, nous pouvons penser que les variations hormonales observées chez les rats NVHL sont associées à des altérations de la balance énergétique, comme cela a été montré chez les patients atteints d'anorexie mentale. Ces patients présentent un profil hormonal relativement comparable à celui des rats NVHL (Gwirtsman *et al.*, 1989 ; Tamai *et al.*, 1993 ; Eckert *et al.*, 1998 ; Tolle *et al.*, 2003 ; Hebebrand *et al.*, 2007 ; Misra *et al.*, 2007) avec une réduction de la prise alimentaire ainsi qu'une augmentation de l'activité physique. Ces modifications aboutissent également à une réduction de la masse corporelle (Eckert *et al.*, 1998) même si le degré d'amaigrissement est nettement supérieur à celui observé chez les rats NVHL (Scalfi *et al.*, 1999). Les résultats obtenus dans ces différentes études sont résumés dans la **Table 1**.

Modèle		NVHL	Lésion de l'HC à l'âge adulte	Schizophrénie	Anorexie mentale	Syndrome métabolique
Paramètres		Rat	Rat	Homme	Homme	Homme
Balance énergétique	Prise alimentaire	NC	→	(DI)	→	→
	Dépense énergétique	NC	→	= (DI)	→	→
	Masse corporelle	→	→	= (IMC)	→	→
Concentrations hormonales plasmatiques	Leptine	→	NC	→	→	→
	Adiponectine	→	NC	(DI)	→	→
	CCK	→	NC	NC	→	(DI)
	Ghréline	=	NC	NC	→	→
	Insuline	=	NC	= ou →	→	→
	ACTH	=	NC	(DI)	=	→
	Cortisol	→	NC	→	→	→

Table 1 : Comparaison entre différents paramètres impliqués dans la régulation de la balance énergétique chez des modèles de lésion de l'hippocampe chez le rat et dans des pathologies psychiatriques et métaboliques chez l'Homme. NC : non connu, DI : données insuffisantes ou contradictoires, IMC : indice de masse corporelle.

De nombreuses études ont montré qu'une lésion de l'hippocampe ventral chez le rat adulte conduit à une altération du comportement alimentaire. Cependant, les résultats obtenus sont différents de ceux observés chez les rats NVHL. En effet, une lésion neurotoxique de l'hippocampe ventral chez les rats adultes conduit à une diminution de la consommation d'aliments par repas de 50% mais à une augmentation du nombre de repas journaliers de 2.5 fois, ce qui n'induit pas de changement de la prise alimentaire journalière totale (Clifton *et al.*, 1998). A l'inverse, Forloni *et al.* (1986) ont mis en évidence une augmentation de la prise alimentaire et de la masse corporelle après une lésion de l'hippocampe ventral mais uniquement chez les rats femelles. Plus récemment, l'équipe de Davidson a montré qu'une lésion de l'hippocampe ventral par injection d'acide iboténique entraîne une augmentation de la prise alimentaire et de la masse corporelle mais sans modification de l'adiposité chez le rat (Davidson *et al.*, 2005 ; Davidson *et al.*, 2009). Dans les mêmes conditions, la lésion totale de l'hippocampe induit, en plus, une augmentation de l'activité, notamment dans la zone de la cage contenant la nourriture et une augmentation de la dépense énergétique pendant la nuit.

Ainsi, si la lésion de l'hippocampe ventral est effectuée en période néonatale, ses effets sur la balance énergétique diffèrent de ceux observés lorsque la lésion est réalisée à l'âge adulte. De telles différences ont été rapportées dans d'autres fonctions neurophysiologiques (par exemple mémoire, réponse sensorimotrice, nociception ; références dans Khaing *et al.*, 2000 ; Lipska *et al.*, 2002 ; Al Amin *et al.*, 2004). Or, ces fonctions, comme la prise alimentaire, sont régulées par certaines structures cérébrales qui reçoivent des projections de l'hippocampe ventral (Witter *et al.*, 1990). Une lésion néonatale conduit à une mort cellulaire dans ces structures plus importante qu'une lésion à l'âge adulte (Khaing *et al.*, 2000). En particulier, des structures impliquées dans la régulation de la prise alimentaire sont particulièrement affectées par une lésion néonatale, notamment le striatum et le noyau accumbens, mais pas le CPF (Morton *et al.*, 2006 ; Kringelbach, 2007). Ainsi, une lésion néonatale de l'hippocampe ventral peut affecter la structure et la fonction de régions qui sont interconnectées d'une manière différente d'une lésion chez l'adulte (Khaing *et al.*, 2000), ce qui, par conséquent, pourrait conduire à des effets différents sur la masse corporelle. Des expériences complémentaires devraient permettre de définir plus précisément l'importance de l'interaction entre ces régions dans la réduction de la prise alimentaire via notamment des lésions de l'hippocampe ventral et/ou du striatum, du nucleus accumbens, du CPF à différents âges. Une approche consistant à pratiquer des lésions néonatales du cortex préfrontal est en cours de développement (Meyer & Louilot, 2012).

3. Schizophrénie et altérations du comportement alimentaire

A l'heure actuelle, l'association entre la schizophrénie et les perturbations métaboliques continue de faire débat. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence des perturbations liées au syndrome métabolique, telles que l'obésité, chez les patients atteints de schizophrénie. Cependant, la plupart de ces études ont été réalisées chez des patients traités avec des antipsychotiques. Or, certains antipsychotiques peuvent être à l'origine d'un syndrome métabolique chez des patients non schizophrènes ou des personnes saines (Lambert & Chapman, 2004 ; Lamberti *et al.*, 2006 ; Remington, 2006 ; Kraemer *et al.*, 2011). Nous avons donc mené une analyse bibliographique sur l'association entre schizophrénie et troubles de la balance énergétique chez des patients sans traitement (**Table 2**).

Paramètres	=			
Balance énergétique	Prise alimentaire	Cohn <i>et al.</i> , 2006		
	Dépense énergétique	Nilsson <i>et al.</i> , 2006	Ryan, 2003 Cohn <i>et al.</i> , 2006	
	Masse corporelle	Spelman <i>et al.</i> , 2007 Verma <i>et al.</i> , 2009 Padmavati <i>et al.</i> , 2010	Alvarez <i>et al.</i> , 2000 Kraus <i>et al.</i> , 2001 Ryan, 2003 Atmaca <i>et al.</i> , 2003a Atmaca <i>et al.</i> , 2003b Cohn <i>et al.</i> , 2006 Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2007 Sengupta <i>et al.</i> , 2008 Guest <i>et al.</i> , 2010 Dasgupta <i>et al.</i> , 2010	Thakore <i>et al.</i> , 2002 Thakore, 2004
Concentrations plasmatiques hormonales	Leptine	Kraus <i>et al.</i> , 2001 Atmaca <i>et al.</i> , 2003b Cheng <i>et al.</i> , 2010	Spelman <i>et al.</i> , 2007 Cheng <i>et al.</i> , 2010	Arranz <i>et al.</i> , 2004 Wang <i>et al.</i> , 2007
	Adiponectine	Cohn <i>et al.</i> , 2006	Cheng <i>et al.</i> , 2010	
	CCK			
	Ghréline			
	Insuline		Spelman <i>et al.</i> , 2007 Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2007 Sengupta <i>et al.</i> , 2008 Cheng <i>et al.</i> , 2010	Ryan, 2003 Spelman <i>et al.</i> , 2007 Guest <i>et al.</i> , 2010
	ACTH			Ryan <i>et al.</i> , 2004
	Cortisol		Cohn <i>et al.</i> , 2006	Ryan, 2003 Ryan <i>et al.</i> , 2004 Spelman <i>et al.</i> , 2007 Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2007 Cheng <i>et al.</i> , 2010 Guest <i>et al.</i> , 2010
	Glucose		Venkatasubramanian <i>et al.</i> , 2007 Sengupta <i>et al.</i> , 2008 Padmavati <i>et al.</i> , 2010 Dasgupta <i>et al.</i> , 2010	Ryan, 2003 Cohn <i>et al.</i> , 2006 Spelman <i>et al.</i> , 2007 Xuan <i>et al.</i> , 2011
	Triglycérides		Spelman <i>et al.</i> , 2007 Padmavati <i>et al.</i> , 2010 Dasgupta <i>et al.</i> , 2010	

Table 2 : Données bibliographiques sur les paramètres impliqués dans la régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire chez des patients atteints de schizophrénie et non traités avec des antipsychotiques. CCK et ghréline : pas d'information disponible.

Nous pouvons considérer que les données d'études non systématisées portant sur les patients atteints de schizophrénie mais non traités (synthétisées dans le **Tableau 1**) sont peu nombreuses comparées à celles qui évaluent ces paramètres sans exclure l'impact du traitement. Il existe une forte hétérogénéité entre les cohortes, comme le suggère l'étude de Cheng *et al.* (2010). Par conséquent, même si les études antérieures à l'introduction des antipsychotiques suggèrent une prise de poids chez les patients atteints de schizophrénie (références dans Bou Khalil, 2011), il est difficile de déterminer la balance énergétique et le profil hormonal de manière précise chez ces patients.

De manière intéressante, les rats NVHL semblent présenter une forme d'anorexie mentale, bien qu'il s'agisse de l'image en miroir du syndrome métabolique. L'anorexie mentale et la schizophrénie, bien que considérées de nos jours comme des maladies distinctes, ont longtemps été associées (Lyketsos *et al.*, 1985). En effet, de nombreuses études de cas font état de la coexistence de ces deux pathologies (par exemple : Cheung & Wilder-Smith, 1995 ; Cinemre & Kulaksizoglu, 2007 ; EbrahimiDaryani *et al.*, 2011). De plus, certains patients atteints d'anorexie mentale présentent des symptômes psychotiques similaires à ceux observés chez les patients atteints de schizophrénie (Jones & Watson, 1997). Certains antipsychotiques classiquement utilisés pour traiter la schizophrénie peuvent également conduire à une prise de poids chez les patients anorexiques (Powers *et al.*, 2002 ; Powers *et al.*, 2007). A l'image des patients atteints de schizophrénie, les patients atteints d'anorexie mentale présentent une augmentation du volume des ventricules associée à une réduction du volume de matière grise totale et de la formation hippocampe-amygdale (Giordano *et al.*, 2001) ainsi qu'une réduction bilatérale du volume de l'hippocampe (Connan *et al.*, 2006). D'autre part, l'anorexie pourrait être le résultat de complications obstétriques conduisant à des troubles neurodéveloppementaux (Cnatingius *et al.*, 1999). Pris ensemble, ces arguments ont été considérés par Lipska pour développer le modèle NVHL. On constate qu'ils s'appliquent au moins aussi bien à l'anorexie mentale. On peut alors considérer soit que le modèle NVHL a une portée générale pour expliquer les mécanismes neurodéveloppementaux d'une plus large famille de maladies psychiatriques que la seule schizophrénie, soit qu'il modélise un mécanisme physiopathologique commun à l'anorexie et la schizophrénie.

A l'heure actuelle, l'existence d'une interaction entre la schizophrénie et les troubles alimentaires est largement admise. Cependant, il est difficile d'établir si les patients atteints de schizophrénie ont tendance à présenter une forme d'anorexie mentale, comme ce qui est observé chez les rats NVHL, ou à l'opposé un syndrome métabolique. Cette difficulté repose

notamment sur l'induction d'un syndrome métabolique par de nombreux antidépresseurs ou antipsychotiques utilisés pour soigner la schizophrénie. Ainsi, Bou Khalil (2011) a récemment discuté de la relation entre la schizophrénie et certains facteurs métaboliques, tout en restant prudent sur l'impact des traitements : « Lorsqu'on évoque cette question d'incrimination du traitement psychopharmacologique de la schizophrénie dans l'induction du syndrome métabolique on a toujours tendance à oublier que les sujets atteints de schizophrénie prennent fréquemment, au long cours, plusieurs autres psychotropes ».

B. Hippocampe et troubles digestifs

1. Lésion de l'hippocampe, inflammation et motricité digestive

Nos travaux mettent en évidence un état inflammatoire intestinal chez les rats NVHL qui pourrait ressembler aux MICI chez l'Homme. Celles-ci regroupent les maladies liées à l'inflammation du TD à caractère chronique et d'origine inconnue comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (ou colite ulcéreuse). Ces pathologies sont secondaires à une activation du système immunitaire, notamment une infiltration de cellules inflammatoires dans la paroi digestive. Les recherches récentes dans le domaine de la neuro-immunologie ont mis en évidence le lien fort qui existe entre le système nerveux et immunitaire (revues dans Rabin *et al.*, 1989 ; Rosas-Ballina & Tracey, 2009 ; Kioussis & Pachnis, 2009)

Dans cette étude nous avons mis en évidence une augmentation du nombre de mastocytes et de l'activité de la myéloperoxydase dans le jéjunum des rats NVHL. Les concentrations de *tumor necrosis factor α* et d'interleukine 1β dans le plasma, dans le jéjunum et le côlon proximal sont trop faibles pour être détectées et pour être exploitables. A l'inverse, les concentrations en leptine et en adiponectine dans ces tissus sont significativement réduites chez les rats NVHL. Les activités contractiles du jéjunum et du côlon proximal sont également augmentées chez les rats NVHL. L'ensemble de ces résultats, couplé à l'aspect de l'intestin, suggère l'existence d'une inflammation chronique dans le jéjunum des rats NVHL (revue dans De Schepper *et al.*, 2008).

Les mastocytes sont issus de cellules circulantes qui migrent dans les tissus périphériques (revue dans De Winter *et al.*, 2012). Dans le TD, ils infiltrent l'épithélium, la muqueuse et la sous-muqueuse où ils sécrètent des médiateurs inflammatoires parmi lesquels l'histamine, la sérotonine et des cytokines comme le *tumor necrosis factor α* et

l'interleukine 1 β . Les mastocytes et leur produit de dégranulation sont impliqués dans l'inflammation chronique du TD (De Schepper *et al.*, 2008) et sont significativement augmentés dans la muqueuse des patients atteints de MICI (Bischoff *et al.*, 1996). La myéloperoxidase est une enzyme exprimée principalement par les neutrophiles mais aussi par les granulocytes et les monocytes du sang. Son activité est augmentée dans les tissus inflammés, indiquant une infiltration de neutrophiles (Grisham *et al.*, 1990). De plus, son activité dans le TD est particulièrement augmentée chez les patients atteints de MICI (Saiki, 1998). Ainsi, l'augmentation de la densité de mastocytes et de l'activité de la myéloperoxidase montre une inflammation localisée dans le jéjunum.

Le rôle de la leptine et de l'adiponectine dans l'inflammation intestinale reste discuté (revue dans Karmiris *et al.*, 2008). Néanmoins, Barbier *et al.* (1998) ont montré que les premiers jours d'une colite sont caractérisés par l'augmentation de la concentration plasmatique en leptine associée à une réduction de la prise alimentaire et de la masse corporelle. Après plusieurs jours l'inflammation devient chronique. A ce stade, les animaux ont perdu 10% de leur masse corporelle et la concentration en leptine est inférieure à son niveau basal. Cependant, chez les patients atteints de MICI, les concentrations plasmatiques en leptine sont soit réduites soit augmentées (Karmiris *et al.*, 2008). Chez ces patients, la concentration plasmatique en adiponectine peut également varier et ce en fonction de la pathologie inflammatoire considérée (Karmiris *et al.*, 2006 ; Valentini *et al.*, 2009 ; Weigert *et al.*, 2010). Par conséquent, il est difficile de se prononcer sur l'implication de ces adipokines dans le maintien de l'inflammation du jéjunum.

Des altérations dans les fonctions motrices du TD sont souvent associées à une inflammation (revue dans Ozaki *et al.*, 2005 ; Akiho, 2010). Chez les patients atteints de MICI, des troubles de la motricité sont associés à une altération du fonctionnement des neurones entériques, ainsi que du réseau des cellules interstitielles de Cajal ou encore des cellules musculaires lisses elles-mêmes (Ozaki *et al.*, 2005 ; Ohama *et al.*, 2007). Chez l'Homme ou chez les modèles animaux, l'inflammation intestinale s'accompagne soit d'une augmentation, soit d'une diminution de la contractilité des muscles lisses en fonction du profil des cytokines libérées (Ohama *et al.*, 2007). Ainsi, l'augmentation des activités contractiles spontanées du MLJ et du MCCP ainsi que de la contraction induite par la NS dans le MCCP chez les rats NVHL peut confirmer l'existence d'une inflammation intestinale dans ce modèle.

Une inflammation digestive est associée à une hypertrophie et une hyperplasie des couches musculaires lisses intestinales (Blennerhassett *et al.*, 1992 ; Törnblom *et al.*, 2002 ; De Man *et al.*, 2003). A l'inverse, dans notre étude, les couches musculaires lisses du jéjunum sont réduites alors que celles du côlon proximal sont augmentées. Cependant, des déficits nutritionnels, plus particulièrement en protéines, peuvent conduire à une atrophie des couches musculaires lisses et à des altérations de la motricité digestive (Moreira *et al.*, 2008 ; Gomes *et al.*, 2009 ; Franco *et al.*, 2010). Comme la leptine stimule le transport et l'absorption de peptides dans l'intestin (Buyse *et al.*, 2002), la diminution de sa concentration plasmatique pourrait conduire à un déficit dans l'absorption des protéines. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'une lésion néonatale de l'hippocampe ventral conduit à un déficit nutritionnel qui peut, en plus d'une inflammation, altérer la structure et la fonction intestinale. Ainsi, même s'il est difficile d'expliquer la coexistence d'une inflammation et d'une réduction de l'épaisseur des couches musculaires, des études plus précises (intégrité des entérocytes, des jonctions paracellulaires, de la perméabilité cellulaire) sont nécessaires pour vérifier notre hypothèse.

L'ensemble de ces résultats montre une inflammation chronique localisée dans le jéjunum des rats NVHL. Le nerf vague, en plus de son rôle dans la régulation du rythme cardiaque, de la sécrétion hormonale ou des fonctions digestives, est impliqué dans le contrôle des réponses immunitaires. Ainsi, les afférences vagales régulent la réponse inflammatoire via l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et la sécrétion de glucocorticoïdes (Van Der Zanden *et al.*, 2009). De plus, les efférences vagales ont été impliquées récemment dans le contrôle de la réponse immunitaire (Van Der Zanden *et al.*, 2009 ; Bonaz, 2010). En effet, l'activation vagale cholinergique réduit l'inflammation intestinale, notamment en inhibant l'activité des macrophages et la libération de cytokines. A l'inverse, une section du nerf vague (vagotomie) conduit au développement d'une inflammation digestive (Ghia *et al.*, 2006). La stimulation du nerf vague réduit la perte de masse corporelle et les marqueurs inflammatoires de la MICI (Meregani *et al.*, 2011). Par conséquent, nous pouvons penser que l'inflammation du jéjunum pourrait être le résultat d'une dysautonomie vagale.

En ce qui concerne la neurotransmission entérique, nous avons montré que la lésion néonatale de l'hippocampe ventral conduit à une augmentation des activités contractiles du jéjunum et du côlon proximal ainsi que de l'activité et/ou du nombre des récepteurs GABA-A et GABA-B sur les neurones moteurs intrinsèques. De plus, le taux d'expression de l'ARNm du récepteur GABA-B2 est significativement réduit dans le côlon proximal alors que

l'expression de l'enzyme catalysant la synthèse du GABA, GAD-67, est augmentée dans le jéjunum des rats NVHL. Les transporteurs du GABA GAT-1 et GAT-3 ont tendance à varier dans le côlon proximal de ces rats. L'ensemble de ces résultats montre que la lésion néonatale de l'hippocampe ventral entraîne une altération de la réception, de la synthèse et dans une moindre mesure du transport du GABA dans le SNE.

Un changement dans la structure et la fonction des neurones en réponse à des altérations des signaux d'entrée est appelé « plasticité neuronale » (Giaroni *et al.*, 1999). Les neurones du SNE reçoivent des signaux en provenance du SNA sympathique et parasympathique (Lundgren, 2000b ; Chang *et al.*, 2003), même si des changements adaptatifs dans le SNE permettent de minimiser la perte de fonctions du TD (revue dans Li & Owyang, 2003). Ainsi, une vagotomie conduit à une modification du tonus gastrique, une dilatation de l'estomac et une inhibition de la vidange gastrique ainsi qu'à une réduction de la prise alimentaire et de la masse corporelle chez le rat (Mordes *et al.*, 1979). Dans le cas d'une vagotomie chronique, les fonctions gastriques sont partiellement restaurées via des changements dans les réflexes nerveux intrinsèques (Li & Owyang, 2003). Par conséquent, les altérations fonctionnelles (neurotransmission GABAergique) et structurelles (distension gastrique) du TD peuvent résulter d'une altération des efférences vagues dans le SNE des rats NVHL.

A notre connaissance, peu d'études ont établi un lien entre l'hippocampe et le TD. Guan *et al.* (2003) ont montré qu'une injection de CCK-8 dans l'hippocampe inhibe la motricité gastrique, cet effet étant aboli par une vagotomie. Wang *et al.* (2006) ont mis en évidence une activation de l'hippocampe après une stimulation gastrique chez l'Homme. Ces résultats suggèrent l'existence d'une interaction fonctionnelle entre l'hippocampe et le réflexe vago-vagal (Guan *et al.*, 2003). Cependant, une réduction du volume de l'hippocampe a également été mise en évidence dans de nombreux troubles psychiatriques liés au stress tels que le stress post-traumatique ou le trouble de la personnalité *borderline* mais également dans d'autres troubles neuropsychiatriques et neurologiques comme la démence, les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington, l'alcoolisme chronique, l'encéphalite par herpes simplex et la lésion traumatique cérébrale (références dans Czéh & Lucassen, 2007). La plupart de ces pathologies sont associées à une altération du SNA et en particulier du système parasympathique (**Table 3**). Ce dysfonctionnement parasympathique peut conduire à de multiples troubles gastro-intestinaux. Finalement, le constat d'une altération parasympathique a mené à utiliser la stimulation électrique vagale comme traitement pour les troubles centraux

et indirectement pour les troubles gastro-intestinaux. Bien qu'il s'agisse d'observations indirectes, ces données suggèrent que l'hippocampe est une structure particulièrement importante dans la régulation du fonctionnement du SNA et par conséquent des fonctions gastro-intestinales.

Pathologie	Troubles gastro-intestinaux	Altération du système nerveux autonome
Dépression	Constipation, diarrhée, nausée, MICI (Haug <i>et al.</i> , 2002)	Oui : parasympathique (Ghia <i>et al.</i> , 2008)
Stress post-traumatique	Troubles digestifs fonctionnels, hypersensibilité viscérale (Irwin <i>et al.</i> , 1996; Mayer <i>et al.</i> , 2001)	Oui : altération du tonus vagal (Cohen <i>et al.</i> , 2000)
Trouble <i>borderline</i>	NC	NC
Démence	NC	Oui : dont parasympathique (Allan <i>et al.</i> , 2007)
Alzheimer	NC	Oui : parasympathique (Algotsson <i>et al.</i> , 1995)
Parkinson	Diarrhée, constipation, troubles de la motricité et de la vidange gastrique (Jain, 2011)	Oui : parasympathique ; dans tout le TD (Jain, 2011)
Huntington	Inflammation gastro-œsophagienne (Andrich <i>et al.</i> , 2009)	Oui : dont parasympathique (Andrich <i>et al.</i> , 2002)
Epilepsie	NC	Oui (Sevcencu & Struijk, 2010)
Alcoolisme chronique	Troubles de la motricité, dyspepsie (Portincasa <i>et al.</i> , 2001)	Oui (Portincasa <i>et al.</i> , 2001) Neuropathie vagale (Duncan <i>et al.</i> , 1980)
Encéphalite par herpes simplex	NC	NC
Lésion traumatique cérébrale	Anomalies motrices, altérations de la muqueuse (Bansal <i>et al.</i> , 2009)	Oui (Baguley <i>et al.</i> , 2008)

Table 3 : Troubles gastro-intestinaux et altérations du système nerveux autonome dans les pathologies psychiatriques liées au stress, les désordres neuropsychiatriques et neurologiques impliquant une réduction du volume de l'hippocampe. NC : non connu

2. Schizophrénie et pathologies digestives

A l'heure actuelle, peu d'études ont mis en évidence des troubles gastro-intestinaux chez les patients atteints de schizophrénie. Ces données suggèrent néanmoins l'existence de troubles fonctionnels digestifs (Gupta *et al.*, 1997), d'une inflammation (Buscaino, 1953 ; Severance *et al.*, 2012) et de troubles moteurs digestifs (Peupelmann *et al.*, 2009a) indépendamment de la prise d'antipsychotiques chez ces patients. Par conséquent, une seule étude (Peupelmann *et al.*, 2009a) a impliqué un dysfonctionnement du SNA dans les altérations digestives chez les patients atteints de schizophrénie, mettant en évidence une corrélation entre altération de l'activité gastrique et déséquilibre du SNA. Ces résultats sont en accord avec les études qui ont montré une réduction de la modulation parasympathique vagale dans le système cardiovasculaire et cardio-respiratoire (Bär *et al.*, 2005 ; Bär *et al.*, 2008b ; Peupelmann *et al.*, 2009a ; Khandoker *et al.*, 2010), dans la fonction pupillaire (Bär *et al.*, 2008a) et dans l'activité électrodermique (Zahn & Pickar, 2005 ; Rachow *et al.*, 2011) ainsi qu'une augmentation de la modulation sympathique chez ces patients (Bär *et al.*, 2007). A l'heure actuelle, les mécanismes précis du dysfonctionnement du SNA dans les troubles psychiatriques ne sont pas connus, probablement du fait du nombre important des structures corticales, sous-corticales et du tronc cérébral qui coordonnent la fonction autonome (Henry *et al.*, 2010). Un manque d'activation du CPF pourrait affecter le contrôle inhibiteur sur les fonctions autonomes chez les patients atteints de schizophrénie (Peupelmann *et al.*, 2009b).

VI. Conclusion et perspectives

Nous avons mis en évidence une réduction de la masse corporelle ainsi que des variations des hormones impliquées dans la prise alimentaire chez les rats NVHL. Cependant, ces variations, comme l'augmentation de l'activité locomotrice chez les rats NVHL (Beninger *et al.*, 2009), ne constituent qu'une preuve indirecte des perturbations de la prise alimentaire et/ou de la dépense énergétique qui peuvent conduire à la réduction de la masse corporelle. Par conséquent, des études ultérieures sont nécessaires afin de déterminer la variation de ces paramètres chez les rats NVHL. Dans une étude préliminaire, portant sur 4 rats présentant une lésion bilatérale complète de l'hippocampe ventral, l'hypothèse d'une réduction de la prise alimentaire et de l'augmentation de la dépense énergétique chez les rats NVHL semble se confirmer même si ces expériences doivent être poursuivies.

L'existence d'une interaction entre la schizophrénie et les troubles alimentaires est largement admise. Cependant, à l'heure actuelle, les données bibliographiques semblent contrastées : certaines études montrent que ces patients auraient une tendance à l'anorexie mentale, comme ce que nous avons mis en évidence chez les rats NVHL (dans ce cas l'anorexie mentale aurait un domaine de recouvrement avec la schizophrénie) alors que d'autres études montrent qu'ils présenteraient un syndrome métabolique. L'importance du traitement avec des antipsychotiques dans l'analyse de ces résultats a également été soulevée dans cette étude, les antipsychotiques de seconde génération étant impliqués dans le développement de l'obésité et du syndrome métabolique chez l'Homme. Par conséquent, des études ultérieures sont nécessaires afin de déterminer une altération de la prise alimentaire et de la dépense énergétique ainsi que de la masse corporelle et des hormones impliquées dans la régulation de la balance énergétique chez les patients atteints de schizophrénie (non traités). Finalement, l'implication du traitement avec des antipsychotiques dans les altérations de la balance énergétique devraient être déterminés chez les rats NVHL (comparaison de ces paramètres avec ou sans olanzapine ou clozapine par exemple), comme chez les patients atteints de schizophrénie.

Nous avons mis en évidence une inflammation du jéjunum ainsi qu'une altération des activités contractiles du TD chez les rats NVHL. Nous avons émis l'hypothèse que ces troubles pouvaient être le résultat d'un dysfonctionnement du SNA et en particulier du nerf vague. Afin de vérifier l'intégrité du fonctionnement du système nerveux autonome parasympathique et sympathique la variabilité du rythme cardiaque pourrait être mesurée chez les rats NVHL, comme ce qui a été fait chez les patients (cf Buchheit, 2006 ; Bonaz & Sabate, 2009). De plus, l'implication d'une altération du nerf vague dans les troubles digestifs et inflammatoires chez les rats NVHL pourrait être déterminée : soit en évaluant l'impact d'une vagotomie chez des rats pseudo-lésés et NVHL comparés à ces rats intacts (cf Ghia *et al.*, 2006), soit en évaluant l'amélioration des paramètres digestifs et comportementaux après des stimulations électriques vagues (cf Meregnani *et al.*, 2011). Chez les patients atteints de schizophrénie, des études ont mis en évidence des altérations autonomes dans différentes fonctions périphériques mais pas dans les fonctions intestinales. Ce manque résulte probablement du peu de données portant sur les altérations structurelles et fonctionnelles du TD chez ces patients. Par conséquent, des études seraient nécessaires afin d'établir si les patients atteints de schizophrénie, diagnostiqués mais non encore traités, présentent une altération des fonctions digestives ainsi qu'une inflammation gastro-intestinale et si ces

troubles sont associés à un déséquilibre dans le fonctionnement du SNA (éventuellement amélioration des symptômes après stimulations électriques vagales).

Les troubles périphériques associés à la schizophrénie peuvent constituer une gêne importante et un risque de mortalité précoce chez les patients. En particulier, les conséquences digestives de la schizophrénie peuvent porter sérieusement atteinte à la qualité de vie des patients. Ces troubles sont par conséquent un souci permanent pour les équipes soignantes. Même si des études complémentaires posent la difficulté d'inclusion de patients non traités, à plus long terme, elles pourraient déterminer le choix d'antipsychotiques basés sur leurs effets secondaires en relation avec la prise alimentaire et les troubles digestifs.



Références

- Adrian, T. E., Ferri, G. L., Bacarese-Hamilton, A. J., Fuessl, H. S., Polak, J. M. & Bloom, S. R.** 1985. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*, **89**, 1070–1077.
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. & Flier, J. S.** 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, **382**, 250–252.
- Akiho, H.** 2010. Low-grade inflammation plays a pivotal role in gastrointestinal dysfunction in irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, **1**, 97–105.
- Akoev, G. N., Filippova, L. V. & Sherman, N. O.** 1996. Mast cell mediators excite the afferents of cat small intestine. *Neuroscience*, **71**, 1163–1166.
- Al Amin, H. A., Atweh, S. F., Jabbur, S. J. & Saadé, N. E.** 2004. Effects of ventral hippocampal lesion on thermal and mechanical nociception in neonates and adult rats. *European Journal of Neuroscience*, **20**, 3027–3034.
- Algotsson, A., Viitanen, M., Winblad, B. & Solders, G.** 1995. Autonomic dysfunction in Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, **91**, 14–18.
- Allan, L. M., Ballard, C. G., Allen, J., Murray, A., Davidson, A. W., McKeith, I. G. & Kenny, R. A.** 2007. Autonomic dysfunction in dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **78**, 671–677.
- Alumets, J., Håkanson, R. & Sundler, F.** 1978. Distribution, ontogeny and ultrastructure of pancreatic polypeptide (PP) cells in the pancreas and gut of the chicken. *Cell and Tissue Research*, **194**, 377–386.
- Alvarez, J.-C., Cremniter, D., Gluck, N., Quintin, P., Leboyer, M., Berlin, I., Therond, P. & Spreux-Varoquaux, O.** 2000. Low serum cholesterol in violent but not in non-violent suicide attempters. *Psychiatry Research*, **95**, 103–108.
- American Psychiatric Association.** 2000. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Texte revision, fourth edn. Washington DC: American Psychiatric Association.
- Andrews, P. L. R.** 1986. Vagal afferent innervation of the gastrointestinal tract. *Progress in Brain Research*, **67**, 65–86.

- Andrews, P. L. R. & Sanger, G. J.** 2002. Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Current Opinion in Pharmacology*, **2**, 650–656.
- Andrich, J., Schmitz, T., Saft, C., Postert, T., Kraus, P., Epplen, J. T., Przuntek, H. & Agelink, M. W.** 2002. Autonomic nervous system function in Huntington's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **72**, 726–731.
- Andrich, J. E., Wobben, M., Klotz, P., Goetze, O. & Saft, C.** 2009. Upper gastrointestinal findings in Huntington's disease: patients suffer but do not complain. *Journal of Neural Transmission*, **116**, 1607–1611.
- Anini, Y. & Brubaker, P. L.** 2003. Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes*, **52**, 252–259.
- Aparicio, T., Kermorgant, S., Darmoul, D., Guilmeau, S., Hormi, K., Mahieu-Caputo, D. & Lehy, T.** 2005. Leptin and Ob-Rb receptor isoform in the human digestive tract during fetal development. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **90**, 6177–6184.
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., Shirakami, G., Usui, T., Shimatsu, A., Doi, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K. & Nakao, K.** 2001. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 4753–4758.
- Arnold, S. E.** 1999. Neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia: insights from neuropathology. *Development and Psychopathology*, **11**, 439–456.
- Arranz, B., Rosel, P., Ramirez, N., Duenas, R., Fernandez, P., Sanchez, J. M., Navarro, M. A. & San, L.** 2004. Insulin resistance and increased leptin concentrations in noncompliant schizophrenia patients but not in antipsychotic-naive first-episode schizophrenia patients. *The Journal of Clinical Psychiatry*, **65**, 1335–1342.
- Asakawa, A., Inui, A., Ueno, N., Makino, S., Fujino, M. A. & Kasuga, M.** 1999. Urocortin reduces food intake and gastric emptying in lean and ob/ob obese mice. *Gastroenterology*, **116**, 1287–1292.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., Makino, S., Fujimiya, M., Niiijima, A., Fujino, M. A. & Kasuga, M.** 2001. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*, **120**, 337–345.

- Atmaca, M., Kuloglu, M., Tezcan, E., Gecici, O. & Ustundag, B.** 2003a. Weight gain, serum leptin and triglyceride levels in patients with schizophrenia on antipsychotic treatment with quetiapine, olanzapine and haloperidol. *Schizophrenia Research*, **60**, 99–100.
- Atmaca, M., Kuloglu, M., Tezcan, E. & Ustundag, B.** 2003b. Serum leptin and cholesterol levels in schizophrenic patients with and without suicide attempts. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, **108**, 208–214.
- Badman, M. K. & Flier, J. S.** 2005. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science*, **307**, 1909–1914.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.-P., Bortoluzzi, M.-N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y. & Lewin, M. J. M.** 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature*, **394**, 790–793.
- Bagdy, G., Calogero, A. E., Aulakh, C. S., Szemeredi, K. & Murphy, D. L.** 1989. Long-term cortisol treatment impairs behavioral and neuroendocrine responses to 5-HT1 agonists in the rat. *Neuroendocrinology*, **50**, 241–247.
- Baguley, I. J., Heriseanu, R. E., Cameron, I. D., Nott, M. T. & Slewa-Younan, S.** 2008. A critical review of the pathophysiology of dysautonomia following traumatic brain injury. *Neurocritical care*, **8**, 293–300.
- Banks, W. A.** 2006. Blood-brain barrier and energy balance. *Obesity*, **14**, 234S–237S.
- Banks, W. A., Tschöp, M., Robinson, S. M. & Heiman, M. L.** 2002. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **302**, 822–827.
- Bansal, V., Costantini, T., Kroll, L., Peterson, C., Loomis, W., Eliceiri, B., Baird, A., Wolf, P. & Coimbra, R.** 2009. Traumatic brain injury and intestinal dysfunction: uncovering the neuro-enteric axis. *Journal of Neurotrauma*, **26**, 1353–1359.
- Bär, K. J., Letsch, A., Jochum, T., Wagner, G., Greiner, W. & Sauer, H.** 2005. Loss of efferent vagal activity in acute schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, **39**, 519–527.
- Bär, K.-J., Koschke, M., Boettger, M. K., Berger, S., Kabisch, A., Sauer, H., Voss, A. & Yeragani, V. K.** 2007. Acute psychosis leads to increased QT variability in patients suffering from schizophrenia. *Schizophrenia Research*, **95**, 115–123.
- Bär, K.-J., Boettger, M. K., Schulz, S., Harzendorf, C., Agelink, M. W., Yeragani, V. K., Chokka, P. & Voss, A.** 2008a. The interaction between pupil function and

- cardiovascular regulation in patients with acute schizophrenia. *Clinical Neurophysiology*, **119**, 2209–2213.
- Bär, K.-J., Wernich, K., Boettger, S., Cordes, J., Boettger, M. K., Löffler, S., Kornischka, J. & Agelink, M.-W.** 2008b. Relationship between cardiovagal modulation and psychotic state in patients with paranoid schizophrenia. *Psychiatry Research*, **157**, 255–257.
- Barbara, G., Wang, B., Stanghellini, V., de Giorgio, R., Cremon, C., Di Nardo, G., Trevisani, M., Campi, B., Geppetti, P., Tonini, M., Bunnett, N. W., Grundy, D. & Corinaldesi, R.** 2007. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, **132**, 26–37.
- Barbier, M., Cherbut, C., Aubé, A. C., Blottière, H. M. & Galmiche, J. P.** 1998. Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats. *Gut*, **43**, 783–790.
- Barbier, M., Attoub, S. & Galmiche, J. P.** 2000. La leptine : aspects physiologiques et implications en Hépatogastroentérologie. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **24**, 509–519.
- Barrachina, M. D., Martínez, V., Wang, L., Wei, J. Y. & Taché, Y.** 1997. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 10455–10460.
- Barrenetxe, J., Villaro, A. C., Guembe, L., Pascual, I., Muñoz-Navas, M., Barber, A. & Lostao, M. P.** 2002. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut*, **50**, 797–802.
- Baskin, D. G., Figlewicz Lattemann, D., Seeley, R. J., Woods, S. C., Porte, D., Jr & Schwartz, M. W.** 1999. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain research*, **848**, 114–123.
- Batterham, R. L., Cowley, M. A., Small, C. J., Herzog, H., Cohen, M. A., Dakin, C. L., Wren, A. M., Brynes, A. E., Low, M. J., Ghatei, M. A., Cone, R. D. & Bloom, S. R.** 2002. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, **418**, 650–654.
- Benarroch, E. E.** 2007. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology*, **69**, 1953–7.
- Beninger, R. J., Tuerke, K. J., Forsyth, J. K., Giles, A., Xue, L., Boegman, R. J. & Jhamandas, K.** 2009. Neonatal ventral hippocampal lesions in male and female rats:

- effects on water maze, locomotor activity, plus-maze and prefrontal cortical GABA and glutamate release in adulthood. *Behavioural Brain Research*, **202**, 198–209.
- Berthoud, H. R. & Patterson, L. M.** 1996. Anatomical relationship between vagal afferent fibers and CCK-immunoreactive entero-endocrine cells in the rat small intestinal mucosa. *Acta Anatomica*, **156**, 123–131.
- Berthoud, H. R., Jedrzejewska, A. & Powley, T. L.** 1990. Simultaneous labeling of vagal innervation of the gut and afferent projections from the visceral forebrain with dil injected into the dorsal vagal complex in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **301**, 65–79.
- Bian, X., Bornstein, J. C. & Bertrand, P. P.** 2003. Nicotinic transmission at functionally distinct synapses in descending reflex pathways of the rat colon. *Neurogastroenterology & Motility*, **15**, 161–171.
- Bischoff, S. C., Wedemeyer, J., Herrmann, A., Meier, P. N., Trautwein, C., Cetin, Y., Maschek, H., Stolte, M., Gebel, M. & Manns, M. P.** 1996. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology*, **28**, 1–13.
- Blat, S. & Malbert, C.-H.** 2005. Insulin modulates duodenal vagal afferents basal activity. *Autonomic Neuroscience*, **122**, 29–37.
- Blennerhassett, M. G., Vignjevic, P., Vermillion, D. L. & Collins, S. M.** 1992. Inflammation causes hyperplasia and hypertrophy in smooth muscle of rat small intestine. *The American journal of Physiology*, **262**, G1041–1046.
- Bonaz, B.** 2010. Brain-gut interactions. *La Revue de Médecine Interne*, **31**, 581–585.
- Bonaz, B. & Sabate, J.-M.** 2009. Brain-gut axis dysfunction. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **33**, S48–58.
- Bou Khalil, R.** 2011. Metabolic syndrome in patients with schizophrenia independently from atypical antipsychotics intake. *La Presse Médicale*, **41**, e238–e243.
- Brüning, J. C., Gautam, D., Burks, D. J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P. C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D. & Kahn, C. R.** 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, **289**, 2122–2125.
- Brzozowski, T., Konturek, P. C., Konturek, S. J., Kwiecień, S., Drozdowicz, D., Bielanski, W., Pajdo, R., Ptak, A., Nikiforuk, A., Pawlik, W. W. & Hahn, E. G.** 2004. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regulatory Peptides*, **120**, 39–51.

- Buchheit, M.** 2006. Utilisation de la variabilité de la fréquence cardiaque chez le sportif. *Cardio & Sport*, **7**, 29–37.
- Burdyga, G., Lal, S., Spiller, D., Jiang, W., Thompson, D., Attwood, S., Saeed, S., Grundy, D., Varro, A., Dimaline, R. & Dockray, G. J.** 2003. Localization of orexin-1 receptors to vagal afferent neurons in the rat and humans. *Gastroenterology*, **124**, 129–139.
- Buscaino, V. M.** 1953. Patologia extraneurale della schizofrenia: fegato, tubo digerente, sistema reticolo-endoteliale. *Acta Neurologica*, **8**, 1–60.
- Buyse, M., Sobhani, I. & Bado, A.** 2002. Leptin, obesity and gastrointestinal tract. *Hépatogastro*, **9**, 309–316.
- Buyse, M., Aparicio, T., Guilmeau, S., Goïot, H., Sobhani, I. & Bado, A.** 2004. Effets paracrines de la leptine produite par l'estomac. *Médecine Sciences*, **20**, 183–188.
- Cammisotto, P. G., Renaud, C., Gingras, D., Delvin, E., Levy, E. & Bendayan, M.** 2005. Endocrine and exocrine secretion of leptin by the gastric mucosa. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **53**, 851–860.
- Cannon, M. & Murray, R.** 1998. Neonatal origins of schizophrenia. *Archives of Disease in Childhood*, **78**, 1–3.
- Carlini, V. P., Varas, M. M., Cragolini, A. B., Schiöth, H. B., Scimonelli, T. N. & de Barioglio, S. R.** 2004. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **313**, 635–641.
- Castex, N., Fioramonti, J., Fargeas, M. J., More, J. & Bueno, L.** 1994. Role of 5-HT₃ receptors and afferent fibers in the effects of mast cell degranulation on colonic motility in rats. *Gastroenterology*, **107**, 976–984.
- Cenquizca, L. A. & Swanson, L. W.** 2006. Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **497**, 101–114.
- Chang, H. Y., Mashimo, H. & Goyal, R. K.** 2003. Current concepts of vagal efferent projections to the gut. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, **284**, G357–G366.
- Chaudhri, O., Small, C. & Bloom, S.** 2006. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **361**, 1187–1209.

- Chen, F.-L.** 2011. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **2**, 977–984.
- Cheng, T. M. K., Lu, Y.-E., Guest, P. C., Rahmoune, H., Harris, L. W., Wang, L., Ma, D., Stelzhammer, V., Umrانيا, Y., Wayland, M. T., Lió, P. & Bahn, S.** 2010. Identification of targeted analyte clusters for studies of schizophrenia. *Molecular & Cellular Proteomics*, **9**, 510–522.
- Cheung, P. & Wilder-Smith, E.** 1995. Anorexia nervosa and schizophrenia in a male Chinese. *International Journal of Eating Disorders*, **18**, 103–106.
- Chiba, T.** 2000. Collateral projection from the amygdalo-hippocampal transition area and CA1 to the hypothalamus and medial prefrontal cortex in the rat. *Neuroscience Research*, **38**, 373–383.
- Chrapusta, S. J., Egan, M. F., Wyatt, R. J., Weinberger, D. R. & Lipska, B. K.** 2003. Neonatal ventral hippocampal damage modifies serum corticosterone and dopamine release responses to acute footshock in adult Sprague-Dawley rats. *Synapse*, **47**, 270–277.
- Cinemre, B. & Kulaksizoğlu, B.** 2007. Case report: comorbid anorexia nervosa and schizophrenia in a male patient. *Turkish Journal of Psychiatry*, **18**, 87–91.
- Clark, N. G.** 2004. Consensus Development Conference on Antipsychotic Drugs and Obesity and Diabetes. *Diabetes Care*, **27**, 596–601.
- Clifton, P. G., Vickers, S. P. & Somerville, E. M.** 1998. Little and often: ingestive behavior patterns following hippocampal lesions in rats. *Behavioral Neuroscience*, **112**, 502–511.
- Cnattingius, S., Hultman, C. M., Dahl, M. & Sparén, P.** 1999. Very preterm birth, birth trauma, and the risk of anorexia nervosa among girls. *Archives of General Psychiatry*, **56**, 634–638.
- Cohen, D.** 2007. Effect of risperidone on ghrelin and glucose in schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, **61**, 576–576.
- Cohen, H., Benjamin, J., Geva, A. B., Matar, M. A., Kaplan, Z. & Kotler, M.** 2000. Autonomic dysregulation in panic disorder and in post-traumatic stress disorder: application of power spectrum analysis of heart rate variability at rest and in response to recollection of trauma or panic attacks. *Psychiatry Research*, **96**, 1–13.

- Cohn, T. A., Remington, G., Zipursky, R. B., Azad, A., Connolly, P. & Wolever, T. M. S.** 2006. Insulin resistance and adiponectin levels in drug-free patients with schizophrenia: a preliminary report. *Canadian Journal of Psychiatry*, **51**, 382–386.
- Coll, A. P., Farooqi, I. S. & O’Rahilly, S.** 2007. The Hormonal Control of Food Intake. *Cell*, **129**, 251–262.
- Cone, R. D., Cowley, M. A., Butler, A. A., Fan, W., Marks, D. L. & Low, M. J.** 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, **25**, S63–67.
- Connan, F., Murphy, F., Connor, S. E. J., Rich, P., Murphy, T., Bara-Carill, N., Landau, S., Krljes, S., Ng, V., Williams, S., Morris, R. G., Campbell, I. C. & Treasure, J.** 2006. Hippocampal volume and cognitive function in anorexia nervosa. *Psychiatry Research*, **146**, 117–125.
- Costa, M.** 2000. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, **47**, 15iv–19.
- Costa, M., Brookes, S. J. H., Steele, P. A., Gibbins, I., Burcher, E. & Kandiah, C. J.** 1996. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience*, **75**, 949–967.
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdan, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D. & Low, M. J.** 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, **411**, 480–484.
- Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M. L., Garcia-Segura, L. M., Nillni, E. A., Mendez, P., Low, M. J., Sotonyi, P., Friedman, J. M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W. F., Cone, R. D. & Horvath, T. L.** 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, **37**, 649–661.
- Crawley, J. N. & Beinfeld, M. C.** 1983. Rapid development of tolerance to the behavioural actions of cholecystinin. *Nature*, **302**, 703–706.
- Cummings, D. E. & Overduin, J.** 2007. Gastrointestinal regulation of food intake. *Journal of Clinical Investigation*, **117**, 13–23.
- Cummings, D. E., Weigle, D. S., Frayo, R. S., Breen, P. A., Ma, M. K., Dellinger, E. P. & Purnell, J. Q.** 2002. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *The New England Journal of Medicine*, **346**, 1623–1630.

- Czéh, B. & Lucassen, P.** 2007. What causes the hippocampal volume decrease in depression? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, **257**, 250–260.
- Dakin, C. L., Gunn, I., Small, C. J., Edwards, C. M., Hay, D. L., Smith, D. M., Ghatei, M. A. & Bloom, S. R.** 2001. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology*, **142**, 4244–4250.
- Dallman, M. F., Fleur, S. E. la, Pecoraro, N. C., Gomez, F., Houshyar, H. & Akana, S. F.** 2004. Minireview: glucocorticoids—food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology*, **145**, 2633–2638.
- Dasgupta, A., Singh, O. P., Rout, J. K., Saha, T. & Mandal, S.** 2010. Insulin resistance and metabolic profile in antipsychotic naïve schizophrenia patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **34**, 1202–1207.
- Dass, N. B., Munonyara, M., Bassil, A. K., Hervieu, G. J., Osbourne, S., Corcoran, S., Morgan, M. & Sanger, G. J.** 2003. Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience*, **120**, 443–453.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M. S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K. & Nakazato, M.** 2000. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, **141**, 4255–4261.
- Date, Y., Murakami, N., Toshinai, K., Matsukura, S., Niiijima, A., Matsuo, H., Kangawa, K. & Nakazato, M.** 2002. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, **123**, 1120–1128.
- Date, Y., Toshinai, K., Koda, S., Miyazato, M., Shimbara, T., Tsuruta, T., Niiijima, A., Kangawa, K. & Nakazato, M.** 2005. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology*, **146**, 3518–3525.
- Davidson, T. L., Kanoski, S. E., Walls, E. K. & Jarrard, L. E.** 2005. Memory inhibition and energy regulation. *Physiology & Behavior*, **86**, 731–746.
- Davidson, T. L., Chan, K., Jarrard, L. E., Kanoski, S. E., Clegg, D. J. & Benoit, S. C.** 2009. Contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to energy and body weight regulation. *Hippocampus*, **19**, 235–252.
- De Man, J. G., Seerden, T. C., De Winter, B. Y., Van Marck, E. A., Herman, A. G. & Pelckmans, P. A.** 2003. Alteration of the purinergic modulation of enteric

- neurotransmission in the mouse ileum during chronic intestinal inflammation. *British journal of pharmacology*, **139**, 172–184.
- De Schepper, H. U., De Man, J. G., Moreels, T. G., Pelckmans, P. A. & De Winter, B. Y.** 2008. Review article: gastrointestinal sensory and motor disturbances in inflammatory bowel disease - clinical relevance and pathophysiological mechanisms. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **27**, 621–637.
- De Winter, B. Y., van den Wijngaard, R. M. & de Jonge, W. J.** 2012. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1822**, 66–73.
- Di Marco, A., Demartis, A., Gloaguen, I., Lazzaro, D., Delmastro, P., Ciliberto, G. & Laufer, R.** 2000. Leptin receptor-mediated regulation of cholinergic neurotransmitter phenotype in cells of central nervous system origin. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 2939–2944.
- Dockray, G. J.** 2009a. The Brain–Gut Axis. In: *Textbook of Gastroenterology*, (Ed. by T. Yamada), pp. 86–102. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Dockray, G. J.** 2009b. Cholecystokinin and gut–brain signalling. *Regulatory Peptides*, **155**, 6–10.
- Dridi, S. & Taouis, M.** 2009. Adiponectin and energy homeostasis: consensus and controversy. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **20**, 831–839.
- Duncan, G., Lambie, D. G., Johnson, R. H. & Whiteside, E. A.** 1980. Evidence of vagal neuropathy in chronic alcoholics. *The Lancet*, **316**, 1053–1057.
- Eaton, W.** 2004. Coeliac disease and schizophrenia: population based case control study with linkage of Danish national registers. *BMJ*, **328**, 438–439.
- EbrahimiDaryani, N., TabaTabaVakili, S. & Abdollahzade, S.** 2011. An association between anorexia nervosa and schizophrenia: a case report. *Govaresh*, **16**, 139–143.
- Eckert, E. D., Pomeroy, C., Raymond, N., Kohler, P. F., Thuras, P. & Bowers, C. Y.** 1998. Leptin in Anorexia Nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **83**, 791–795.
- Edholm, T., Levin, F., Hellström, P. M. & Schmidt, P. T.** 2004. Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons. *Regulatory Peptides*, **121**, 25–30.
- Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P. & Vizi, E. S.** 2000. The sympathetic nerve-an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological Reviews*, **52**, 595–638.

- Enriori, P. J., Evans, A. E., Sinnayah, P. & Cowley, M. A.** 2006. Leptin resistance and obesity. *Obesity*, **14**, 254S–258S.
- Fernández-Galaz, M. C., Fernández-Agulló, T., Carrascosa, J. M., Ros, M. & Garcia-Segura, L. M.** 2010. Leptin accumulation in hypothalamic and dorsal raphe neurons is inversely correlated with brain serotonin content. *Brain Research*, **1329**, 194–202.
- Folwaczny, C., Chang, J. K. & Tschop, M.** 2001. Ghrelin and motilin: two sides of one coin? *European Journal of Endocrinology*, **144**, R1–R3.
- Forloni, G., Fisone, G., Guitani, A., Ladinsky, H. & Consolo, S.** 1986. Role of the hippocampus in the sex-dependent regulation of eating behavior: studies with kainic acid. *Physiology & Behavior*, **38**, 321–326.
- Franco, C. L. M., Sant’ana, D. M. G. & Araujo, E. J.** . 2010. Intestinal wall atrophy and increase of sulphomucin secretion in the jejunal epithelium of rats submitted to severe protein malnutrition. *International Journal of Morphology*, **28**, 497–502.
- Freedman, R.** 2003. Schizophrenia. *The New England Journal of Medicine*, **349**, 1738–1749.
- Friedman, J. M. & Halaas, J. L.** 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395**, 763–770.
- Furness, J. B.** 2006. *The Enteric Nervous System*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Furness, J. B.** 2007. Enteric nervous system. *Scholarpedia*, **2**, 4064.
- Furness, J. B. & Sanger, G. J.** 2002. Intrinsic nerve circuits of the gastrointestinal tract: identification of drug targets. *Current Opinion in Pharmacology*, **2**, 612–622.
- Furness, J. B., Jones, C., Nurgali, K. & Clerc, N.** 2004. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Progress in Neurobiology*, **72**, 143–164.
- Gaigé, S., Abysique, A. & Bouvier, M.** 2002. Effects of leptin on cat intestinal vagal mechanoreceptors. *The Journal of Physiology*, **543**, 679–689.
- Gaigé, S., Abysique, A. & Bouvier, M.** 2003. Effects of leptin on cat intestinal motility. *The Journal of Physiology*, **546**, 267–277.
- Gaman, A. & Kuo, B.** 2008. Neuromodulatory processes of the brain-gut axis. *Neuromodulation*, **11**, 249–259.
- Gemmill, M. E., Eskay, R. L., Hall, N. L., Douglass, L. W. & Castonguay, T. W.** 2003. Leptin suppresses food intake and body weight in corticosterone-replaced adrenalectomized rats. *The Journal of Nutrition*, **133**, 504–509.
- Gershon, M. D.** 2005. Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *Journal of Clinical Gastroenterology*, **39**, S184–193.

- Ghia, J. E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E. F. & Collins, S. M.** 2006. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology*, **131**, 1122–1130.
- Ghia, J.-E., Blennerhassett, P. & Collins, S. M.** 2008. Impaired parasympathetic function increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. *The Journal of Clinical Investigation*, **118**, 2209–2218.
- Ghia, J., Blennerhassett, P., Deng, Y., Verdu, E. F., Khan, W. I. & Collins, S. M.** 2009. Reactivation of inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. *Gastroenterology*, **136**, 2280–2288.e4.
- Ghishan, F. K., Merchant, J. L. & Said, H. M.** 2006. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 4th edn. Academic Press.
- Giaroni, C., De Ponti, F., Cosentino, M., Lecchini, S. & Frigo, G.** 1999. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology*, **117**, 1438–1458.
- Gibbs, J., Young, R. C. & Smith, G. P.** 1973. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **84**, 488–495.
- Giordano, G. D., Renzetti, P., Parodi, R. C., Foppiani, L., Zandrino, F., Giordano, G. & Sardanelli, F.** 2001. Volume measurement with magnetic resonance imaging of hippocampus-amygdala formation in patients with anorexia nervosa. *Journal of Endocrinological Investigation*, **24**, 510–514.
- Gomes, S. P., Nyengaard, J. R., Misawa, R., Girotti, P. A., Castelucci, P., Blazquez, F. H. J., de Melo, M. P. & Ribeiro, A. A. C.** 2009. Atrophy and neuron loss: effects of a protein-deficient diet on sympathetic neurons. *Journal of Neuroscience Research*, **87**, 3568–3575.
- Gourion, D., Gourevitch, R., Leprovost, J.-B., Olié H lôo, J.-P. & Krebs, M.-O.** 2004. Neurodevelopmental hypothesis in schizophrenia. *L'Encéphale*, **30**, 109–118.
- Goyal, R. K.** 2000. Targets of enteric motor neurones: smooth muscle cells. *Gut*, **47**, 38iv–39.
- Goyal, R. K. & Hirano, I.** 1996. The enteric nervous system. *The New England Journal of Medicine*, **334**, 1106–1115.
- Green, T. & Dockray, G. J.** 1988. Characterization of the peptidergic afferent innervation of the stomach in the rat, mouse and guinea-pig. *Neuroscience*, **25**, 181–193.
- Grider, J. R.** 1994. Role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility. *The Journal of Nutrition*, **124**, 1334S–1339S.

- Grisham, M. B., Gaginella, T. S., Ritter, C., Tamai, H., Be, R. M. & Granger, D. N.** 1990. Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolyte transport, and epithelial cell viability. *Inflammation*, **14**, 531–542.
- Grundy, D.** 2004. What activates visceral afferents? *Gut*, **53**, ii5–ii8.
- Guan, Y., Tang, M., Jiang, Z. & Peeters, T. L.** 2003. Excitatory effects of motilin in the hippocampus on gastric motility in rats. *Brain Research*, **984**, 33–41.
- Guest, P. C., Wang, L., Harris, L. W., Burling, K., Levin, Y., Ernst, A., Wayland, M. T., Umrانيا, Y., Herberth, M., Koethe, D., Beveren, J. M. van, Rothermundt, M., McAllister, G., Leweke, F. M., Steiner, J. & Bahn, S.** 2010. Increased levels of circulating insulin-related peptides in first-onset, antipsychotic naïve schizophrenia patients. *Molecular Psychiatry*, **15**, 118–119.
- Guest, P. C., Schwarz, E., Krishnamurthy, D., Harris, L. W., Leweke, F. M., Rothermundt, M., van Beveren, N. J. M., Spain, M., Barnes, A., Steiner, J., Rahmoune, H. & Bahn, S.** 2011. Altered levels of circulating insulin and other neuroendocrine hormones associated with the onset of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, **36**, 1092–1096.
- Gupta, S., Masand, P. S., Kaplan, D., Bhandary, A. & Hendricks, S.** 1997. The relationship between schizophrenia and irritable bowel syndrome (IBS). *Schizophrenia Research*, **23**, 265–268.
- Gwirtsman, H. E., Kaye, W. H., George, D. T., Jimerson, D. C., Ebert, M. H. & Gold, P. W.** 1989. Central and peripheral ACTH and cortisol levels in anorexia nervosa and bulimia. *Archives of General Psychiatry*, **46**, 61–69.
- Hanani, M., Nissan, A. & Freund, H. R.** 2007. Innervation of submucosal adipocytes in the human colon. *Neuroscience Letters*, **428**, 7–10.
- Hansen, G. H., Niels-Christiansen, L.-L. & Danielsen, E. M.** 2008. Leptin and the obesity receptor (OB-R) in the small intestine and colon: a colocalization study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **56**, 677–685.
- Hanssens, L., Scheen, A. J., Van Winkel, R., Van Eyck, D., Reginster, J. Y. & De Hert, M.** 2008. Brain in the core of metabolic regulations: disorders in schizophrenic patients treated with atypical antipsychotics. *Revue médicale de Liège*, **63**, 417–423.
- Harisinghani, M. G., Wittenberg, J., Lee, W., Chen, S., Gutierrez, A. L. & Mueller, P. R.** 2003. Bowel wall fat halo sign in patients without intestinal disease. *American Journal of Roentgenology*, **181**, 781–784.

- Harrington, A. M., Hutson, J. M. & Southwell, B. R.** 2010. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, **44**, 173–202.
- Harrison, P. J.** 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, **122**, 593–624.
- Harrison, P. J. & Weinberger, D. R.** 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Molecular Psychiatry*, **10**, 40–68.
- Haug, T. T., Mykletun, A. & Dahl, A. A.** 2002. Are anxiety and depression related to gastrointestinal symptoms in the general population? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **37**, 294–298.
- Heanue, T. A. & Pachnis, V.** 2007. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nature Reviews Neuroscience*, **8**, 466–479.
- Hebebrand, J., Muller, T. D., Holtkamp, K. & Herpertz-Dahlmann, B.** 2007. The role of leptin in anorexia nervosa: clinical implications. *Molecular Psychiatry*, **12**, 23–35.
- Hennekens, C. H., Hennekens, A. R., Hollar, D. & Casey, D. E.** 2005. Schizophrenia and increased risks of cardiovascular disease. *American Heart Journal*, **150**, 1115–1121.
- Henry, B. L., Minassian, A., Paulus, M. P., Geyer, M. A. & Perry, W.** 2010. Heart rate variability in bipolar mania and schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, **44**, 168–176.
- Holmes, M. C., French, K. L. & Seckl, J. R.** 1997. Dysregulation of diurnal rhythms of serotonin 5-HT_{2C} and corticosteroid receptor gene expression in the hippocampus with food restriction and glucocorticoids. *The Journal of Neuroscience*, **17**, 4056–4065.
- Howes, O. D., McDonald, C., Cannon, M., Arseneault, L., Boydell, J. & Murray, R. M.** 2004. Pathways to schizophrenia: the impact of environmental factors. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, **7**, S7–S13.
- Huda, M. S. B., Wilding, J. P. H. & Pinkney, J. H.** 2006. Gut peptides and the regulation of appetite. *Obesity reviews*, **7**, 163–182.
- Ibrahim, S. H., Voigt, R. G., Katusic, S. K., Weaver, A. L. & Barbaresi, W. J.** 2009. Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. *Pediatrics*, **124**, 680–686.
- Imeryüz, N., Yeğen, B. C., Bozkurt, A., Coşkun, T., Villanueva-Peñacarrillo, M. L. & Ulusoy, N. B.** 1997. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal

- afferent-mediated central mechanisms. *The American Journal of Physiology*, **273**, G920–927.
- Irwin, C., Falsetti, S. A., Lydiard, R. B., Ballenger, J. C., Brock, C. D. & Brener, W.** 1996. Comorbidity of posttraumatic stress disorder and irritable bowel syndrome. *The Journal of Clinical Psychiatry*, **57**, 576–578.
- Jain, S.** 2011. Multi-organ autonomic dysfunction in Parkinson disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, **17**, 77–83.
- Jeon, B. T., Shin, H. J., Kim, J. B., Kim, Y. K., Lee, D. H., Kim, K. H., Kim, H. J., Kang, S. S., Cho, G. J., Choi, W. S. & Roh, G. S.** 2009. Adiponectin protects hippocampal neurons against kainic acid-induced excitotoxicity. *Brain Research Reviews*, **61**, 81–88.
- Jones, E. & Watson, J. P.** 1997. Delusion, the overvalued idea and religious beliefs: a comparative analysis of their characteristics. *The British Journal of Psychiatry*, **170**, 381–386.
- Jost, W. H.** 2010. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson’s Disease. *Journal of the Neurological Sciences*, **289**, 69–73.
- Jow, G.-M., Yang, T.-T. & Chen, C.-L.** 2006. Leptin and cholesterol levels are low in major depressive disorder, but high in schizophrenia. *Journal of Affective Disorders*, **90**, 21–27.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K. & Tobe, K.** 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, **116**, 1784–1792.
- Kanoski, S. E., Hayes, M. R., Greenwald, H. S., Fortin, S. M., Gianessi, C. A., Gilbert, J. R. & Grill, H. J.** 2011. Hippocampal leptin signaling reduces food intake and modulates food-related memory processing. *Neuropsychopharmacology*, **36**, 1859–1870.
- Karmiris, K., Koutroubakis, I. E., Xidakis, C., Polychronaki, M., Voudouri, T. & Kouroumalis, E. A.** 2006. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, **12**, 100–105.
- Karmiris, K., Koutroubakis, I. E. & Kouroumalis, E. A.** 2008. Leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin – Implications for inflammatory bowel disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, **52**, 855–866.
- Kastin, A. J., Akerstrom, V. & Pan, W.** 2002. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *Journal of Molecular Neuroscience*, **18**, 7–14.

- Katzung, B., Masters, S. & Trevor, A.** 2009. *Basic and Clinical Pharmacology*. 11th edn. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Kenny, P. J.** 2011. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, **12**, 638–651.
- Khaing, Z. Z., Weickert, C. S., Weinberger, D. R. & Lipska, B. K.** 2000. Differential DNA damage in response to the neonatal and adult excitotoxic hippocampal lesion in rats. *European Journal of Neuroscience*, **12**, 4424–4433.
- Khandoker, A. H., Fujibayashi, M., Moritani, T. & Palaniswami, M.** 2010. Assessing sympatho-vagal balance in schizophrenia through Tone-Entropy analysis. *Computing in Cardiology*, **37**, 69–72.
- Kiely, J. M., Noh, J. H., Graewin, S. J., Pitt, H. A. & Swartz-Basile, D. A.** 2005. Altered intestinal motility in leptin-deficient obese mice. *Journal of Surgical Research*, **124**, 98–103.
- Kimura, K., Tsuda, K., Baba, A., Kawabe, T., Boh-oka, S., Ibata, M., Moriwaki, C., Hano, T. & Nishio, I.** 2000. Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **273**, 745–749.
- Kinzig, K. P., D'Alessio, D. A. & Seeley, R. J.** 2002. The diverse roles of specific GLP-1 receptors in the control of food intake and the response to visceral illness. *The Journal of Neuroscience*, **22**, 10470–10476.
- Kinzig, K. P., D'Alessio, D. A., Herman, J. P., Sakai, R. R., Vahl, T. P., Figueiredo, H. F., Murphy, E. K. & Seeley, R. J.** 2003. CNS Glucagon-Like Peptide-1 receptors mediate endocrine and anxiety responses to interoceptive and psychogenic stressors. *The Journal of Neuroscience*, **23**, 6163–6170.
- Kioussis, D. & Pachnis, V.** 2009. Immune and nervous systems: more than just a superficial similarity? *Immunity*, **31**, 705–710.
- Kirchgessner, A. L.** 2002. Orexins in the brain-gut axis. *Endocrine Reviews*, **23**, 1–15.
- Kissileff, H. R., Pi-Sunyer, F. X., Thornton, J. & Smith, G. P.** 1981. C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **34**, 154–160.
- Knudson, J. D., Dincer, Ü. D., Zhang, C., Swafford, A. N., Koshida, R., Picchi, A., Focardi, M., Dick, G. M. & Tune, J. D.** 2005. Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial

- dysfunction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, **289**, H48–H56.
- Koda, S., Date, Y., Murakami, N., Shimbara, T., Hanada, T., Toshinai, K., Nijima, A., Furuya, M., Inomata, N., Osuye, K. & Nakazato, M.** 2005. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology*, **146**, 2369–2375.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. & Kangawa, K.** 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 656–660.
- Kojima, S., Ueno, N., Asakawa, A., Sagiya, K., Naruo, T., Mizuno, S. & Inui, A.** 2007. A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation. *Peptides*, **28**, 459–463.
- Konturek, S. J., Konturek, J. W., Pawlik, T. & Brzozowski, T.** 2004. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **55**, 137–154.
- Korbonits, M., Goldstone, A. P., Gueorguiev, M. & Grossman, A. B.** 2004. Ghrelin--a hormone with multiple functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **25**, 27–68.
- Kraemer, S., Minarzyk, A., Forst, T., Kopf, D. & Hundemer, H.-P.** 2011. Prevalence of metabolic syndrome in patients with schizophrenia, and metabolic changes after 3 months of treatment with antipsychotics - results from a German observational study. *BMC Psychiatry*, **11**, 173.
- Krantis, A., Potvin, W. & Harding, R. K.** 1988. Peptide YY (PYY) stimulates intrinsic enteric motor neurones in the rat small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **338**, 287–292.
- Kraus, T., Haack, M., Schuld, A., Hinze-Selch, D. & Pollmächer, T.** 2001. Low leptin levels but normal body mass indices in patients with depression or schizophrenia. *Neuroendocrinology*, **73**, 243–247.
- Kringelbach, M. L.** 2007. Cortical systems involved in appetite and food consumption. In: *Appetite and body weight: integrative systems and the development of anti-obesity drugs*, 1st edn. (Ed. by T. C. Kirkham & S. J. Cooper), pp. 5–26. London: Elsevier.
- Kurosawa, M., Bucinskaite, V., Miyasaka, K., Funakoshi, A. & Lundeberg, T.** 2000. Effects of systemic injection of interleukin-1beta on gastric vagal afferent activity in rats lacking type A cholecystokinin receptors. *Neuroscience Letters*, **293**, 9–12.

- Lambert, T. J. R. & Chapman, L. H.** 2004. Diabetes, psychotic disorders and antipsychotic therapy: a consensus statement. *Medical Journal of Australia*, **181**,
- Lamberti, J., Olson, D., Crilly, J., Olivares, T., Williams, G., Tu, X., Tang, W., Wiener, K., Dvorin, S. & Dietz, M.** 2006. Prevalence of the metabolic syndrome among patients receiving clozapine. *American Journal of Psychiatry*, **163**, 1273–1276.
- Langley, J. N.** 1921. *The autonomic nervous system*. Cambridge: W. Heffer.
- Langley, K.** 1994. The neuroendocrine concept today. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **733**, 1–17.
- Larsen, P. J., Tang-Christensen, M. & Jessop, D. S.** 1997. Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*, **138**, 4445–4455.
- Laruelle, M., Kegeles, L. S. & Abi-Dargham, A.** 2003. Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1003**, 138–158.
- Lathe, R.** 2001. Hormones and the hippocampus. *Journal of Endocrinology*, **169**, 205–231.
- Le Douarin, N. M., Dupin, E. & Ziller, C.** 1994. Genetic and epigenetic control in neural crest development. *Current Opinion in Genetics & Development*, **4**, 685–695.
- Lecourtier, L., Antal, M.-C., Cosquer, B., Schumacher, A., Samama, B., Angst, M.-J., Ferrandon, A., Koning, E., Cassel, J.-C. & Nehlig, A.** 2012. Intact neurobehavioral development and dramatic impairments of procedural-like memory following neonatal ventral hippocampal lesion in rats. *Neuroscience*, **207**, 110–123.
- Lee, S. Y. & Soltesz, I.** 2011. Cholecystokinin: a multi-functional molecular switch of neuronal circuits. *Developmental Neurobiology*, **71**, 83–91.
- Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I. & Friedman, J. M.** 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, **379**, 632–635.
- Lee, S. Y., Chung, W. H., Lee, M. Y., Kim, S. C., Kim, H. W. & Myung, S. C.** 2011. Leptin enhances nitric oxide-dependent relaxation of the clitoral corpus cavernosum. *Korean Journal of Urology*, **52**, 136–141.
- Li, Z. S. & Furness, J. B.** 2000. Inputs from intrinsic primary afferent neurons to nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of guinea pig ileum. *Cell and Tissue Research*, **299**, 1–8.
- Li, Y. & Owyang, C.** 2003. Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? V. Remodeling of vagus and enteric neural circuitry after vagal

- injury. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, **285**, G461–G469.
- Li, Y., Wu, X. Y. & Owyang, C.** 2004. Serotonin and cholecystokinin synergistically stimulate rat vagal primary afferent neurones. *The Journal of Physiology*, **559**, 651–662.
- Liddle, R. A., Goldfine, I. D., Rosen, M. S., Taplitz, R. A. & Williams, J. A.** 1985. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *Journal of Clinical Investigation*, **75**, 1144–1152.
- Lin, H. C., Zhao, X. T., Wang, L. & Wong, H.** 1996. Fat-induced ileal brake in the dog depends on peptide YY. *Gastroenterology*, **110**, 1491–1495.
- Linkowski, P. & Jurysta, F.** 2001. La schizophrénie□: une maladie aux étiologies méconnues. *Revue Hospitals.Be*, **247**,
- Lipska, B. K.** 2004. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, **29**, 282–286.
- Lipska, B. K. & Weinberger, D. R.** 2000. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*, **23**, 223–239.
- Lipska, B. K., Aultman, J. M., Verma, A., Weinberger, D. R. & Moghaddam, B.** 2002. Neonatal damage of the ventral hippocampus impairs working memory in the rat. *Neuropsychopharmacology*, **27**, 47–54.
- Liu, M., Seino, S. & Kirchgessner, A. L.** 1999. Identification and characterization of glucoreponsive neurons in the enteric nervous system. *The Journal of Neuroscience*, **19**, 10305–10317.
- Lomax, A. E. & Furness, J. B.** 2000. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell and Tissue Research*, **302**, 59–72.
- Lundgren, O.** 2000. Sympathetic input into the enteric nervous system. *Gut*, **47**, iv33–35.
- Luquet, S. & Cruciani-Guglielmacci, C.** 2009. Central control of energy balance. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, **44**, 17–25.
- Lyketsos, G. C., Paterakis, P., Beis, A. & Lyketsos, C. G.** 1985. Eating disorders in schizophrenia. *The British Journal of Psychiatry*, **146**, 255–261.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R. & Ranganathan, S.** 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*, **1**, 1155–1161.

- Maggi, C. A.** 1991. The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. *Journal of Autonomic Pharmacology*, **11**, 173–208.
- Makino, S., Kaneda, T., Nishiyama, M., Asaba, K. & Hashimoto, K.** 2001. Lack of decrease in hypothalamic and hippocampal glucocorticoid receptor mRNA during starvation. *Neuroendocrinology*, **74**, 120–128.
- Masaki, T., Anan, F., Shimomura, T., Fujiki, M., Saikawa, T. & Yoshimatsu, H.** in press. Association between hippocampal volume and serum adiponectin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*,
- Masuda, Y., Tanaka, T., Inomata, N., Ohnuma, N., Tanaka, S., Itoh, Z., Hosoda, H., Kojima, M. & Kangawa, K.** 2000. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochemical and biophysical research communications*, **276**, 905–908.
- Mayer, E. A.** 2011. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nature Reviews Neuroscience*, **12**, 453–466.
- Mayer, C. M. & Belsham, D. D.** 2009. Insulin directly regulates NPY and AgRP gene expression via the MAPK MEK/ERK signal transduction pathway in mHypoE-46 hypothalamic neurons. *Molecular and cellular endocrinology*, **307**, 99–108.
- Mayer, E. A., Craske, M. & Naliboff, B. D.** 2001. Depression, anxiety, and the gastrointestinal system. *The Journal of Clinical Psychiatry*, **62 S 8**, 28–36.
- Mayer, E. A., Tillisch, K. & Bradesi, S.** 2006. Review article: modulation of the brain–gut axis as a therapeutic approach in gastrointestinal disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **24**, 919–933.
- McDonald, C. & Murray, R. M.** 2000. Early and late environmental risk factors for schizophrenia. *Brain Research Reviews*, **31**, 130–137.
- McGlashan, T. H. & Hoffman, R. E.** 2000. Schizophrenia as a disorder of developmentally reduced synaptic connectivity. *Archives of General Psychiatry*, **57**, 637–648.
- Meeran, K., O’Shea, D., Edwards, C. M., Turton, M. D., Heath, M. M., Gunn, I., Abusnana, S., Rossi, M., Small, C. J., Goldstone, A. P., Taylor, G. M., Sunter, D., Steere, J., Choi, S. J., Ghatei, M. A. & Bloom, S. R.** 1999. Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*, **140**, 244–250.
- Mei, N.** 1985. Intestinal chemosensitivity. *Physiological Reviews*, **65**, 211–237.
- Meltzer, H. Y.** 1998. Suicide in schizophrenia: risk factors and clozapine treatment. *The Journal of Clinical Psychiatry*, **59**, 15–20.

- Meregnani, J., Clarençon, D., Vivier, M., Peinnequin, A., Mouret, C., Sinniger, V., Picq, C., Job, A., Canini, F., Jacquier-Sarlin, M. & Bonaz, B.** 2011. Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Autonomic Neuroscience*, **160**, 82–89.
- Meyer, U. & Feldon, J.** 2010. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, **90**, 285–326.
- Meyer, F. & Louilot, A.** 2012. Early prefrontal functional blockade in rats results in schizophrenia-Related anomalies in behavior and dopamine. *Neuropsychopharmacology*, **37**, 2233–43.
- Misra, M., Miller, K. K., Cord, J., Prabhakaran, R., Herzog, D. B., Goldstein, M., Katzman, D. K. & Klibanski, A.** 2007. Relationships between serum adipokines, insulin levels, and bone density in girls with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **92**, 2046–2052.
- Mittal, V. A., Ellman, L. M. & Cannon, T. D.** 2008. Gene-environment interaction and covariation in schizophrenia: the role of obstetric complications. *Schizophrenia Bulletin*, **34**, 1083–1094.
- Moran, T. H. & Kinzig, K. P.** 2004. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, **286**, G183–188.
- Mordes, J. P., Lozy, M., Herrera, M. G. & Silen, W.** 1979. Effects of vagotomy with and without pyloroplasty on weight and food intake in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **236**, R61–R66.
- Moreira, N. M., Hermes, C., Almeida, C. S. L. de, Santana, E. C., Sant’ana, D. de M. G. & Araújo, E. J. de A.** 2008. Quantitative analysis of the neurons from the myenteric plexus in the ileum of rats submitted to severe protein deficiency. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, **66**, 242–245.
- Moriarty, P., Dimaline, R., Thompson, D. G. & Dockray, G. J.** 1997. Characterization of cholecystokininA and cholecystokininB receptors expressed by vagal afferent neurons. *Neuroscience*, **79**, 905–913.
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S. & Schwartz, M. W.** 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, **443**, 289–295.
- Muurahainen, N., Kissileff, H. R., Derogatis, A. J. & Xavier Pi-Sunyer, F.** 1988. Effects of cholecystokinin-octapeptide (CCK-8) on food intake and gastric emptying in man. *Physiology & Behavior*, **44**, 645–649.

- Narita, K., Kosaka, H., Okazawa, H., Murata, T. & Wada, Y.** 2009. Relationship between plasma leptin level and brain structure in elderly: a voxel-based morphometric study. *Biological Psychiatry*, **65**, 992–994.
- Näslund, E. & Hellström, P. M.** 2007. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiology & Behavior*, **92**, 256–262.
- Näslund, E., Bogefors, J., Skogar, S., Grybäck, P., Jacobsson, H., Holst, J. J. & Hellström, P. M.** 1999. GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon, and PYY release in humans. *The American Journal of Physiology*, **277**, R910–916.
- Nilsson, B. M., Forslund, A. H., Olsson, R. M., Hambræus, L. & Wiesel, F.-A.** 2006. Differences in resting energy expenditure and body composition between patients with schizophrenia and healthy controls. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, **114**, 27–35.
- North, C. S., Hong, B. A. & Alpers, D. H.** 2007. Relationship of functional gastrointestinal disorders and psychiatric disorders: implications for treatment. *World journal of Gastroenterology*, **13**, 2020–2027.
- Ohama, T., Hori, M. & Ozaki, H.** 2007. Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced? *Journal of Smooth Muscle Research*, **43**, 43–54.
- Ollat, H.** 2002. Troubles neurodéveloppementaux et schizophrénie. Un modèle? *Neuropsychiatrie*: *Tendances et Débats*, **16**, 21–23.
- Olsson, C. & Holmgren, S.** 2010. Autonomic control of gut motility: a comparative view. *Autonomic Neuroscience*, **165**, 80–101.
- Osby, U., Correia, N., Brandt, L., Ekblom, A. & Sparén, P.** 2000. Mortality and causes of death in schizophrenia in Stockholm country, Sweden. *Schizophrenia Research*, **45**, 21–28.
- Owyang, C. & Heldsinger, A.** 2011. Vagal control of satiety and hormonal regulation of appetite. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, **17**, 338.
- Owyang, C. & Logsdon, C. D.** 2004. New insights into neurohormonal regulation of pancreatic secretion. *Gastroenterology*, **127**, 957–969.
- Ozaki, H., Hori, M., Kinoshita, K. & Ohama, T.** 2005. Intestinal dysmotility in inflammatory bowel disease: mechanisms of the reduced activity of smooth muscle contraction. *Inflammopharmacology*, **13**, 103–111.
- Ozdemir, V., Jamal, M., Osapay, K., Jadus, M., Sandor, Z., Hashemzadeh, M. & Szabo, S.** 2007. Cosegregation of gastrointestinal ulcers and schizophrenia in a large national

- inpatient discharge database: revisiting the “brain-gut axis” hypothesis in ulcer pathogenesis. *Journal of Investigative Medicine*, **55**, 315–320.
- Padmavati, R., McCreddie, R. G. & Tirupati, S.** 2010. Low prevalence of obesity and metabolic syndrome in never-treated chronic schizophrenia. *Schizophrenia Research*, **121**, 199–202.
- Panariello, F., De Luca, V. & de Bartolomeis, A.** 2011. Weight gain, schizophrenia and antipsychotics: new findings from animal model and pharmacogenomic studies. *Schizophrenia Research and Treatment*, **2011**, 1–16.
- Parrott, B. F. & Baldwin, B. A.** 1981. Operant feeding and drinking in pigs following intracerebroventricular injection of synthetic cholecystokinin octapeptide. *Physiology & Behavior*, **26**, 419–422.
- Peet, M.** 2004. Diet, diabetes and schizophrenia: review and hypothesis. *The British Journal of Psychiatry*, **184**, s102–s105.
- Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. & Collins, F.** 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, **269**, 540–543.
- Peruzzo, B., Pastor, F. E., Blázquez, J. L., Schöbitz, K., Peláez, B., Amat, P. & Rodríguez, E. M.** 2000. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Experimental Brain Research*, **132**, 10–26.
- Peters, J. H., Ritter, R. C. & Simasko, S. M.** 2006. Leptin and CCK selectively activate vagal afferent neurons innervating the stomach and duodenum. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **290**, R1544 – R1549.
- Peupelmann, J., Quick, C., Berger, S., Hocke, M., Tancer, M. E., Yeragani, V. K. & Bär, K.-J.** 2009a. Linear and non-linear measures indicate gastric dysmotility in patients suffering from acute schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **33**, 1236–1240.
- Peupelmann, J., Boettger, M. K., Ruhland, C., Berger, S., Ramachandraiah, C. T., Yeragani, V. K. & Bär, K.-J.** 2009b. Cardio-respiratory coupling indicates suppression of vagal activity in acute schizophrenia. *Schizophrenia Research*, **112**, 153–157.
- Pfluger, P. T., Kampe, J., Castaneda, T. R., Vahl, T., D’Alessio, D. A., Kruthaupt, T., Benoit, S. C., Cuntz, U., Rochlitz, H. J., Moehlig, M., Pfeiffer, A. F. H., Koebnick, C., Weickert, M. O., Otto, B., Spranger, J. & Tschöp, M. H.** 2007. Effect of human

- body weight changes on circulating levels of peptide YY and peptide YY3-36. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **92**, 583–588.
- Phillips, S. A., Ciaraldi, T. P., Kong, A. P. S., Bandukwala, R., Aroda, V., Carter, L., Baxi, S., Mudaliar, S. R. & Henry, R. R.** 2003. Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes*, **52**, 667–674.
- Porte, D. & Woods, S.** 1981. Regulation of food intake and body weight by insulin. *Diabetologia*, **20**, 274–280.
- Portincasa, P., Moschetta, A., Radicione, T., Pugliese, S., Castore, A., Salerno, M. T. & Palasciano, G.** 2001. Coexistence of diffuse gastrointestinal dysmotility, dyspepsia and autonomic dysfunction in chronic alcoholism. *Gastroenterology*, **120**, A289–A289.
- Powers, P. S., Santana, C. A. & Bannon, Y. S.** 2002. Olanzapine in the treatment of anorexia nervosa: an open label trial. *International Journal of Eating Disorders*, **32**, 146–154.
- Powers, P. S., Bannon, Y., Eubanks, R. & McCormick, T.** 2007. Quetiapine in anorexia nervosa patients: an open label outpatient pilot study. *International Journal of Eating Disorders*, **40**, 21–26.
- Purves, D., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., Lamantia, A.-S., McNamara, J. O., Williams, S. M. & Augustine, G. J.** 2001. *Neuroscience*. 2nd edn. Sunderland: Sinauer Associates.
- Qiu, G., Wan, R., Hu, J., Mattson, M., Spangler, E., Liu, S., Yau, S.-Y., Lee, T., Gleichmann, M., Ingram, D., So, K.-F. & Zou, S.** 2011. Adiponectin protects rat hippocampal neurons against excitotoxicity. *AGE*, **33**, 155–165.
- Rabin, B. S., Cohen, S., Ganguli, R., Lysle, D. T. & Cunnick, J. E.** 1989. Bidirectional interaction between the central nervous system and the immune system. *Critical Reviews in Immunology*, **9**, 279–312.
- Rachow, T., Berger, S., Boettger, M. K., Schulz, S., Guinjoan, S., Yeragani, V. K., Voss, A. & Bär, K.-J.** 2011. Nonlinear relationship between electrodermal activity and heart rate variability in patients with acute schizophrenia. *Psychophysiology*, **48**, 1323–1332.
- Rajarethinam, R., Prasad, K. & Keshavan, M.** 2005. The nature of brain abnormalities in schizophrenia: what do we really know? *Current Psychosis and Therapeutics Reports*, **3**, 48–52.

- Rapoport, J. L., Addington, A. M., Frangou, S. & Psych, M. R. C.** 2005. The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Molecular Psychiatry*, **10**, 434–449.
- Reichardt, F., Krueger, D. & Schemann, M.** 2011. Leptin excites enteric neurons of guinea-pig submucous and myenteric plexus. *Neurogastroenterology & Motility*, **23**, e165–e170.
- Remington, G.** 2006. Schizophrenia, antipsychotics, and the metabolic syndrome: is there a silver lining? *American Journal of Psychiatry*, **163**, 1132–1134.
- Rogers, R. C. & Hermann, G. E.** 2008. Mechanisms of action of CCK to activate central vagal afferent terminals. *Peptides*, **29**, 1716–1725.
- Roman, S. & Mion, F.** 2009. Données fondamentales sur la physiologie de la motricité digestive. *Gastro-entérologie*, doi: [10.1016/S1155-1968\(09\)49512-9](https://doi.org/10.1016/S1155-1968(09)49512-9),
- Rosas-Ballina, M. & Tracey, K. J.** 2009. The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity. *Neuron*, **64**, 28–32.
- Ross, C. A., Margolis, R. L., Reading, S. A. J., Pletnikov, M. & Coyle, J. T.** 2006. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron*, **52**, 139–153.
- Ryan, M. C. M.** 2003. Impaired fasting glucose tolerance in first-episode, drug-naïve patients with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, **160**, 284–289.
- Ryan, M. C. M., Sharifi, N., Condren, R. & Thakore, J. H.** 2004. Evidence of basal pituitary-adrenal overactivity in first episode, drug naïve patients with schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, **29**, 1065–1070.
- Şahin, A. S. & Bariskaner, H.** 2007. The mechanisms of vasorelaxant effect of leptin on isolated rabbit aorta. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **21**, 595–600.
- Saiki, T.** 1998. Myeloperoxidase concentrations in the stool as a new parameter of inflammatory bowel disease. *The Kurume Medical Journal*, **45**, 69–73.
- Salem, V. & Bloom, S. R.** 2010. Approaches to the pharmacological treatment of obesity. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, **3**, 73–88.
- Saltiel, A. R. & Kahn, C. R.** 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**, 799–806.
- Sánchez, J., Oliver, P., Palou, A. & Picó, C.** 2004. The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology*, **145**, 5049–5055.
- Sanders, K. M. & Ward, S. M.** 2006. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *The Journal of Physiology*, **576**, 721–726.

- Sandner, G., Host, L., Angst, M.-J., Guiberteau, T., Guignard, B. & Zwiller, J.** 2010. The HDAC inhibitor phenylbutyrate reverses effects of neonatal ventral hippocampal lesion in rats. *Frontiers in Psychiatry*, **153**, doi: 10.3389/fpsy.2010.00153.
- Scalfi, L., Marra, M., Caldara, A., Silvestri, E. & Contaldo, F.** 1999. Changes in bioimpedance analysis after stable refeeding of undernourished anorexic patients. *International Journal of Obesity*, **23**, 133–137.
- Schemann, M., Hafsi, N., Michel, K., Kober, O. I., Wollmann, J., Li, Q., Zeller, F., Langer, R., Lee, K. & Cellek, S.** 2010. The β 3-adrenoceptor agonist GW427353 (Solabegron) decreases excitability of human enteric neurons via release of somatostatin. *Gastroenterology*, **138**, 266–274.
- Schjoldager, B., Mortensen, P. E., Myhre, J., Christiansen, J. & Holst, J. J.** 1989. Oxyntomodulin from distal gut. Role in regulation of gastric and pancreatic functions. *Digestive Diseases and Sciences*, **34**, 1411–1419.
- Schutte, I. W. ., B.C.W. Hollestein, K., Akkermans, L. M. . & Kroese, A. B. .** 1997. Evidence for a role of cholecystokinin as neurotransmitter in the guinea-pig enteric nervous system. *Neuroscience Letters*, **236**, 155–158.
- Schwartz, M. W., Sipols, A. J., Marks, J. L., Sanacora, G., White, J. D., Scheurink, A., Kahn, S. E., Baskin, D. G., Woods, S. C. & Figlewicz, D. P.** 1992. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*, **130**, 3608–3616.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr, Seeley, R. J. & Baskin, D. G.** 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*, **404**, 661–671.
- Sengupta, S., Parrilla-Escobar, M. A., Klink, R., Fathalli, F., Ying Kin Ng, Stip, E., Baptista, T., Malla, A. & Joobar, R.** 2008. Are metabolic indices different between drug-naïve first-episode psychosis patients and healthy controls? *Schizophrenia Research*, **102**, 329–336.
- Serio, R., Grazia Zizzo, M. & Mule, F.** 2003. Nitric oxide induces muscular relaxation via cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms in the longitudinal muscle of the mouse duodenum. *Nitric Oxide*, **8**, 48–52.
- Serio, R., Zizzo, M. G. & Mastropaolo, M.** 2011. The enteric nervous system: new developments and emerging concepts. *Malta Medical Journal*, **23**, 23–26.
- Sevcencu, C. & Struijk, J. J.** 2010. Autonomic alterations and cardiac changes in epilepsy. *Epilepsia*, **51**, 725–737.

- Severance, E. G., Alaedini, A., Yang, S., Halling, M., Gressitt, K. L., Stallings, C. R., Origoni, A. E., Vaughan, C., Khushalani, S., Leweke, F. M., Dickerson, F. B. & Yolken, R. H.** 2012. Gastrointestinal inflammation and associated immune activation in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, **138**, 48–53.
- Sha, L. & Szurszewski, J. H.** 1999. Leptin modulates fast synaptic transmission in dog pancreatic ganglia. *Neuroscience Letters*, **263**, 93–96.
- Sherwood, L.** 2006. *Physiologie humaine*. 2nd edn. Bruxelles: De Boeck.
- Sibilia, V., Rindi, G., Pagani, F., Rapetti, D., Locatelli, V., Torsello, A., Campanini, N., Deghenghi, R. & Netti, C.** 2003. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology*, **144**, 353–359.
- Sitaraman, S., Liu, X., Charrier, L., Gu, L. H., Ziegler, T. R., Gewirtz, A. & Merlin, D.** 2004. Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in inflammatory bowel disease. *The FASEB Journal*, **18**, 696–698.
- Smith, G. P., Jerome, C., Cushin, B. J., Eterno, R. & Simansky, K. J.** 1981. Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science*, **213**, 1036–1037.
- Spelman, L. M., Walsh, P. I., Sharifi, N., Collins, P. & Thakore, J. H.** 2007. Impaired glucose tolerance in first-episode drug-naïve patients with schizophrenia. *Diabetic medicine*, **24**, 481–485.
- Starkman, M. N., Gebarski, S. S., Berent, S. & Schteingart, D. E.** 1992. Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biological Psychiatry*, **32**, 756–765.
- Stevens, A. & Lowe, J.** 1997. *Histologie Humaine*. Bruxelles: De Boeck.
- Tamai, H., Takemura, J., Kobayashi, N., Matsubayashi, S., Matsukura, S. & Nakagawa, T.** 1993. Changes in plasma cholecystokinin concentrations after oral glucose tolerance test in anorexia nervosa before and after therapy. *Metabolism*, **42**, 581–584.
- Tamminga, C. A. & Holcomb, H. H.** 2005. Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Molecular Psychiatry*, **10**, 27–39.
- Tartaglia, L. A.** 1997. The leptin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 6093 – 6096.
- Tataranni, P. A., Larson, D. E., Snitker, S., Young, J. B., Flatt, J. P. & Ravussin, E.** 1996. Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, **271**, E317–E325.

- Taylor, I. L.** 1993. Role of Peptide YY in the endocrine control of digestion. *Journal of Dairy Science*, **76**, 2094–2101.
- Taylor, V. H. & MacQueen, G. M.** 2010. The role of adipokines in understanding the associations between obesity and depression. *Journal of Obesity*, **2010**, 1–6.
- Terenius, L.** 2000. Schizophrenia: pathophysiological mechanisms--a synthesis. *Brain Research Reviews*, **31**, 401–404.
- Terry, R. B., Wood, P. D., Haskell, W. L., Stefanick, M. L. & Krauss, R. M.** 1989. Regional adiposity patterns in relation to lipids, lipoprotein cholesterol, and lipoprotein subfraction mass in men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **68**, 191–199.
- Thakore, J. H.** 2004. Metabolic disturbance in first-episode schizophrenia. *The British Journal of Psychiatry*, **184**, s76–s79.
- Thakore, J. H., Mann, J. N., Vlahos, I., Martin, A. & Reznick, R.** 2002. Increased visceral fat distribution in drug-naïve and drug-free patients with schizophrenia. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, **26**, 137–141.
- Tolle, V., Kadem, M., Bluet-Pajot, M.-T., Frere, D., Foulon, C., Bossu, C., Dardennes, R., Mounier, C., Zizzari, P., Lang, F., Epelbaum, J. & Estour, B.** 2003. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **88**, 109–116.
- Törnblom, H., Lindberg, G., Nyberg, B. & Veress, B.** 2002. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, **123**, 1972–1979.
- Tsai, M.-C., Chang, C.-M., Liu, C.-Y., Chang, P.-Y. & Huang, T.-L.** 2011. Association of serum levels of leptin, ghrelin, and adiponectin in schizophrenic patients and healthy controls. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*, **15**, 106–111.
- Tschöp, M., Smiley, D. L. & Heiman, M. L.** 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, **407**, 908–913.
- Tschöp, M., Wawarta, R., Riepl, R. L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R. & Folwaczny, C.** 2001. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigation*, **24**, RC19–21.
- Tseng, K. Y., Chambers, R. A. & Lipska, B. K.** 2009. The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, **204**, 295–305.

- Tsuang, M. T., Stone, W. S. & Faraone, S. V.** 2001. Genes, environment and schizophrenia. *The British Journal of Psychiatry*, **178**, s18–s24.
- Uneyama, H., Niijima, A., Tanaka, T. & Torii, K.** 2002. Receptor subtype specific activation of the rat gastric vagal afferent fibers to serotonin. *Life Sciences*, **72**, 415–423.
- Valentini, L., Wirth, E. K., Schweizer, U., Hengstermann, S., Schaper, L., Koernicke, T., Dietz, E., Norman, K., Buning, C., Winklhofer-Roob, B. M., Lochs, H. & Ockenga, J.** 2009. Circulating adipokines and the protective effects of hyperinsulinemia in inflammatory bowel disease. *Nutrition*, **25**, 172–181.
- Van Der Zanden, E. P., Boeckxstaens, G. E. & De Jonge, W. J.** 2009. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterology & Motility*, **21**, 6–17.
- Van Gaal, L. F.** 2006. Long-term health considerations in schizophrenia: metabolic effects and the role of abdominal adiposity. *European Neuropsychopharmacology*, **16**, S142–148.
- Van Groen, T. & Wyss, J. M.** 1990. Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *The Journal of Comparative Neurology*, **302**, 515–528.
- Venkatasubramanian, G., Chittiprol, S., Neelakantachar, N., Naveen, M. N., Thirthall, J., Gangadhar, B. N. & Shetty, K. T.** 2007. Insulin and insulin-like growth factor-1 abnormalities in antipsychotic-naïve schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, **164**, 1557–1560.
- Verma, S. K., Subramaniam, M., Liew, A. & Poon, L. Y.** 2009. Metabolic risk factors in drug-naïve patients with first-episode psychosis. *The Journal of Clinical Psychiatry*, **70**, 997–1000.
- Wallner-Liebmann, S., Koschutnig, K., Reishofer, G., Sorantin, E., Blaschitz, B., Kruschitz, R., Unterrainer, H. F., Gasser, R., Freytag, F., Bauer-Denk, C. & Mangge, H.** 2010. Insulin and hippocampus activation in response to images of high-calorie food in normal weight and obese adolescents. *Obesity*, **18**, 1552–1557.
- Wang, Y. H., Tache, Y., Sheibel, A. B., Go, V. L. & Wei, J. Y.** 1997. Two types of leptin-responsive gastric vagal afferent terminals: an in vitro single-unit study in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **273**, R833 –R837.
- Wang, G.-J., Yang, J., Volkow, N. D., Telang, F., Ma, Y., Zhu, W., Wong, C. T., Tomasi, D., Thanos, P. K. & Fowler, J. S.** 2006. Gastric stimulation in obese subjects

- activates the hippocampus and other regions involved in brain reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 15641–15645.
- Wang, H. C., Yang, Y. K., Chen, P. S., Lee, I. H., Yeh, T. L. & Lu, R. B.** 2007. Increased plasma leptin in antipsychotic-naïve females with schizophrenia, but not in males. *Neuropsychobiology*, **56**, 213–215.
- Ward, S. M.** 2000. Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission. *Gut*, **47**, 40iv–43.
- Wassef, A., Baker, J. & Kochan, L.** 2003. GABA and schizophrenia: A review of basic science and clinical studies. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **23**, 601–640.
- Weigert, J., Obermeier, F., Neumeier, M., Wanninger, J., Filarsky, M., Bauer, S., Aslanidis, C., Rogler, G., Ott, C., Schäffler, A., Schölmerich, J. & Buechler, C.** 2010. Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, **16**, 630–637.
- West, D. B., Fey, D. & Woods, S. C.** 1984. Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **246**, R776–R787.
- Wettergren, A., Schjoldager, B., Mortensen, P. E., Myhre, J., Christiansen, J. & Holst, J. J.** 1993. Truncated GLP-1 (proglucagon 78–107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Digestive Diseases and Sciences*, **38**, 665–673.
- Wiedenmayer, C. P., Bansal, R., Anderson, G. M., Zhu, H., Amat, J., Whiteman, R. & Peterson, B. S.** 2006. Cortisol levels and hippocampus volumes in healthy preadolescent children. *Biological Psychiatry*, **60**, 856–861.
- Witter, M. P., Ostendorf, R. H. & Groenewegen, H. J.** 1990. Heterogeneity in the dorsal subiculum of the rat. Distinct neuronal zones project to different cortical and subcortical targets. *The European Journal of Neuroscience*, **2**, 718–725.
- Woods, S. C. & D'Alessio, D. A.** 2008. Central control of body weight and appetite. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **93**, s37–s50.
- Woods, S. C., Lotter, E. C., McKay, L. D. & Porte, D.** 1979. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*, **282**, 503–505.
- Woods, S. C., Benoit, S. C. & Clegg, D. J.** 2006. The brain-gut-islet connection. *Diabetes*, **55**, S114–S121.
- Wozniak, S., Gee, L., Wachtel, M. & Frezza, E.** 2009. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Digestive Diseases and Sciences*, **54**, 1847–1856.

- Wren, A. M., Small, C. J., Ward, H. L., Murphy, K. G., Dakin, C. L., Taheri, S., Kennedy, A. R., Roberts, G. H., Morgan, D. G., Ghatei, M. A. & Bloom, S. R.** 2000. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, **141**, 4325–4328.
- Wren, A. M., Small, C. J., Abbott, C. R., Dhillon, W. S., Seal, L. J., Cohen, M. A., Batterham, R. L., Taheri, S., Stanley, S. A., Ghatei, M. A. & Bloom, S. R.** 2001a. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*, **50**, 2540–2547.
- Wren, A. M., Seal, L. J., Cohen, M. A., Brynes, A. E., Frost, G. S., Murphy, K. G., Dhillon, W. S., Ghatei, M. A. & Bloom, S. R.** 2001b. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 5992.
- Wu, J. C.** 2012. Psychological co-morbidity in functional gastrointestinal disorders: epidemiology, mechanisms and management. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, **18**, 13–18.
- Xu, L., Sun, X., Lu, J., Tang, M. & Chen, J. D. Z.** 2008. Effects of gastric electric stimulation on gastric distention responsive neurons and expressions of CCK in rodent hippocampus. *Obesity*, **16**, 951–957.
- Xuan, J., Pan, G., Qiu, Y., Yang, L., Su, M., Liu, Y., Chen, J., Feng, G., Fang, Y., Jia, W., Xing, Q. & He, L.** 2011. Metabolomic profiling to identify potential serum biomarkers for schizophrenia and risperidone action. *Journal of Proteome Research*, **10**, 5433–5443.
- Yarandi, S. S., Hebbard, G., Sauer, C. G., Cole, C. R. & Ziegler, T. R.** 2011. Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition*, **27**, 269–275.
- Yuan, C. S., Attele, A. S., Dey, L. & Xie, J. T.** 2000. Gastric effects of cholecystokinin and its interaction with leptin on brainstem neuronal activity in neonatal rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **295**, 177–182.
- Zahn, T. P. & Pickar, D.** 2005. Autonomic activity in relation to symptom ratings and reaction time in unmedicated patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, **79**, 257–270.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J. M.** 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425–432.

- Zhang, D., Guo, M., Zhang, W. & Lu, X.-Y.** 2011. Adiponectin stimulates proliferation of adult hippocampal neural stem/progenitor cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)/glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β)/ β -catenin signaling cascade. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 44913–44920.
- Zhe, D., Fang, H. & Yuxiu, S.** 2008. Expressions of hippocampal mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) in the single-prolonged stress-rats. *Acta Histochemica et Cytochemica*, **41**, 89.
- Zhu, J. X., Wu, X. Y., Owyang, C. & Li, Y.** 2001. Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat. *The Journal of Physiology*, **530**, 431–442.
- Zigman, J. M., Jones, J. E., Lee, C. E., Saper, C. B. & Elmquist, J. K.** 2006. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, **494**, 528–548.

ANNEXES

Article de recherche D

EFFECTS OF CONTROLLED INGESTION OF KAOLINITE (5%) ON FOOD INTAKE, GUT MORPHOLOGY AND *IN VITRO* MOTILITY IN RATS

Florian Voinot^{1,2}, Caroline Fischer^{1,2}, Amandine Bœuf^{2,3}, Camille Schmidt^{1,2},
Véronique Delval-Dubois^{2,3}, François Reichardt⁴, Nicole Liewig^{1,2}, Bertrand
Chaumande^{2,3}, Laurence Ehret-Sabatier^{2,3}, Jean-Hervé Lignot^{1,2} and Fabielle
Angel^{1,2}

¹ Université de Strasbourg, IPHC, 23 rue Becquerel, 67087 STRASBOURG, France.

² CNRS, UMR7178, 67037 Strasbourg, France.

³ Université de Strasbourg, IPHC, 25 rue Becquerel, 67087 STRASBOURG, France.

⁴ Lehrstuhl für Humanbiologie, Technische Universität München,
Liesel-Beckmann-Straße 4, 85350 Freising-Weihenstephan, Germany.



Published in *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2011

ABSTRACT

Geophagia is found in various animal species and in humans. We have previously shown that spontaneously ingested kaolinite interacts with the intestinal mucosa, modifies nutrient absorption, and slows down gastric emptying and intestinal transit in rats *in vivo*. However, the precise mechanisms involved are not elucidated. The aim of the present work was to investigate the effects of controlled kaolinite ingestion on food intake, gut morphology and *in vitro* motility in rats. Male Wistar rats were fed with 5% kaolinite in standard food pellets during 7, 14 and 28 days. Body mass and food consumption were measured daily. Intestinal morphological and proteomic analyses were undertaken. The length of mucosal lacteals was evaluated. Plasmatic levels of leptin and adiponectin were determined. Finally, organ bath studies were undertaken to evaluate smooth muscle contractility. Food consumption was significantly increased during the first two weeks of kaolinite ingestion without any mass gain compared to controls. Kaolinite induced weak variations in proteins that are involved in various biological processes. Compared to control animals, the length of intestinal lacteals was significantly reduced in Kaolinite group whatever the duration of the experiment. Leptin and adiponectin plasmatic levels were significantly increased after 14 days of kaolinite consumption. Changes in spontaneous motility and responses to electrical nerve stimulation of the jejunum and proximal colon were observed at day 14. Altogether, the present data give evidence for a modulation by kaolinite controlled ingestion on satiety and anorexigenic signals as well as on intestinal and colonic motility.

KEY WORDS

clay, intestine, colon, smooth muscle contractility, adipokines, cholinergic nerves.

INTRODUCTION

For many centuries, clay has been used to heal wounds, soothe indigestion and treat intestinal pathogens. Indeed, clay has been used in the treatment of several gastrointestinal diseases, like infectious diarrhoea. Clay (smectite) treatment was shown to have an antidiarrheal effect, partially antagonizing digestive motor disturbances induced by cholera toxin or hypertonic mannitol solution in dogs *in vivo* [1]. In acute diarrhoea in children, this beneficial effect consisted in reduction of duration of diarrhoea and the frequency of liquid stools [2]. Furthermore, it was demonstrated that diosmectite pre-treatment protected against allergic digestive disturbances induced by antigen administration in guinea pigs sensitized to cow's milk [3].

The mechanism of action of clay might be to adsorb toxins and bacteria and to modify intestinal mucus that reinforces the mucosal barrier [1]. This effect may be due to changes in the chemical nature of mucopolysaccharides by modifying their rheological properties [4]. The consequence is the reduction of toxin's penetration through the mucus layer and the repair of mucosal integrity. The action of clay on bacteria has been also demonstrated to treat Buruli ulcer, a necrotizing dermatological infection caused by *Mycobacterium ulcerans*. It was shown that the pH and oxidation state buffered by the clay mineral surface is the key to controlling the solution chemistry and redox-related reactions occurring at the bacterial cell wall [5]. Furthermore, natural clay has been shown to increase the effectiveness of the mucus barrier against mucosal damage induced by pepsin *in vivo* [6]. Finally, there is evidence that diosmectite, administered as a post-treatment, is effective in controlling hapten-induced colonic inflammation through a mechanism that might involve adsorption of proteins and mucus protection [7].

Interestingly, geophagia, a form of pica (ingestion of non-nutritive substances), is common in many species and has been prevalent throughout human history [8,9]. Furthermore, kaolinite consumption can occur during illness. Indeed, it has been shown that rats, which do not vomit in response to emetogenic stimuli, ingest kaolinite [10]. Nausea and vomiting are important side effects of chemotherapy, potentially leading to poor quality of life and nausea is a highly aversive sensation considered even more aversive than pain. Therefore, rats, which do not vomit in response to antineoplastic drug (cisplatin), spontaneously ingest kaolinite [10,11]. This behavior represents an indirect marker of nausea in rats. One major effect of kaolinite ingestion is to reduce gastrointestinal disturbances induced by cisplatin *in*

vivo. Indeed, it is known that gastric dysrhythmia is correlated with nausea and vomiting in animal models as well as in human [12]. Chronic cisplatin induces gastrointestinal dysmotility and kaolinite intake during a week. Although pica might be protective against cisplatin toxicity in rats, the exact mechanisms involved are not known.

We have previously shown that kaolinite, when spontaneously ingested, interacts with the intestinal mucosa [13]. In particular, kaolinite ingestion leads to changes in intestinal morphology and in the expression of several cytoskeleton proteins. It also modifies nutrient absorption [13,14] and water adsorption [15]. Furthermore, kaolinite ingestion was shown to slow down gastric emptying and intestinal transit in rats *in vivo* [14], probably due to clay particles property to absorb water and to drain faecal matter [16]. This effect is amplified when nutrients are present in the lumen, possibly leading to an increased absorption. However, the precise mechanisms involved in the changes induced by kaolinite ingestion are not really elucidated as far as intestinal physiology is concerned.

The first aim of the present work was to evaluate whether a controlled ingestion of kaolinite (5%) showed the same interactions with the intestinal mucosa as those observed with spontaneously ingested kaolinite. Therefore, epithelial proteomic analysis was performed and intestinal morphology was investigated. The second aim was to investigate the mechanisms involved in the changes in nutrient absorption induced by kaolinite ingestion. Thus, since lacteals have been shown to be implicated in lipid and water absorption as well as in transport [17-19], the length of lacteals was determined by using immunolabelling to localize aquaporin-1 (AQP-1) as a marker of the endothelium of the lymphatic vessels in the lamina propria within the villi of the small intestine [20]. Moreover, in a previous study, we showed that control rats and those eating a kaolinite complemented diet showed a similar weight gain, despite the reduced caloric value of the kaolinite complemented diet [13]. It is hypothesized that kaolinite ingestion modifies the anorexigenic and satiety signals. As adipokines synthesized by adipocytes, and particularly leptin and adiponectin, regulate energy balance and glucose homeostasis [21], the plasmatic levels of these peptides were measured. Finally, as kaolinite consumption was shown to modify intestinal transit, intestinal and colonic motility patterns were determined using an *in vitro* organ bath technique.

MATERIAL AND METHODS

Animals

A total of 39 male Wistar rats (Charles River Laboratories, Lyon, France), weighing approximately 270 g upon their arrival, were housed individually in a controlled environment at an ambient temperature of 24 ± 2 °C and under a 12h light/dark cycle (lights on 07.00 h). They were maintained on a wire mesh floor to recuperate food fragments and to minimize coprophagia. They had *ad libitum* access to food (standard low-fat diet A03, SAFE, Augy, France) and tap water for 1 week before the experiment has begun to limit stress effects. Animal care was provided according to protocols and guidelines approved by the local Animal Care and Ethic Committees (CREMEAS #AL/06/25/12/09).

Experimental design

Rats were divided into 2 groups when their weight reached 300 ± 10 g : (i) 18 control rats were fed with standard pellets (standard low-fat diet A03, SAFE, Augy, France), and (ii) 21 kaolinite rats were fed with pellets containing, by mass, 5% of kaolinite (Argiletz, Lizy-sur-Ourcq, France). Each diet was obtained from SAFE. Animals were given fresh food once a day. Body mass, faeces production as well as food and water intake were measured daily. Food intake was quantified by weighing the pellets remaining in the trough and the fragments on the floor. After 7, 14 and 28 days of the experimental diet, 6 control and 7 kaolinite rats (noted Kaol7, Kaol14 and Kaol28), were anaesthetized with isoflurane 2% and were decapitated. Thereafter, blood was immediately collected and centrifuged before the supernatant was collected and stored at -80 °C. The jejunum and proximal colon were removed and placed onto an ice-cold plate for histological, proteomic and motility analyses. Carcasses were stored at -20 °C for later determination of body composition.

Proteomic analysis

For proteomic analysis, mucosa from jejunum was collected using a glass slide and was stored at -80 °C. Frozen mucosa was mechanically ground to a fine powder in a Mikro-Dismembrator (Sartorius AG, Göttingen, Germany) at 3000 rpm for 1 min. Biological material, PTFE shaking flasks and grinding balls were pre-cooled in liquid nitrogen in order

to avoid thawing of the material during the process. Around 20 mg of the resulting powder was suspended in 200 μ L of extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (w/v) and protease inhibitors (one pellet *per* 50 mL, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)). After four cycles of sonication (25 °C, 5 s)/agitation (4 °C, 15 min), samples were centrifuged (10 000 g, 4 °C, 5 min) and proteins were precipitated at -20 °C with acetone overnight. After centrifugation (10 000 g, 4 °C, 30 min), protein pellets were dried and solubilized in 200 μ L of extraction buffer. Protein amount was determined using Bio-Rad Protein Assay protocol with addition of 2 μ L of HCl 0.1 M and ovalbumin as standard.

Six control rats and six Kaol28 rats were used for proteomic analysis. Prior to 2D electrophoresis samples were pooled for each condition in 3 groups (2 rats/group) according to their daily food consumption (mean consumption similar for all groups). Two-dimensional electrophoresis gels were performed in duplicate for each pool (total 6 gels *per* condition). Isoelectric focusing was performed on samples containing 700 μ g of proteins, 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (w/v), 20 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM DTT, 0.2% (v/v) Biolytes® 3/10 ampholytes (Bio-Rad) and 0.005% (v/v) bromophenol blue as previously described [13]. Second dimension was carried out on 10% SDS-PAGE. Gel images were captured using the GS-800™ Calibrated Densitometer (Bio-Rad) and were analysed with the PDQuest™ software (Bio-Rad). The protein content of each spot was determined by its relative quantity normalized by the total density in the gel image. Gels of control animals (n = 6) were compared to gels of Kaol28 rats (n = 6). Spots presenting a variation in intensity were submitted to an ANOVA test and only candidates with a p value < 0.05 were considered and were manually excised from the gels.

In-gel digestion was carried out as previously described [22] and the tryptic peptides were extracted by addition of 35 μ L of 60% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) formic acid. MALDI mass measurements were carried out on an Ultraflex™ (Bruker Daltonics) and nanoLC-MS/MS analyses were performed using a nano-HPLC-Chip system (Agilent Technologies) coupled with an HCT Plus ion trap (Bruker Daltonics) [22,23]. Data interpretation was performed as described in Trabalon *et al.* [23]. An in-house generated protein database composed of protein sequences of *Rattus norvegicus* downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (on May 06, 2009) and of common contaminants such as porcine trypsin and human keratins concatenated with reversed copies of all sequences (135 406 entries) was used.

Light microscopy and immunohistochemistry

Jejunum samples (0.5 cm) were fixed for at least 6 h in 3% paraformaldehyde, then dehydrated and embedded in paraffin for tissue sectioning. Tissue sections (5 µm thick) were then cleared of paraffin and rehydrated.

To measure the width of each layer of jejunum, trichrome staining was performed following a standard protocol. Fifty different areas were examined.

As in the course of experiments intestinal inflammation was suspected, tissue sections were stained to visualize tissue mast cells (MC) according to Strobel *et al.* [24]. Briefly, the sections were stained with 0.5% toluidine blue (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France,) in 0.5 N HCl for 30 min, rinsed in water for 5-10 min, differentiated in 95% alcohol before being cleared and mounted in Eukitt (EMS, Hatfield, USA). The slides were then observed under a microscope (Zeiss Axioplan, Zeiss, Le Pecq, France), before twenty high-power fields (x 630) were randomly selected. Then, the number of MC was determined and expressed as mean.

Immunohistochemistry was performed by indirect fluorescent labelling. Tissue sections were incubated 15 min at room temperature with 5% phosphate buffered saline–bovine serum albumin before incubation for 2 h with rabbit anti-rat aquaporin-1 (AQP1) diluted at 1:200. Sections were then treated with goat anti-rabbit IgG (1:200, 1 h at RT) labelled with fluorescein isothiocyanate conjugate, then mounted with Fluoromount (EMS, Hatfield, USA). They were examined by means of a fluorescent microscope (Zeiss Axioplan, Zeiss, Le Pecq, France) equipped with the appropriate filter set (450–590 nm band pass excitation filter).

Body composition

Before analysis, the carcasses were lyophilized to a constant mass. Total lipid content was determined using a method described in Folch *et al.* [25]. Total nitrogen was assessed by a Kjeldahl procedure and was converted to protein by multiplying by 6.38 [26]. Carcass water content was determined by subtracting dry mass from fresh mass.

Plasmatic levels of leptin and adiponectin

Plasmatic leptin and adiponectin levels were determined by ELISA (Rat Leptin ELISA kit, Invitrogen, Camarillo, USA and Rat Adiponectin ELISA kit, Millipore, St. Charles, USA) using a Infinite M200 (Tecan, Lyon, France).

Organ bath analysis

General

Organ bath analysis was performed after 14 and 28 days of experiment. Jejunum and proximal colon segments were placed in a Petri dish containing a physiological Krebs solution (in mM: 119.8 NaCl, 16.2 C₆H₁₂O₆, 15.5 NaHCO₃, 5.8 KCl, 2.5 CaCl₂.H₂O, 2.0 NaH₂PO₄.H₂O, 1.2 MgCl₂.H₂O, pH 7.4). The segments were then rinsed off intraluminal content. Longitudinally oriented muscle strips from jejunum (LM; 10x5 mm), after mucosa and submucosa had been removed, and circular oriented muscle strips from proximal colon (CM; 3 mm) were mounted in organ bath chambers containing 10 ml of warmed (37 °C) and gassed (95% O₂, 5% CO₂) Krebs solution. Smooth muscle mechanical activities of jejunum and proximal colon were measured by means of an isometric force transducer (Fort25, WPI, Aston, UK) and amplifier (Lab-Trax-4/24T, WPI, Aston, UK) and were visualized on a computer (HP Compaq 8000, Hewlett-Packard, USA).

Acetylcholine, used for pharmacological analysis, was delivered by Tocris (Bristol, UK) and dissolved in distilled water.

Experimental protocols

At the beginning of each experiment, strips were stretched to their optimal resting tension (value of tone with optimal contractile responses), which was achieved by step-wise increases in tension until basal tone reached stable amplitude of 9.8 mN. Strips were allowed to equilibrate for 60 min. Bath solution was changed every 30 minutes. The effect of exogenous acetylcholine was evaluated at its maximal contractile effect. After each experiment, tissues were washed out by replacing the bath solution several times with fresh Krebs solution and muscle strips were allowed to equilibrate for 30 minutes. Recovery of smooth muscle strips was regularly verified by stimulating intramural nerves. Transmural

electrical nerve stimulation (ENS) was applied via two steel electrodes, placed 10 mm apart. Square wave pulses of 15 V intensity, 10 Hz frequency and 200 μ s duration during 10 s periods were used.

Data analysis

Analysis was performed using Datatrax (Datatrax 2.0, WPI, Aston, UK). Spontaneous mechanical activities (SMA) were analysed by measuring tone as well as amplitude and frequency of spontaneous contractions. Tone and contraction amplitudes were expressed in millinewtons per mg of fresh tissue (mN/mg); frequency of contractions was expressed in contraction per minute (cpm). Strip contraction was expressed as percentage of increase compared to basal resting tone. Increases in tone induced by acetylcholine were expressed in per cent compared to basal amplitudes. The relaxation (R) and the off-contraction (C) induced by ENS were measured as the difference between the baseline and the maximal responses; data were expressed in mN per mg of fresh tissue. Amplitude of each component of the responses to nerve stimulation varied considerably from one strip to another; therefore, each muscle strip was considered as its own control. Motility parameters were evaluated on four jejunal and colonic strips per animal.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was carried out using R (R Foundation, Vienna, Austria). Differences between group were evaluated using ANOVA followed by Tukey multiple comparison tests or Kruskal-Wallis test followed by Wilcoxon test. The effect of the drug was evaluated by paired t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (noted *).

RESULTS

Analysis and identification of differentially expressed proteins in jejunal mucosa

The proteomic analysis was performed at day 28, to compare with previous data concerning spontaneous consumption of kaolinite [13].

2D gels were individually imaged and analysed. An average of 539 and 674 protein spots for control group and Kaol28 group respectively was detected *per gel* from 700µg loaded protein after colloidal CBB staining, within a pH range of 5-8 and a molecular mass range of 20-200 kDa (**Figure 1**). Among these spots, 15 were significantly differently expressed ($p < 0.05$). **Table I** shows that, among these, 7 were significantly up-regulated in the Kaol28 group ($p < 0.05$) including albumin, and cytoke­ratin 8 (CK8); 8 spots were significantly down-regulated compared to the control group ($p < 0.05$), including transketolase (TK), protein disulfide isomerase A3 (PDIA3), alpha-enolase (ENO1), and triose phosphate isomerase 1 (TPI1). However, intensity of these spots was slightly modified (ratio < 6). In few cases (spots 5 and 11) two proteins were identified in the spot, preventing the unambiguous determination of regulated protein.

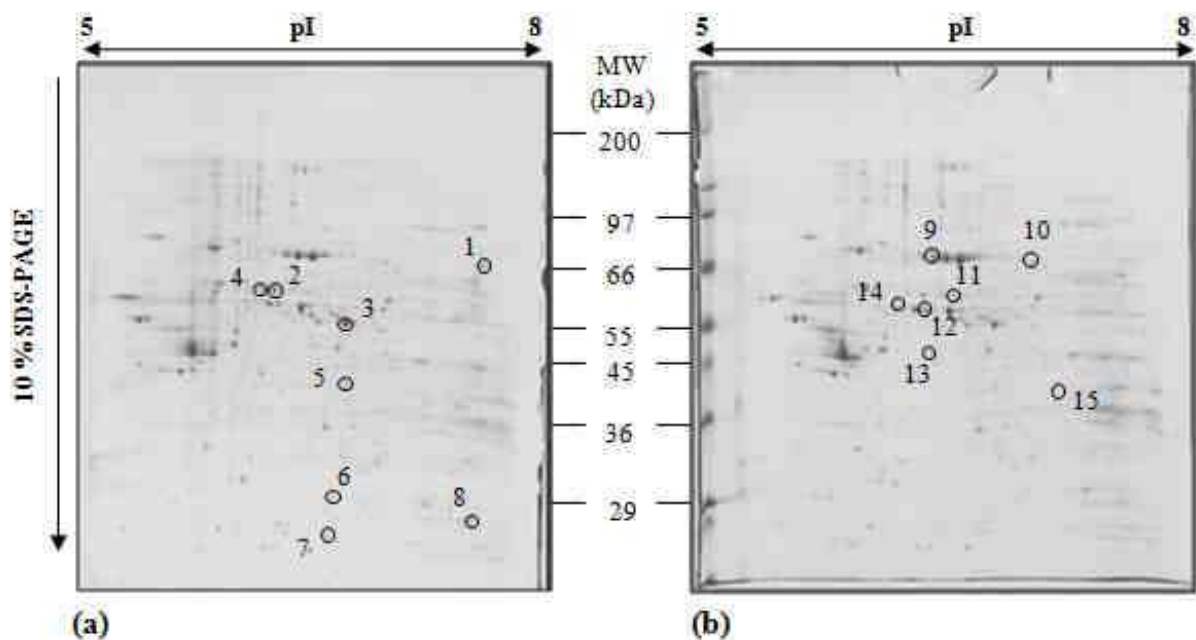


Figure 1: Representative 2D map of jejunal mucosa proteins from (a) control and (b) kaolinite 28 (Kaol28) rats. Jejunal mucosa proteins (700 µg) were separated on 2D gel electrophoresis (1st dimension: IEF pH range 5–8; 2nd dimension: 10% SDS-PAGE). Labeled spots are those regulated in Kaol28 rats compared with control rats. Spots 1–7: downregulated; spots 16–28 upregulated. See Table I for details.

Spot	Identified protein	Accession Number	Variation	Calc MW	Calc PI
1	Transketolase	gi 12018252	-2.2**	68	7.54
2	Protein disulfide-isomerase A3	gi 1352384	-2.3**	57	7.10
3	Alpha-enolase	gi 109468300	-1.2***	51	6.16
4	Protein disulfide-isomerase A3	gi 1352384	-1.4*	57	7.10
5	Arginase 2	gi 149051546	-1.3**	39	6.24
	Alpha-enolase	gi 109468300		51	6.16
6	Endoplasmic reticulum protein 29	gi 16758848	-1.3*	28	6.23
7	Parkinson disease protein 7	gi 16924002	-1.3*	20	6.32
8	Triosephosphate isomerase 1	gi 117935064	-2.0*	31	6.89
9	Albumin	gi 158138568	+1.6*	69	6.09
10	WD repeat protein 1	gi 149047324	+1.3*	66	6.15
11	Protein disulfide-isomerase A3	gi 1352384	+5.6*	57	7.10
	Carboxyl esterase 5	gi 109508329		62	5.99
17	Cytokeratin 8	gi 203734	+1.4*	53	5.49
18	Annexin A7	gi 148539909	+1.3*	50	5.91
14	Cytokeratin 8	gi 203734	+2.0**	53	5.49
15	LEVI and SH3 protein 1	gi 142419130	+1.4*	30	6.61

Table I: Identification of jejunal mucosa-regulated proteins in kaolinite 28 rats (Kaol28) by MALDI-MS or/and nano-LCESI-MS/MS. The spot labels correspond to those in Figure 1. The variation of the Kaol28 group proteins compared to the control group was evaluated thanks to PDQuest analysis: -) proteins downregulated; + proteins upregulated. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 by one-way ANOVA with respect to the control group. Two proteins were identified in spots 5 and 11.

Daily nutritional parameters and body composition

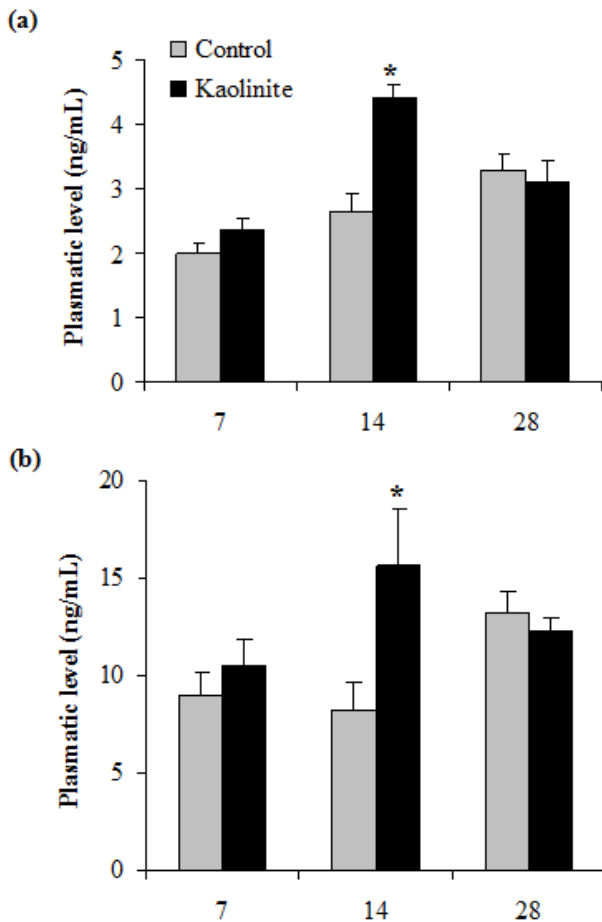
Kaolinite rats showed no difference in daily body mass gain compared to control rats, whatever the duration of the experiments ($p > 0.05$; **Table II**). During the first 14 days, food intake was more important in Kaolinite group compared to the control group (respectively 23.7 ± 0.4 g and 20.7 ± 0.3 g between day 0 and day 7; 25.0 ± 0.5 g and 21.6 ± 0.7 g between day 7 and day 14; $p < 0.001$). As 5% of nutrients were replaced by kaolinite in pellets of the Kaolinite group, the diet in the control and the Kaolinite group was not isocaloric. Consequently, a theoretical isocaloric group (IsoK), corresponding to the control group food intake plus 5%, was considered. In comparison with this theoretical group, the nutrient intake in the Kaolinite group is 8.7% higher during the first week and 10.1% during the second ($p < 0.001$). Daily water intake and faeces production were not different between the groups during the experiment ($p > 0.05$).

Groups	Days of experiment		
	0-7	7-14	14-28
Daily body mass gain (g)			
Control	3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.5	2.3 ± 0.2
Kaolinite	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.4	2.0 ± 0.3
Daily food intake (g)			
Control	20.7 ± 0.3	21.6 ± 0.7	21.8 ± 0.8
Kaolinite	23.7 ± 0.1 ^{***}	25.0 ± 0.5 ^{***}	22.7 ± 0.8
IsoK	21.8 ± 0.4	22.7 ± 0.7	22.9 ± 0.9
Daily water intake (g)			
Control	30.3 ± 1.8	33.9 ± 1.1	31.7 ± 1.0
Kaolinite	27.8 ± 0.9	30.5 ± 1.6	32.1 ± 2.2
Daily faeces production (g)			
Control	7.5 ± 0.2	8.6 ± 0.4	8.0 ± 0.3
Kaolinite	6.4 ± 0.2	7.1 ± 0.5	7.4 ± 0.6

Table II: Daily nutritional parameters in control and kaolinite rats from 0 to 28 days of experiment. IsoK is the theoretical kaolinite group whose diet is isocaloric compared to the control group. Kaolinite rats showed hyperphagia from 0 to 14 days of experiment compared to the IsoK group. Data are mean ± SEM. ***P < 0.001 by one-way ANOVA followed by Tukey test with respect to the control group.

The body composition (protein, lipid, ashes and water content) was not significantly different in the Kaolinite group compared to the control group at 7, 14 and 28 days of experiment (data not shown; p>0.05).

Plasmatic levels of adipokines



Plasmatic levels of adipokines were increased after 14 days of kaolinite ingestion (Figure 2). Indeed, after 14 days of experiment, plasmatic levels of leptin (Figure 2a) was 1.7 times higher in the Kaolinite group (4.4 ± 0.2 ng/mL) compared to the control group (2.6 ± 0.3 ng/mL). Similarly, after 14 days of experiment, plasmatic levels of adiponectin (Figure 2b) were significantly higher in the Kaolinite group (15.7 ± 2.9 ng/ml) compared to the control group (8.3 ± 1.4 ng/ml).

Figure 2: Plasmatic levels of (a) leptin and (b) adiponectin in control (open bar) and kaolinite (filled bar) rats from 7 to 28 days of experiment. Data are mean ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01 by oneway ANOVA followed by Tukey test with respect to controls.

Morphometric measurements and length of lacteals in jejunum

The width of the mucosa, the muscularis mucosa, the submucosa, the circular and the longitudinal smooth muscle in the jejunum did not differ between the control and the Kaolinite group whatever the duration of the experiment(7, 14 and 28 days) ($p>0.05$).

AQP1 appeared widely distributed in the central lacteals in the *lamina propria* (**Figure 3**). In the control group, the lacteals were localized up to the tip of the *lamina propria* (**Figure 3a**) while in the Kaolinite group, they appeared at a lower position in the intestinal villi at day 7, 14 and 28 (**Figure 3b**). Therefore, the presence of kaolinite in the intestinal lumen induced a significant reduction (20%) in the length of lacteals in the Kaolinite group (7, 14 and 28 days of experiment) compared to the control group ($p<0.05$; **Figure 3c**).

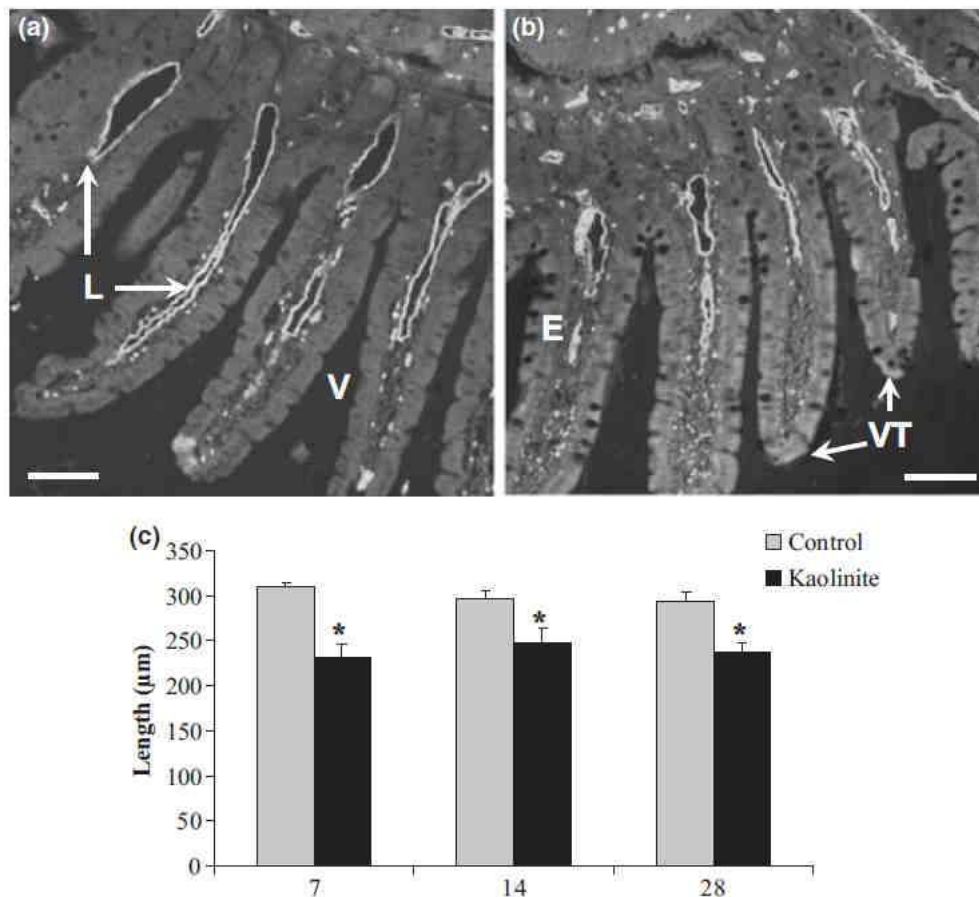


Figure 3: Immunolocalization of aquaporin-1 (AQP1) in the jejunal mucosa of (a) control and (b) Kaolinite rats. AQP1 is usually present in the membrane of intestinal lacteals (L) constitutive of the lamina propria. Scale bar: 100 μm . (c) These lacteals are dilated and extended to the villi tips (VT) in the epithelium (E) of control rats whereas they are collapsed and retracted at the basis of the villi (V) in the Kaolinite group. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ by one-way ANOVA followed by Tukey test with respect to controls.

Mast cells in rat jejunal mucosa

MC were principally localised in the jejunal mucosa. The number of MC per section was not significantly different between the Kaolinite group (10.2 ± 0.5) and the control group (10.1 ± 0.6) at 7, 14 and 28 days of experiment ($p > 0.05$).

Organ bath studies

No difference in motility parameters was observed in the control group at day 14 and day 28. Consequently, data from organ bath studies were pooled in a single control group.

Spontaneous mechanical activities of jejunum and proximal colon

In the control group, LM and CM developed basal resting tone and SMA (**Table III**). LM exhibited one type and CM developed two types of SMA: one with low amplitude and high frequency contractions and a second with high amplitude and low frequency contractions.

Groups	Basal tone (mN/mg)	SMA				Mechanical response to ENS			
		Small rhythmic contractions		Large contractions		R		C	
		Amplitude (mN/mg)	Frequency (cpm)	Amplitude (mN/mg)	Frequency (cpm)	Amplitude (mN/mg)	Duration (s)	Amplitude (mN/mg)	Duration (s)
LM									
Control	0.177 ± 0.009^a	0.047 ± 0.009^a	33.95 ± 0.55	✓	✓	0.038 ± 0.006	7.8 ± 0.3	0.178 ± 0.025^a	20.2 ± 2.2
Kaol14	0.135 ± 0.015^b	0.025 ± 0.001^b	33.33 ± 0.46	✓	✓	0.031 ± 0.004	7.1 ± 0.4	0.095 ± 0.005^b	17.6 ± 1.1
Kaol28	0.172 ± 0.011^a	0.045 ± 0.004^a	32.95 ± 0.76	✓	✓	0.035 ± 0.006	7.8 ± 0.5	0.190 ± 0.030^a	18.6 ± 1.5
CM									
Control	0.115 ± 0.011	0.035 ± 0.010^a	13.05 ± 0.42	0.155 ± 0.042	1.18 ± 0.28	0.023 ± 0.002^a	8.1 ± 0.4	0.485 ± 0.076^a	28.7 ± 1.6
Kaol14	0.087 ± 0.011	0.014 ± 0.002^b	13.02 ± 0.58	0.150 ± 0.020	0.73 ± 0.09	0.011 ± 0.002	7.4 ± 0.9	0.275 ± 0.045^b	26.0 ± 1.6
Kaol28	0.103 ± 0.015	0.032 ± 0.004^a	13.43 ± 0.27	0.165 ± 0.026	1.39 ± 0.25	0.026 ± 0.004^a	9.2 ± 0.4	0.475 ± 0.065^a	33.5 ± 2.7

Table III: Characteristics of spontaneous mechanical activities (SMA) and mechanical response to electrical nerve stimulation (ENS) of rat jejunum longitudinal muscle (LM) and proximal colon circular muscle (CM) in control, kaolinite 14 (Kaol14) and kaolinite 28 (Kaol28) groups. Smooth muscles developed basal resting tone and SMA. SMA could be characterized by small rhythmic contractions alone or by large contractions superimposed on small rhythmic contractions in colon. Mechanical response to ENS could be divided in relaxation (R) and off-contraction (C). See Figure 4 for details. Data are mean \pm SEM. Values sharing common letters (a,b) are not significantly different ($P > 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey test, except for basal tone (Kruskal–Wallis followed by Wilcoxon test).

In the Kaol14 group, the LM basal tone, the LM-SMA and the CM-SMA amplitude were significantly reduced compared to the control group ($p < 0.05$; respectively a decrease of 27, 40 and 63 %; **Table III**). In this group, the CM basal tone, the LM-SMA and the CM-SMA frequency were not significantly different compared to the control group ($p > 0.05$). In the Kaol28, no significant difference was noted when compared to the control group ($p > 0.05$; **Table III**).

Mechanical responses of jejunum and proximal colon to electrical nerve stimulation

In the control group, ENS always induced, in LM and in CM, a biphasic mechanical response, characterised by a relaxation R followed by an off-contraction C (**Figure 4; Table III**). In the Kaol14 group, the amplitude of CM-R, LM-C and CM-C were significantly reduced compared to the control group ($p < 0.05$; respectively a decrease of 52, 44 and 43 %; **Table III**). In this group, the LM-R amplitude and the duration of ENS components were not significantly changed compared to the control group ($p > 0.05$). In Kaol28, there was no significant variation in the amplitude of ENS components compared to the control group ($p > 0.05$; **Table III**).

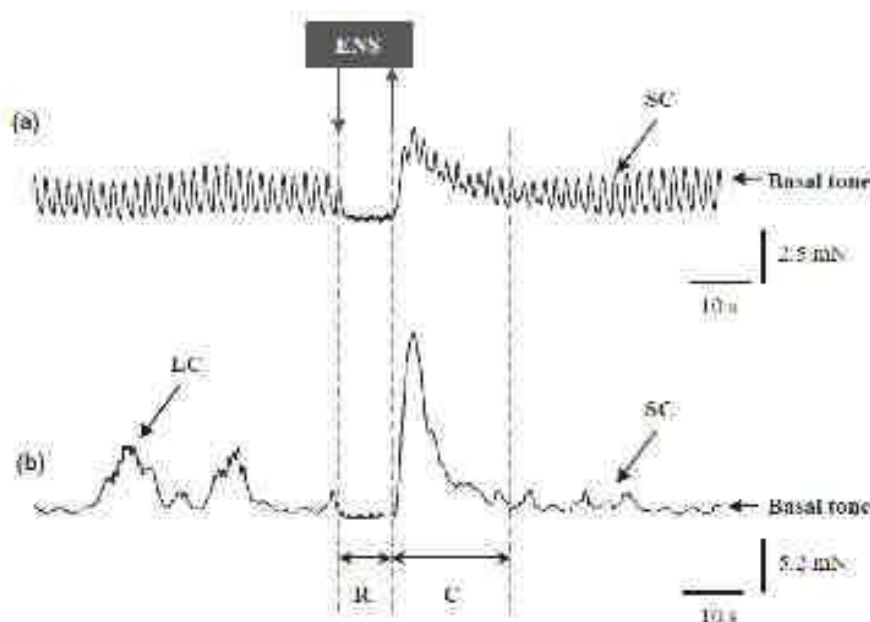


Figure 4: Spontaneous mechanical activities (SMA) and mechanical response to electrical nerve stimulation (ENS) developed by (a) longitudinal smooth muscle of jejunum (LM) and (b) circular smooth muscle of proximal colon (CM) in the control group. In control as well as in the kaolinite group, LM and CM exhibited rhythmic small phasic contractions (SC) and CM exhibited large contractions (LC) superimposed on SC. Mechanical response to ENS is composed of a relaxation (R) and an off-contraction (C) at the end of stimulation.

Cholinergic control of jejunum and proximal colon motility

In the control group, the characteristics of SMA were unchanged in both LM and CM, in the presence of acetylcholine (10⁻⁵M) ($p > 0.05$). However, spontaneous muscle tone was increased by $62 \pm 12\%$ in LM (**Figure 5a**) and by $105 \pm 24\%$ in CM. In the Kaol14 and Kaol28 groups (**Figure 5b**), the effect of acetylcholine was more pronounced than in the control group, but in LM only ($p < 0.05$): the LM tone was increased by $146 \pm 48\%$ in Kaol14 group and $151 \pm 22\%$ in Kaol28 group (**Figure 5c**).

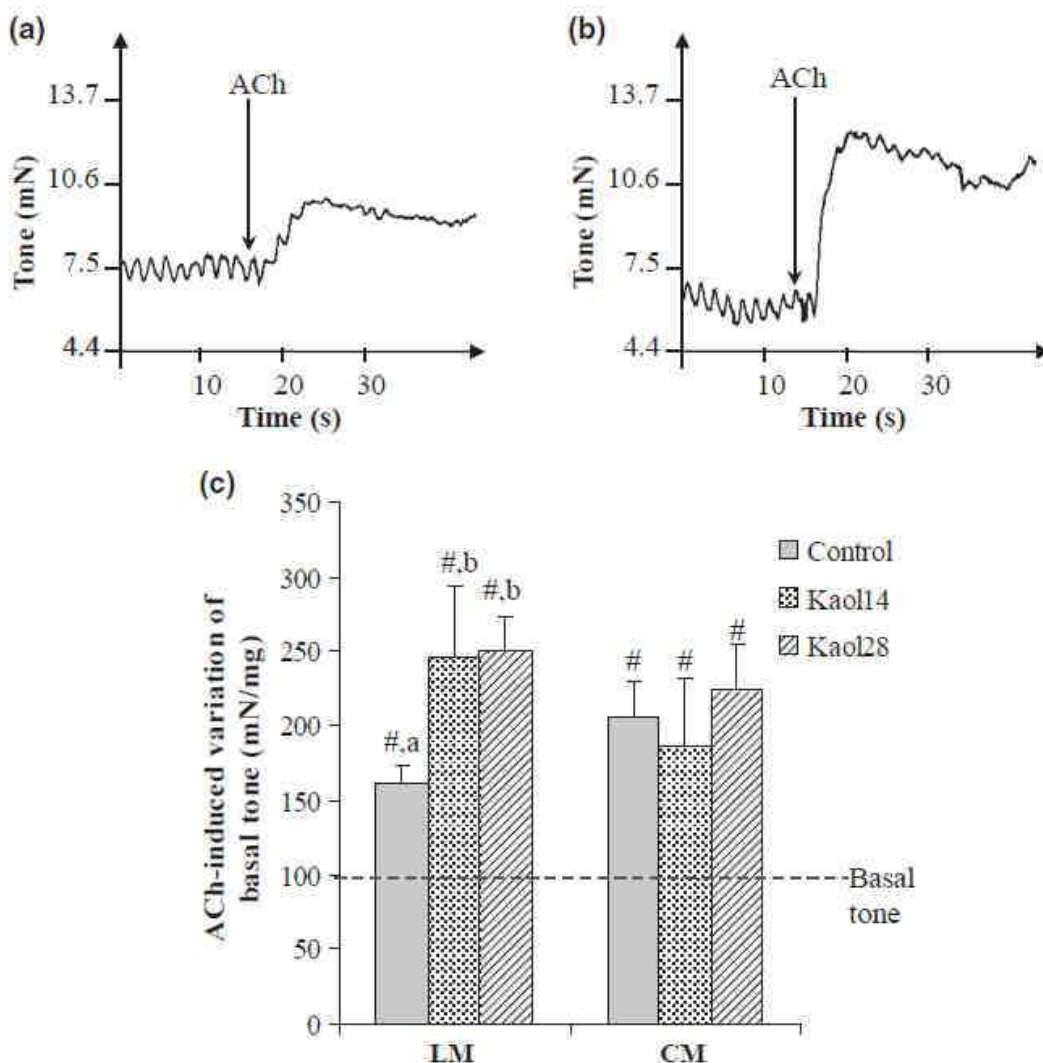


Figure 5: Effect of acetylcholine (ACh, 10⁻⁵ M) on basal tone of longitudinal smooth muscle of jejunum (LM) and circular smooth muscle of proximal colon (CM) in control and in Kaolinite rats. ACh induced a significant increase of basal tone in the (a) control group as well as in the kaolinite 14 (Kaol 14) and the (b) kaolinite 28 group (Kaol 28). (c) This tone increase was enhanced in the LM of Kaolinite group. 100% indicates the level of basal tone. #Difference with basal tone ($P < 0.05$) by paired t-test; Values sharing common letters (a,b) are not significantly different ($P > 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey test.

DISCUSSION

The present work showed that the controlled ingestion of kaolinite did not induce any change in daily mass gain, water intake, faeces production or body composition. However, our data point out differences in some physiological parameters.

First of all, it was observed that ingestion of kaolinite induced an increase in food intake during the first and second week of consumption, without any mass gain compared to control animals. This hyperphagia may be the cause of the increase in plasmatic levels of leptin and adiponectin at 14 days, which in turn produced a decrease in pellets consumption [27][]. Indeed, leptin is considered as a lipostatic factor that is produced by white adipose tissue acting on the brain to regulate food intake and energy expenditure. It promotes stable body weight and fat stores despite irregular food intake [28]. Beside adipose tissue, gastric mucosa is able to synthesize leptin [29]. Gastric leptin is sensitive to the nutritional status of the body. Food intake quickly depletes gastric leptin while sustained feeding stimulates leptin synthesis from fat stores [29,30]. In our experiments, the release of leptin in plasma was delayed, indicating a probable release from adipose tissue to decrease food intake, as shown by Barrachina *et al.* [27]. Beside leptin has a possible physiological role in satiety, it can also be involved in inflammatory processes [31]. In our work, no increase of mast cell number was observed but an inflammatory state cannot be excluded in long term kaolinite consumption. As far as adiponectin is concerned, several studies highlighted its role as an indicator and protector of energy storage levels [32] and its role in reduction in some pro-inflammatory cytokines [33]. Furthermore, plasmatic levels of adiponectin were shown to be very high in patients with anorexia [34,35]. The fact that adiponectin plasmatic levels increased in our experiments after two weeks of kaolinite ingestion, may indicate a long term control of body mass gain.

A second aspect concerns the proteomic analysis which was undertaken to determine whether the mucosal proteins were differentially expressed after controlled kaolinite ingestion as it was previously shown after spontaneously ingestion [13]. Our data show variations in the expression of proteins involved in various biological processes including immunological and inflammatory process, glycolysis and gluconeogenesis, protein folding, amino acid metabolism, extracellular space and cytoskeleton-related processes. Ding *et al.* [36] identified variations in the expression of proteins in relation to colonic inflammation. Several of these protein variations are also found in our study. However, the fact that kaolinite ingestion might lead to

intestinal inflammation must be considered with caution because of the very low variations in protein expression compared to those observed in our previous studies using other nutritional protocols. Furthermore, no significant increase in mast cell number was observed in the kaolinite group whatever the duration of experiments. Therefore, further experiments must be undertaken to verify the presence or the absence of intestinal inflammation. The third aspect to be discussed is the effect of ingested kaolinite on intraluminal contents. Clay minerals are hydrous layered aluminosilicates. They display very large specific surface areas and excellent adsorption, a strong affinity for water molecules associated with a high swelling potential [37]. It has been shown *in vitro* that the addition of silica nanoparticles and sodium chloride to an aqueous suspension of kaolinite modifies its properties and behaviour by inducing a sol-gel transition. The gels display relatively strong yield stresses that increase with both salt and nanoparticle concentration. First, partial stabilization of the clay particles is observed. Then, as the concentration of particles is increased, a transition from a liquid to a gel state is observed [38]. Consequently, it may be postulated that kaolinite presence in the intestinal lumen induces a decrease in the absorption of fluids through the intestinal epithelium. Another observation corroborates this hypothesis: in our study, we observed that the length of intestinal lacteals (lymphatics) was significantly reduced during kaolinite ingestion compared to controls. The important role of intestinal lacteals in regulating interstitial volume and transmucosal water transport has been largely documented in the literature [19]. More particularly, it has been shown that the relative fraction of absorbed fluid that is removed from the mucosal interstitium by the lymphatics is dependent on absorption rate [39-41]. Furthermore, fluid absorption in the small intestine is linked to the transport of hydrolytic products of food digestion. Both blood flow and lymph flow are increased when nutrients are present within the intestinal lumen, with lipids exerting more potent responses than carbohydrates and proteins [40]. The rate of lipid chylomicron transit to the lymphatics is directly related to the extent of interstitial hydration [41]. Considering these observations, the fact that the length of lacteals was decreased in our experiments might indicate a decrease in water absorption and in lipid absorption. However, apolipoprotein A-IV, involved in lipid absorption and in satiety, was not increased at two and four weeks of kaolinite ingestion (Western Blot analysis, data not shown). This effect of kaolinite on lipid absorption seems to depend on the nutritional status of rats, since we have shown previously that lipid absorption was increased after spontaneous ingestion of kaolinite and intraluminal perfusion of a kaolinite containing solution [14].

Finally, our results show some evidence for an effect of kaolinite ingestion on intestinal and colonic motility *in vitro*. More particularly, excitatory responses to intramural nerve stimulation and responses to exogenous acetylcholine were modified in Kaolinite rats, suggesting an impact of kaolinite ingestion on enteric cholinergic innervation. The role of enteric intramural nerves is essential in regulating numerous functions within the gastrointestinal tract. Indeed, the neurons involved in the enteric circuits regulating these functions include intrinsic afferent neurons, motor neurons and interneurons [42]. Furthermore, local smooth muscle reflexes are initiated by distension, mucosal distortion and chemical stimuli induced by the presence of intraluminal contents [43]. Acetylcholine is one of the major neurotransmitter involved in these neuronal circuits controlling many functions in the small intestine and the colon [44]. The fact that spontaneous mechanical activities and responses to intramural nerve stimulation were depressed in Kaolinite rats and that the tone increase was enhanced in the presence of acetylcholine in jejunum of Kaolinite rats beyond 14 days might indicate an adaptation to changes in viscosity of intraluminal content through enteric cholinergic neurons synapsing on inhibitory neurons which, in turn, mediate muscle relaxation, as it has been shown before [45]. A striking observation is that this effect on motility disappeared after 2 weeks of kaolinite ingestion. Further experiments are needed to substantiate these results and to determine the precise neuronal mechanisms involved, particularly the possible role of adipokines in the neuronal control of gut motility. Indeed, recent studies have shown that leptin may stimulate the activity of enteric nerves in both myenteric and submucosal plexuses [46]. To conclude, the present work shows that controlled kaolinite ingestion modulates the synthesis of satiety and anorexigenic signals, intestinal and colonic motility and the functioning of lymphatics. Kaolinite complementation, therefore, might be used to control food intake in some pathological feeding behaviour such as obesity or anorexia.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank the Department of Metrology and Instrumentation for Life Sciences (MIV) of the IPHC for electronic equipment, development and maintenance; JP. Robin for corporal composition experiments; A. Van Dorsselaer (LSMBO, DSA) for mass spectrometry facilities and A. Hranitzky for animal care. Financial support for this study was provided by the French Agence Nationale pour la Recherche (program ANR-08-BLAN-0196) and the French Ministère de la Recherche.

REFERENCES

- [1] Fioramonti J., Droy-Lefaix M.T., Buéno L. Changes in gastro-intestinal motility induced by cholera toxin and experimental osmotic diarrhoea in dogs: effects of treatment with an argillaceous compound. *Digestion*. (1987) **36**, 230-237.
- [2] Madkour A.A., Madina E.M., el-Azzouni O.E., Amer M.A., el-Walili T.M., Abbass T. Smectite in acute diarrhea in children: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (1993) **17**, 176-181.
- [3] Theodorou V., Fioramonti J., Droy-Lefaix M.T., Plique O., Buéno L. Protective action of diosmectite treatment on digestive disturbances induced by intestinal anaphylaxis in the guinea-pig. *Aliment. Pharmacol. Ther.* (1994) **8**, 295-299.
- [4] Droy M.T., Drouet Y., Geraud G., Schatz B. Spinnability: a new approach to intestinal stress and its therapy. *Gastroenterol. Clin. Biol.* (1985) **9**, 119-121.
- [5] Williams L.B., Haydel S.E. Evaluation of the medicinal use of clay minerals as antibacterial agents. *Int. Geol. Rev.* (2010) **52**, 745-770.
- [6] Leonard A., Droy-Lefaix M.T., Allen A. Pepsin hydrolysis of the adherent mucus barrier and subsequent gastric mucosal damage in the rat: effect of diosmectite and 16,16 dimethyl prostaglandin E2. *Gastroenterol. Clin. Biol.* (1994) **18**, 609-616.
- [7] González R., De Medina F.S., Martínez-Augustin O., Nieto A., Gálvez J., Risco S., Zarzuelo A. Anti-inflammatory effect of diosmectite in hapten-induced colitis in the rat. *Br. J. Pharmacol.* (2004) **141**, 951-960.
- [8] De Jonghe B.C., Lawler M.P., Horn C.C., Tordoff M.G. Pica as an adaptive response: Kaolin consumption helps rats recover from chemotherapy-induced illness. *Physiol. Behavior.* (2009) **97**, 87-90.
- [9] Parry-Jones B., Parry-Jones W. Pica: symptom or eating disorder? A historical assessment. *Br. J. Psychiatr.* (1992) **160**, 341-354.
- [10] Cabezos P.A., Vera G., Martín-Fontelles M.I., Fernández-Pujol R., Abalo R. Cisplatin-induced gastrointestinal dysmotility is aggravated after chronic administration in the rat. Comparison with pica. *Neurogastroenterol. Motil.* (2010) **22**, 797-805.
- [11] Takeda N., Hasegawa S., Morita M., Matsunaga T. Pica in rats is analogous to emesis: an animal model in emesis research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1993) **45**, 817-821.
- [12] Lang I.M., Sarna S.K., Shaker R. Gastrointestinal motor and myoelectric correlates of motion sickness. *Am. J. Physiol.* (1999) **277**, G642 -G652.

- [13] Reichardt F., Habold C., Chaumande B., Ackermann A., Ehret-Sabatier L., Le Maho Y., Angel F., Liewig N., Lignot J.H. Interactions between ingested kaolinite and the intestinal mucosa in rat: proteomic and cellular evidences. *Fundam. Clin. Pharmacol.* (2009) **23**, 69-79.
- [14] Habold C., Reichardt F., Le Maho Y., Angel F., Liewig N., Lignot J.-H., Oudart H. Clay ingestion enhances intestinal triacylglycerol hydrolysis and non-esterified fatty acid absorption. *Br. J. Nutr.* (2009) **102**, 249-257.
- [15] Klein C. & Hurlbut C.S.J. *Manual of Mineralogy, Revised 21st Edition*. John Wiley and Sons, New York, USA. 1998.
- [16] Castaing J., Noblet J. Effect of addition of sepiolite on digestive utilization of feed and performance in growing pigs. *Journées Rech. Porcine en France.* (1997) **29**, 213–220.
- [17] Dixon J.B. Lymphatic lipid transport: sewer or subway? *Trends Endocrinol. Metab.* (2010) **21**, 480-487.
- [18] Barrowma J., Roberts K. Role of lymphatic system in absorption of water from intestine of rat. *Quat. J. Exp. Physiol.* (1967) **52**, 19-30.
- [19] Kvietys P.R., Granger D.N. Role of intestinal lymphatics in interstitial volume regulation and transmucosal water transport. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2010) **1207**, E29-E43.
- [20] Habold C., Reichardt F., Foltzer-Jourdainne C., Lignot J.-H. Morphological changes of the rat intestinal lining in relation to body stores depletion during fasting and after refeeding. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* (2007) **455**, 323-332.
- [21] Rosen E.D., Spiegelman B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* (2006) **444**, 847-853.
- [22] Villiers C., Chevallet M., Diemer H., Couderc R., Freitas H., Van Dorsselaer A., Marche P.N., Rabilloud T. From secretome analysis to immunology: chitosan induces major alterations in the activation of dendritic cells via a TLR4-dependent mechanism. *Mol. Cell Proteomics.* (2009) **8**, 1252-1264.
- [23] Trabalon M., Carapito C., Voinot F., Martrette J.-M., Van Dorsselaer A., Gilbert C., Bertile F. Differences in *Brachypelma albopilosa* (Theraphosidae) hemolymph proteome between subadult and adult females. *J. Exp. Zool. A.* (2010) **313**, 651-659.
- [24] Strobel S., Miller H.R., Ferguson A. Human intestinal mucosal mast cells: evaluation of fixation and staining techniques. *J. Clin. Pathol.* (1981) **34**, 851-858.
- [25] Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* (1957) **226**, 497-509.

- [26] Iverson S.J., Oftedal O.T., Bowen W.D., Boness D.J., Sampugna J. Prenatal and postnatal transfer of fatty acids from mother to pup in the hooded seal. *J. Comp. Physiol. B.* (1995) **165**, 1-12.
- [27] Barrachina M.D., Martinez V., Wei J.Y., Tache Y. Leptin-induced decrease in food intake is not associated with changes in gastric emptying in lean mice. *Am. J. Physiol.* (1997) **272**, R1007 -R1011.
- [28] Zhang Y., Guo K.-Y., Diaz P.A., Heo M., Leibel R.L. Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* (2002) **282**, R226 -R234.
- [29] Bado A., Levasseur S., Attoub S., Kermorgant S., Laigneau J.-P., Bortoluzzi M.-N., Moizo L., Lehy T., Guerre-Millo M., Le Marchand-Brustel Y., Lewin M.J. The stomach is a source of leptin. *Nature.* (1998) **394**, 790-793.
- [30] Zhao Z., Sakata I., Okubo Y., Koike K., Kangawa K., Sakai T. Gastric leptin, but not estrogen and somatostatin, contributes to the elevation of ghrelin mRNA expression level in fasted rats. *J. Endocrinol.* (2008) **196**, 529-538.
- [31] Sitaraman S., Liu X., Charrier L., Gu L.H., Ziegler T.R., Gewirtz A., Merlin D.. Colonic leptin: source of a novel pro-inflammatory cytokine involved in inflammatory bowel disease. *FASEB J.* (2004) **18**, 696-698.
- [32] Qi Y., Takahashi N., Hileman S.M., Patel H.R., Berg A.H., Pajvani U.B., Scherer P.E., Ahima R.S. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med.* (2004) **10**, 524-529.
- [33] Lago F., Dieguez C., Gómez-Reino J., Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* (2007) **3**, 716-724.
- [34] Misra M., Miller K.K., Cord J., Prabhakaran R., Herzog D.B., Goldstein M., Katzman D.K., Klibanski A. Relationships between serum adipokines, insulin levels, and bone density in girls with anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2007) **92**, 2046-2052.
- [35] Modan-Moses D., Stein D., Pariente C., Yaroslavsky A., Ram A., Faigin M., Loewenthal R., Yissachar E., Hemi R., Kanety H. Modulation of adiponectin and leptin during refeeding of female anorexia nervosa Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2007) **92**, 1843-1847.
- [36] Ding Y., Lu B., Chen D., Meng L., Shen Y., Chen S. Proteomic analysis of colonic mucosa in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proteomics.* (2010) **10**, 2620-2630.
- [37] Young S.L., Wilson M.J., Miller D., Hillier S. Toward a comprehensive approach to the collection and analysis of pica substances, with emphasis on geophagic materials. *PLoS ONE.* (2008) **3**, e3147.

- [38] Baird J.C., Walz J.Y. The effects of added nanoparticles on aqueous kaolinite suspensions: II. Rheological effects. *J. Colloid and Interface Sci.* (2007) **306**, 411-420.
- [39] Granger D.N., Korthuis R.J., Kvietys P.R., Tso P. Intestinal microvascular exchange during lipid absorption. *Am. J. Physiol.* (1988) **255**, G690 -G695.
- [40] Granger D.N., Perry M.A., Kvietys P.R., Taylor A.E. Permeability of intestinal capillaries: effects of fat absorption and gastrointestinal hormones. *Am. J. Physiol.* (1982) **242**, G194 -G201.
- [41] Tso P., Pitts V., Granger D.N. Role of lymph flow in intestinal chylomicron transport. *Am. J. Physiol.* (1985) **249**, G21 -G28.
- [42] Harrington A.M., Hutson J.M., Southwell B.R. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Progr. Histochem. Cytochem.* (2010) **44**, 173-202.
- [43] Vanner S., Macnaughton W.K. Submucosal secretomotor and vasodilator reflexes. *Neurogastroenterol. Motil.* (2004) **16**, 39-43.
- [44] Grider J.R., Jin J. Distinct populations of sensory neurons mediate the peristaltic reflex elicited by muscle stretch and mucosal stimulation. *J. Neurosci.* (1994) **14**, 2854-2860.
- [45] Wiklund C.U., Wiklund N.P., Gustafsson L.E. Modulation of neuroeffector transmission by endogenous nitric oxide: a role for acetylcholine receptor-activated nitric oxide formation, as indicated by measurements of nitric oxide/nitrite release. *Eur. J. Pharmacol.* (1993) **240**, 235-242.
- [46] Reichardt F., Krueger D., Schemann M. Leptin excites enteric neurons of guinea-pig submucous and myenteric plexus. *Neurogastroenterol. Motil.* (2011) **23**, e165-e170.

Article de recherche E

CONTROLLED INGESTION OF KAOLINITE (5%) MODULATES ENTERIC NITRERGIC INNervation IN RATS

Florian Voinot^{1, 2}, Caroline Fischer^{1, 2}, Camille Schmidt^{1, 2}, Laurence Ehret-Sabatier^{2, 3} and Fabielle Angel^{1, 2}.

¹ Université de Strasbourg, IPHC, 23 rue Becquerel, 67087 STRASBOURG, France.

² CNRS, UMR7178, 67037 Strasbourg, France.

³ Université de Strasbourg, IPHC, 25 rue Becquerel, 67087 STRASBOURG, France.



In revision in *Fundamental & Clinical Pharmacology*.

ABSTRACT

Geophagy is the deliberate ingestion of soil by humans and animals. We have previously shown that kaolinite slowed down gastric emptying and intestinal transit and induced changes in enteric mechanical activities. As gastric emptying and intestinal transit have been shown to be regulated by nitric oxide (NO), the effect of an imposed ingestion of kaolinite (5%) on enteric nitrergic innervation was determined. Kaolinite has also been shown to increase plasmatic levels of leptin. As leptin has been shown to affect neurotransmission of the enteric nervous system (ENS), we determined the responses of enteric neurons in the presence of leptin after kaolinite ingestion and a possible role of nitrergic neurons. Wistar rats were fed with 5% kaolinite in standard food pellets during 14 and 28 days. Organ bath studies were undertaken to evaluate smooth muscle mechanical activities. Our results showed that kaolinite modulates activities of enteric nerves at 14 days of ingestion. Exogenous L-NNA produced a decrease in nerve stimulation (NS)-induced relaxation in both jejunum and colon of control groups. At 14 days of kaolinite ingestion, this effect of L-NNA was significantly reduced only in the jejunum. Although L-NNA did not affect NS-induced contraction in jejunum and colon of control animals, it increased the amplitude of the NS-induced contraction in the colon of rats at 14 days of ingestion. Leptin effects on ENS were also altered at 14 days of ingestion. These differences were antagonized in the presence of L-NNA. Our data give evidence that changes in mechanical activities induced by kaolinite might be due to alterations in nitrergic innervation at 14 days of kaolinite ingestion. Intrinsic primary afferent neurons might be involved. Finally, one cannot exclude the possibility of nitrergic neurons degeneration induced by aluminum within the intestinal tissue and/or to iron deficiency.

KEY WORDS: clay, intestine, colon, smooth muscle contractility, leptin, nitrergic nerves.

INTRODUCTION

Geophagy is the deliberate ingestion of soil by humans and animals [1]. The greater part of geophagic soils is represented by clay minerals, being dominated by kaolinite and smectite [2]. Despite occurring in a wide variety of taxa, geophagy is a poorly understood behavior [3]. In humans, geophagy has been observed in many parts of the world but is especially widespread in sub-Saharan Africa where clay is mostly consumed by pregnant or breast-feeding women [4]. Various hypotheses on geophagy have been forwarded. The question is to decipher whether clay consumption is beneficial to health or not. As far as the benefits are considered, clay may be involved in (1) detoxification of noxious or unpalatable compounds present in the diet, (2) alleviation of gastrointestinal (GI) upsets such as diarrhea, (3) supplementation of the body with minerals and (4) alleviation of hyperacidity in the digestive tract [5]. Indeed, geophagy has been shown to be a response to GI distress, relieving GI upset such as diarrhea (by reducing rapid passage of fluids) and gastroesophageal reflux (by increasing gut pH), reducing inflammation, preventing nausea, discomfort and vomiting in humans as well as reducing GI disturbances induced by neoplastic drug (cisplatin) in rats [6–10]. These positive effects are probably due to the ability for clays to either bind pathogens and toxins directly or to bind with glycoproteins in the intestinal mucosa, thereby preventing the passage of toxic substances into the organism and modifying the composition of intestinal mucus in order to reinforce the mucosal barrier [3,11–13]. That is why a number of clays are efficacious at treating digestive problems in humans, e.g. kaolinite and smectite are the active ingredient of Kaopectate® and Smecta® respectively, which have the ability to cure diarrhea and upset stomach [14–17].

Kaolinite has previously been shown to interact with the GI tract when imposed or spontaneously ingested [18,19]. In these conditions, kaolinite lead to changes in the expression of mucosal proteins involved in various biological processes, gut morphology as well as in nutrient and water absorption. Furthermore, kaolinite has been shown to slow down gastric emptying and intestinal transit in rats *in vivo* [20]. Gut motility and events leading to transit disorders such as diarrhea and constipation are largely mediated by the enteric nervous system [21,22]. We previously showed that kaolinite induced changes in spontaneous mechanical activity and mechanical responses to electrical nerve stimulation [19]. Thus, we

suggested that kaolinite might induce a mechanical adaptation to changes in viscosity of intraluminal content through excitatory enteric neurons. However, inhibitory neurons may also be involved, as gastric emptying and intestinal transit have been shown to be regulated by the neurotransmitter nitric oxide (NO) [23,24].

Furthermore, kaolinite has been shown to induce an increase in food intake during the first and second week of ingestion [19]. This hyperphagia may be the cause of the increase in plasmatic levels of leptin. Indeed, leptin is an adipokine which plays a major role in the regulation of metabolism, food intake and energy balance [25–27]. It promotes stable body weight and fat stores despite irregular food intake [28]. Recently, leptin has been shown to affect neurotransmission of the enteric nervous system (ENS) [29], indicating a possible effect on GI mechanical activities.

Therefore, the first aim of our work was to evaluate the impact of an imposed ingestion of kaolinite (5%) on enteric nitrergic innervation. The second aim was to determine whether the responses of enteric neurons in the presence of leptin were altered after kaolinite ingestion. Finally, a possible role of nitrergic neurons in the effect of leptin was investigated. This work was undertaken using an *in vitro* organ bath technique associated with pharmacological tools.

MATERIAL AND METHODS

Animals and technique

The procedure was identical to those published previously [19]. Briefly, 45 male Wistar rats (250-275 g; Charles River Laboratories, Lyon, France) were housed individually in a controlled environment at an ambient temperature of 24 ± 2 °C and under a 12 h light/dark cycle (lights on 07.00 am). They had *ad libitum* access to food (standard low-fat diet A03, SAFE, Augy, France) and tap water to limit stress effects, until they reached 300 ± 5 g that is nearly one week. After this week of acclimatization, remaining food (A03) was removed and replaced by experimental pellets: (i) 15 control rats were fed with standard pellets (standard low-fat diet A03, SAFE, Augy, France), and (ii) 30 kaolinite rats were fed with pellets containing, by mass, 5% of kaolinite (Argiletz, Lizy-sur-Ourcq, France). Each diet was obtained from SAFE. Animals have *ad libitum* access to experimental food and tap water and were given fresh food once a day. After 14 and 28 days of the experimental diet,

kaolinite rats (noted Kaol14 and Kaol28), were anaesthetized with isoflurane 2% and were euthanatized by decapitation. Control rats were euthanatized at 25 ± 3 days of experiment (noted NF: normally fed).

The jejunum and proximal colon were removed and placed onto an ice-cold plate, where tissue sections were made before being transferred in a Petri dish containing a physiological Krebs solution (in mM: 119.8 NaCl, 16.2 C₆H₁₂O₆, 15.5 NaHCO₃, 5.8 KCl, 2.5 CaCl₂·H₂O, 2.0 NaH₂PO₄·H₂O, 1.2 MgCl₂·H₂O, pH 7.4). The segments were rinsed of intraluminal content. Then, strips of longitudinal smooth muscle (10x5 mm) from jejunum (LMJ) without mucosa and strips of circular muscle (3 mm) from intact proximal colon (CMC) were mounted in organ bath chambers containing 10 ml of warmed (37 °C) and gassed (95% O₂, 5% CO₂) Krebs solution. Smooth muscle mechanical activities of jejunum and proximal colon were measured by means of an isometric force transducer (Fort25, WPI, Aston, UK) and amplifier (Lab-Trax-4/24T, WPI, Aston, UK) and were visualized using a computer (HP Compaq 8000, Hewlett-Packard, USA). Electrical nerve stimulation (NS) was applied via two steel electrodes, placed 10 mm apart. Square wave pulses of 15 V intensity, 10 Hz frequency and 200 μs duration, during 10 s period of time, were used. The stimulator was designed by the Metrology and Instrumentation in Biology and Environment (MIBE department: IPHC, CNRS, Strasbourg, France).

Animal care was provided according to protocols and guidelines approved by the Animal Care and Ethic Committee (CREMEAS #AL/06/25/12/09) approved by the National Research Ministry.

Experimental design

At the beginning of each experiment, muscle strips were stretched to their optimal resting tension. This was achieved by step-wise increases in tension until the spontaneous mechanical activities (basal tone and spontaneous rhythmic contractions, noted SMA) and the contractile responses to NS were stable. Strips were allowed to equilibrate for 60 min whereupon the responses induced by NS and the effects of various pharmacological agents were investigated. Bath solution was replaced every 30 minutes.

In a first series of experiments NG-nitro-L-arginine (L-NNA), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, was added to the bath and its pharmacological effects on responses to NS were characterized after 10 minutes and compared between groups. In a second series of experiments, the effects of leptin on responses to NS were evaluated 10 minutes after its

addition into the organ bath. Finally, the effects of leptin were studied in the presence of exogenous L-NNA. This substance was administered 10 min before application of leptin. After each experiment, tissues were washed out by replacing the bath solution several times with fresh Krebs solution and muscle strips were allowed to equilibrate for 30 minutes. Recovery of smooth muscle strips was regularly verified by stimulating intramural nerves. At the end of the experiment, the jejunal and colonic segments were weighted.

Drugs

The drugs used (concentrations as well as respective suppliers are given in parentheses) were L-NNA (0.1mmol L⁻¹; Tocris Bioscience, Bristol, UK) and human leptin (22-56) (0.1 µmol.L⁻¹; Polypeptide Laboratories, Strasbourg, France). These substances were dissolved in distilled water.

Data analysis

Analysis was performed using Datatrax (Datatrax 2.0, WPI, Aston, UK). NS always induced, in LMJ and in CMC, a biphasic mechanical response, characterised by a relaxation R followed by an off-contraction C (*Figure 1*). The parameters of the NS-induced response were measured as the area under the curve (in gram per second per milligram of fresh tissue: g/s/mg; *Figure 1*). The effects of the pharmacological agents were measured as the percent increase or decrease in basal tone or in basal area under the curve for NS responses. Data were expressed as the mean ± SEM. The number of animals which provided interpretable data is noted n.

Statistical analysis was carried out using R (R Foundation, Vienna, Austria). The effect of the drug was evaluated by paired t-test since each muscle strip was considered as its own control. Differences between groups and between drugs were evaluated using ANOVA followed by Tukey multiple comparisons tests with Holm correction for multiple comparisons. Differences were considered significant at P < 0.05 (noted *).

RESULTS

Mechanical responses of jejunum and proximal colon to electrical NS

NS induced a biphasic mechanical response characterised by a relaxation R followed by an off-contraction C (*Figure 1; Table I*) in both LMJ and CMC. In Kaol14 group (n=12),

NS-induced relaxation in CMC (CMC-R) and NS-induced contraction in LMJ (LMJ-C) were significantly reduced ($p < 0.05$), whereas NS-induced relaxation in LMJ (LMJ-R) and NS-induced contraction in CMC (CMC-C) were not significantly changed compared to NF group ($p > 0.05$; *Table 1*). In Kaol28 group, these NS-induced responses were not modified compared to NF group ($p > 0.05$; *Table 1*).

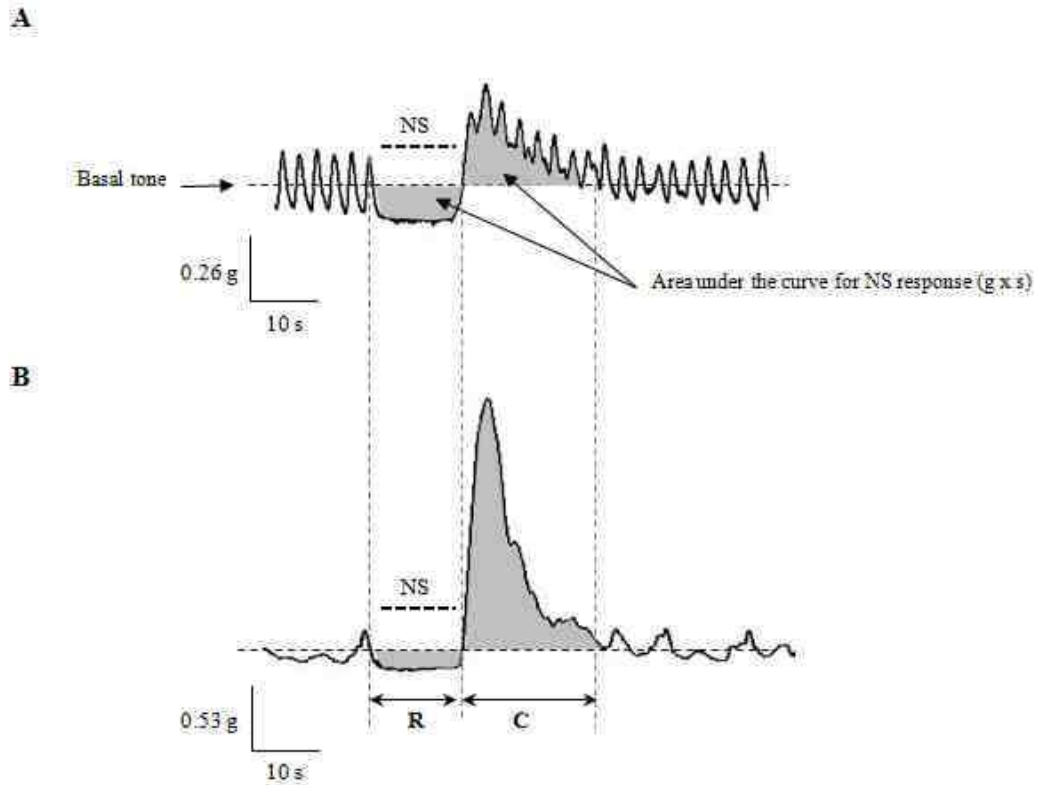


Figure 1: Parameters studied in normally fed rat muscle preparations in response to electrical nerve stimulation (NS). **A** Longitudinal muscle from jejunum and **B** circular muscle from proximal colon developed mechanical responses to NS composed of a relaxation (R) followed by an off-contraction (C).

Tissue	Group	Mechanical response to ENS	
		Rarea (U/mg)	Carea (U/mg)
LMJ	NF	0.31 ± 0.05	0.88 ± 0.14 ^a
	Kaol14	0.22 ± 0.03	0.46 ± 0.05 ^b
	Kaol28	0.27 ± 0.04	0.92 ± 0.16 ^a
CMC	NF	0.29 ± 0.02 ^a	2.91 ± 0.28 ^a
	Kaol14	0.13 ± 0.03 ^b	2.00 ± 0.32 ^b
	Kaol28	0.26 ± 0.05 ^a	3.43 ± 0.52 ^a

Table 1: Characteristics of mechanical response to electrical nerve stimulation (NS) of rat longitudinal muscle from jejunum (LMJ) and circular muscle from proximal colon (CMC) in normally fed (NF), kaolinite 14 (Kaol14) and kaolinite 28 (Kaol28) groups. Mechanical response to NS could be divided in relaxation (R) and off-contraction (C). See Figure 1 for details. Data are mean ± SEM. Values sharing common letters (a,b) are not significantly different ($P > 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey test.

Effects of kaolinite ingestion on nerves responses

In NF group (n=7 LMJ; n=7 CMC), exogenous L-NNA (0.1mmol L^{-1}) induced a significant decrease ($p<0.05$; *Figure 2*) in LMJ-R ($-54 \pm 11\%$) and CMC-R ($-65 \pm 11\%$) whereas it had no effect ($p>0.05$) on LMJ-C ($-12 \pm 9\%$) or CMC-C ($-21 \pm 8\%$). In Kaol14 group (n=6 LMJ; n=9 CMC), only the effects of L-NNA on LMJ-R ($-21 \pm 11\%$) were significantly reduced ($p<0.05$; *Figure 2*) compared to NF group. Furthermore, in Kaol14 group, L-NNA induced an increase ($p<0.05$) in CMC-C ($+14 \pm 9\%$) which was not observed in NF group. Finally, in Kaol28 group (n=5 LMJ; n=9 CMC), L-NNA induced no significant variation in NS components when compared to NF group ($p>0.05$).

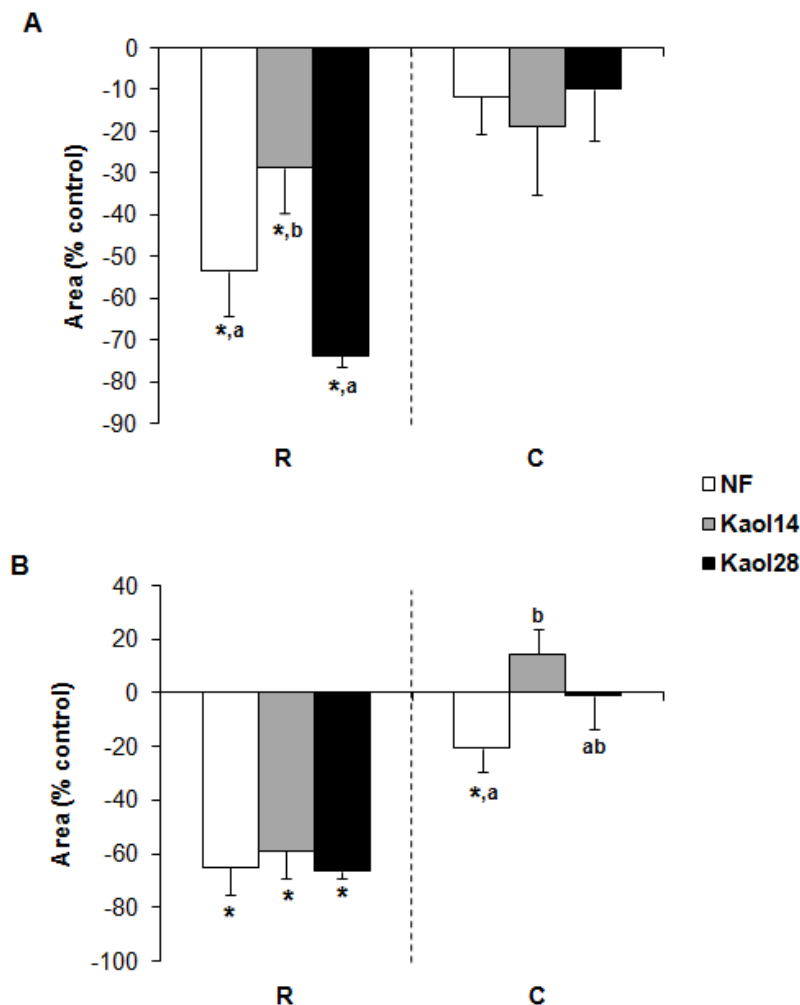


Figure 2: Effects of NG-nitro-L-arginine (L-NNA, 0.1 mM) on mechanical responses to electrical nerve stimulation of **A** longitudinal muscle from jejunum and **B** circular muscle from proximal colon in normally fed rats (NF) and rats fed with 5% kaolinite either for 14 (Kaol14) or 28 days (Kaol28). 0% indicates the level of control responses. *different from control responses ($p<0.05$) using paired Student t-test. Values sharing common letters (a,b) are not significantly different ($p>0.05$) using one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test.

Previous experiments in our laboratory (manuscript in revision) have shown that exogenous leptin is able to modulate nitrergic nerve activities through nicotinic receptors. Therefore, the effects of leptin alone or in the presence of L-NNA on NS-induced mechanical responses were evaluated.

Effects of kaolinite ingestion on leptin-induced variations of mechanical responses to electrical transmural NS in jejunum and proximal colon

In NF control group (n=8 LMJ; n=10 CMC), exogenous leptin (0.1 μ M) induced a significant decrease ($p < 0.05$; *Figure 3*) in LMJ-R ($-17 \pm 4\%$), CMC-R ($-13 \pm 4\%$) and LMJ-C ($-32 \pm 7\%$) whereas it has no significant effect ($p > 0.05$) on CMC-C ($-4 \pm 5\%$). In Kaol14 group (n=8 LMJ; n=8 CMC), the effects of leptin on LMJ-R ($+3 \pm 8\%$) and LMJ-C ($-4 \pm 9\%$) were abolished ($p < 0.05$) when compared to NF group. Furthermore, leptin induced a significant increase in CMC-C ($+22 \pm 9\%$). In Kaol28 group (n=10 LMJ and CMC), only the effects of leptin on LMJ-C ($+4 \pm 7\%$) were abolished ($p < 0.05$) when compared to NF group.

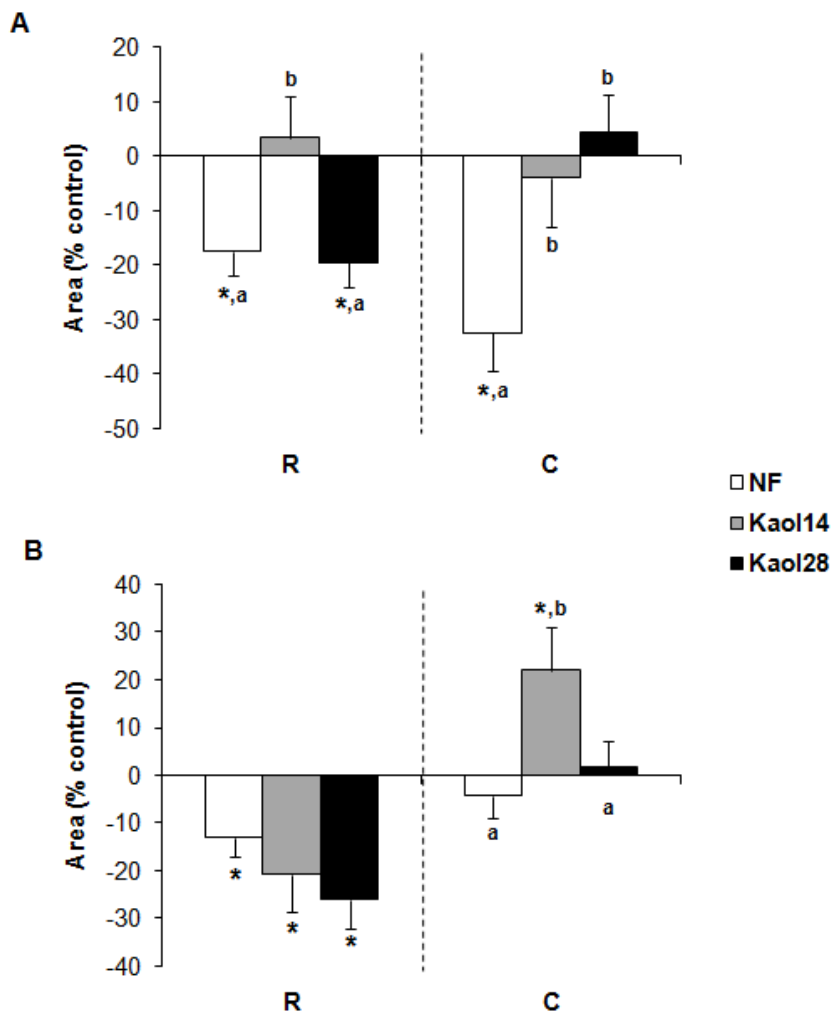


Figure 3: Effects of leptin (0.1 μ M) on mechanical responses to electrical nerve stimulation of **A** longitudinal muscle from jejunum and **B** circular muscle from proximal colon in normally fed rats (NF) and rats fed with 5% kaolinite either for 14 (Kaol14) or 28 days (Kaol28). 0% indicates the level of control responses. *different from control responses ($p < 0.05$) using paired Student t-test. Values sharing common letters (a,b) are not significantly different ($p > 0.05$) using one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test.

Effects of kaolinite ingestion on leptin effects in the presence of L-NNA in jejunum and proximal colon

Whatever the group, the values obtained with leptin in the presence of L-NNA were not significantly different from those with L-NNA alone ($p > 0.05$, *Figure 4*). Leptin in the presence of L-NNA induced a significant decrease ($p < 0.05$) in LMJ-R and CMC-R in NF group ($-60 \pm 9\%$, $n=7$ and $-77 \pm 11\%$, $n=7$ respectively) as well as in Kaol14 ($-36 \pm 6\%$, $n=6$ and $-76 \pm 7\%$, $n=9$ respectively) and in Kaol28 group ($-80 \pm 8\%$, $n=5$ and $-81 \pm 3\%$, $n=9$ respectively) whereas it had no effect either on LMJ-C or on CMC-C ($p > 0.05$). Moreover, the differences between groups observed in the presence of L-NNA were identical to those observed in the presence of L-NNA and leptin together ($p < 0.05$).

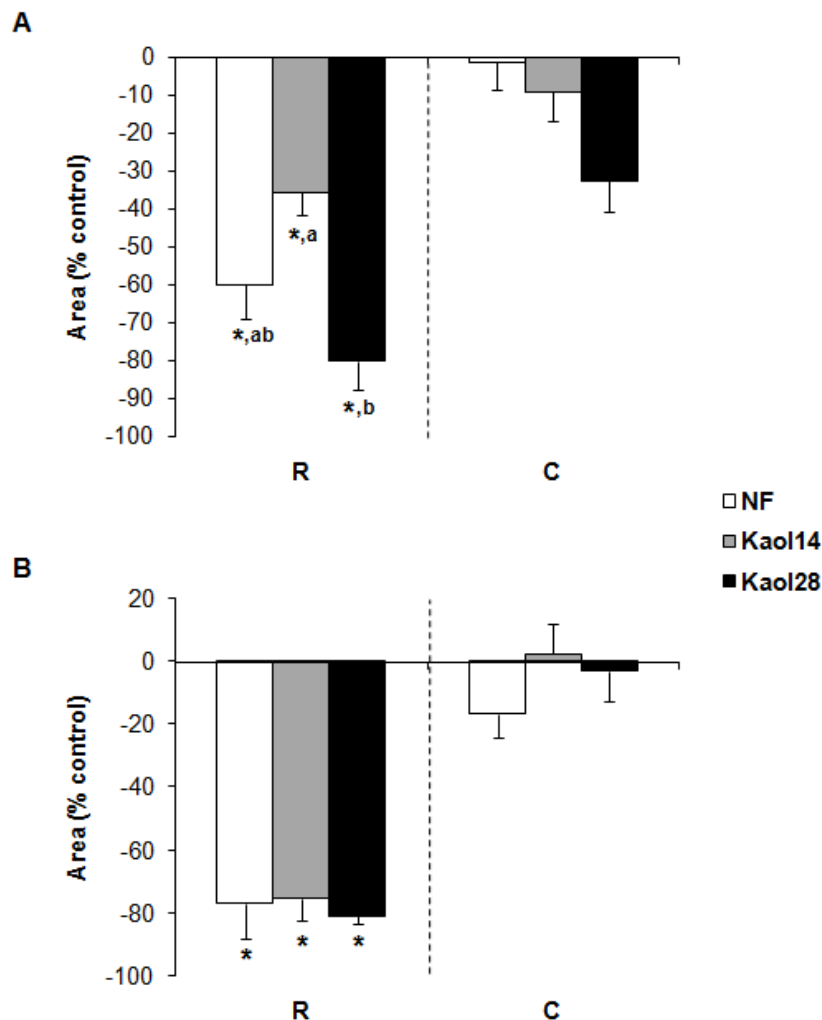


Figure 4: Effects of leptin (0.1 μ M) in the presence of NG-nitro-L-arginine (L-NNA, 0.1 mM) on mechanical responses to electrical nerve stimulation of **A** longitudinal muscle from jejunum and **B** circular muscle from proximal colon in normally fed rats (NF) and rats fed with 5% kaolinite either for 14 (Kaol14) or 28 days (Kaol28). 0% indicates the level of control responses. *different from control responses ($p < 0.05$) using paired Student t-test. Values sharing common letters (a,b) are not significantly different ($p > 0.05$) using one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test.

DISCUSSION

Our data indicate that kaolinite may modulate activities of enteric nerves at 14 days of imposed ingestion. These data emphasized our previous results which indicated that spontaneous mechanical activities were depressed in both jejunum and proximal colon and that the tone increase was enhanced in the presence of acetylcholine in jejunum at 14 days of kaolinite ingestion in rats [19]. Furthermore, we showed that the decrease of the relaxation induced by L-NNA was significantly reduced in the jejunum whereas the contraction was enhanced in the proximal colon at 14 days of kaolinite ingestion. Moreover, leptin effects on ENS were altered at 14 days of ingestion. These differences were antagonized in the presence of L-NNA. NO is the major relaxant of GI smooth muscle through the activation of neuronal NOS [30]. Three isoforms of NOS have been identified: neuronal NOS (nNOS) and endothelial NOS (eNOS) are calmodulin-dependent constitutive enzymes which are involved in smooth muscle and vascular relaxation [31,32], while inducible NOS (iNOS) is calcium-insensitive and is induced in response to inflammation [33]. However, in the present work, inflammation was not observed (unpublished data). Furthermore, the inhibitory relaxant muscle responses to NO donors have been shown to be prevented by L-NNA which is a non-selective NOS inhibitor [34].

NO plays a crucial role in non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat GI tract [35]. In particular, stimulation of inhibitory motor neurons by NS causes the release of NO in rat colon [31–33]. NOS inhibitors block the inhibition of spontaneous mechanical activity induced by NS in rat isolated small intestine [36] as well as the relaxation and the off-contraction observed at the end of the stimulus in rat colon [33]. Furthermore, Habold *et al.* (2009) have shown that kaolinite ingestion slowed down gastric emptying and intestinal transit [20]. The enteric nitrergic innervation has been shown to be partly involved in the regulation of these parameters. Indeed, NOS inhibitors induced delayed gastric emptying [37], reversed acceleration of intestinal transit induced by endotoxemia [38] and reduced colonic transit by inhibiting descending relaxation in rats [39]. Thus, kaolinite ingestion may induce an alteration in activities of enteric nitrergic neurons.

Several hypotheses may explain the effects of kaolinite ingestion on mechanical activity and regulation by enteric nitrergic nerves.

Because of the strong bonding, kaolinite does not exhibit swelling in water [40]. However, it has a high capacity of absorption [41] and forms an adherent coating to the

mucous membrane of the GI tract [41,42]. It also eliminates enzymes and other nutritive elements [41]. As kaolinite in the GI tract has the ability to change both the chemicals in the lumen and the mechanical stimulation of the mucosa, afferent neurons may respond directly to these signals induced by clay and finally modulate the expression of nitrergic neurons. Indeed, some inputs from intrinsic primary afferent nerves (IPANs) to NOS-immunoreactive neurons have been shown to occur in the myenteric plexus of guinea pig ileum [43]. Thus, the differences in the responses to leptin observed in jejunum and colon may be explained by the regional differences existing in enteric nerve circuitry [44]. Furthermore, kaolinite binds the intestinal mucus, whereas it concentrates within the feces and the colonic lumen (unpublished data), probably affecting differently afferent receptors of the mucosa.

As we have previously shown that kaolinite induces an increase in food intake and in plasmatic levels of leptin at 14 days of ingestion [19], leptin may be involved in the changes in mechanical activities and enteric nerves activities. Indeed, leptin has been shown to activate guinea-pig colonic submucosal and myenteric plexus [29] and to modulate enteric neurotransmission in rat colon and particularly nitrergic neurotransmission (unpublished data). The modulation of leptin effects on ENS seems, at least partially, to be due to alteration in nitrergic innervation after two weeks, suggesting a transitory effect of kaolinite ingestion on enteric nerves and mechanical activities. If changes in intestinal and colonic mechanical activities are due to the effects of endogenous leptin, it is not surprising that these effects occur at day 14, when leptin plasmatic levels have been shown to be increased [19]. However, the question remains about the apparent adaptive phenomenon after two weeks of kaolinite ingestion. One hypothesis might be the plasticity of the enteric nervous system. This latter point has, nevertheless, to be further investigated.

One last hypothesis is that kaolinite ingestion induces changes in GI mechanical activities and enteric nerves activities through non-beneficial effects. The negatively charged surface of kaolinite is able to exchange and adsorb cations (for example Fe^{2+} and Fe^{3+}) in the duodenum where iron absorption occurs. As a consequence, iron deficiency anemia may be associated with the ingestion of kaolinite [45]. Iron-containing heme is known to be a cofactor of the NOS, the enzyme responsible for NO production [46]. Therefore, it has been demonstrated that iron deficiency leads to a decrease in NS-induced relaxation suggesting a suppression of NOS activity in prairie dogs ileum [47]. Furthermore, aluminum from ingested kaolinite and present in the mucus layer may cross the intestinal mucosa and the enterocytes, reach the general circulation and may be stocked in various organs, such as brain, liver and

kidneys [18,48,49]. Aluminum administration has been shown to lead to motor neuron degeneration and to significant changes in neuronal NOS in the CNS [50,51]. Thus, aluminum transfer from kaolinite to GI layers might explain the alteration of nitrergic neurons in the ENS. However, as the effects of kaolinite at 28 days have not been observed, more research is needed to ascertain the underlying explanation for this in the context of non-beneficial effects.

In conclusion, kaolinite ingestion induced some changes in jejunal and proximal colonic mechanical activities. These alterations might be due to alterations of nitrergic nerve activities at 14 days of kaolinite ingestion. As leptin seems to exert its effect through nitrergic neurons, the consequence may be the suppression of leptin effects at 14 days of kaolinite ingestion. This study gives new evidences that kaolinite modulates intestinal mechanical activities. That could explain why kaolinite has been used combined with other compounds to treat enteric infections (Kaopectate ®), even if its action remains controversial [52]. Moreover, the alteration of leptin effect on enteric neurons may participate to the satiety signal alteration that lead to hyperphagia in rats fed with kaolinite. Therefore, kaolinite complementation might be used to induce food intake in feeding behavior pathologies such as anorexia. One question nevertheless arose from these data is the temporary effect of kaolinite ingestion since the described effects disappeared at 28 days, that may express adaptive or compensatory phenomenon.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank the Department of Metrology and Instrumentation for Biology and Environment (MIBE) of the IPHC for electronic equipment, development and maintenance; Nicolas Chatelain for assistance in electrophysiological instrumentation and Aurélie Hranitsky for animal care. Financial support for this study was provided by the French Agence Nationale pour la Recherche (program ANR-08-BLAN-0196) and the French Ministère de la Recherche.

REFERENCES

- [1] Klein N., Fröhlich F., Krief S. Geophagy: soil consumption enhances the bioactivities of plants eaten by chimpanzees. *Naturwissenschaften*. (2008) **95** 325-331.
- [2] Brand C.E., De Jager L., Ekosse G.I. Possible health effects associated with human geophagic practise: an overview. *Medical Technology SA*. (2009) **23** 11-13.
- [3] Ghorbani H. Geophagia, a soil-environmental related disease. *International Meeting on Soil Fertility Land Management and Agroclimatology*. (2008) 957-967.
- [4] Kutalek R., Wewalka G., Gundacker C., Auer H., Wilson J., Haluza D., et al. Geophagy and potential health implications: geohelminths, microbes and heavy metals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. (2010) **104** 787-795.
- [5] Wilson M.J. Clay mineralogical and related characteristics of geophagic materials. *J. Chem. Ecol.* (2003) **29** 1525-1547.
- [6] Morgan R. Pica. *J. R. Soc. Med.* (1984) **77** 1052 -1054.
- [7] Madkour A.A., Madina E.M., el-Azzouni O.E., Amer M.A., el-Walili T.M., Abbass T. Smectite in acute diarrhea in children: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (1993) **17** 176-181.
- [8] González R., Sánchez de Medina F., Martínez-Augustin O., Nieto A., Gálvez J., Risco S., et al. Anti-inflammatory effect of diosmectite in hapten-induced colitis in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* (2004) **141** 951-960.
- [9] Cabezos P.A., Vera G., Martín-Fontelles M.I., Fernández-Pujol R., Abalo R. Cisplatin-induced gastrointestinal dysmotility is aggravated after chronic administration in the rat. Comparison with pica. *Neurogastroenterol. Motil.* (2010) **22** 797-805, e224-225.
- [10] Young S.L., Khalfan S.S., Farag T.H., Kavle J.A., Ali S.M., Hajji H., et al. Association of pica with anemia and gastrointestinal distress among pregnant women in Zanzibar, Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2010) **83** 144-151.
- [11] Fioramonti J., Droy-Lefaix M.T., Buéno L. Changes in gastro-intestinal motility induced by cholera toxin and experimental osmotic diarrhoea in dogs: effects of treatment with an argillaceous compound. *Digestion*. (1987) **36** 230-237.
- [12] Dupont C., Moreno J.L., Barau E., Bargaoui K., Thiane E., Plique O. Effect of diosmectite on intestinal permeability changes in acute diarrhea: a double-blind placebo-controlled trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (1992) **14** 413-419.
- [13] Dominy N.J., Davoust E., Minekus M. Adaptive function of soil consumption: an in vitro study modeling the human stomach and small intestine. *J. Exp. Biol.* (2004) **207** 319-324.

- [14] Beck I.T., Jenkins N., Thurber L., Ambrus J.L. Methods for the study of antidiarrheal agents. Study of commonly used protective and adsorbent agents. *J. Med.* (1977) **8** 135-158.
- [15] Leber W. A new suspension form of smectite (Liquid « Diasorb ») for the treatment of acute diarrhoea: a randomized comparative study. *Pharmatherapeutica.* (1988) **5** 256-260.
- [16] Guarino A., Bisceglia M., Castellucci G., Iacono G., Casali L.G., Bruzzese E., et al. Smectite in the treatment of acute diarrhea: a nationwide randomized controlled study of the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) in collaboration with primary care pediatricians. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2001) **32** 71-75.
- [17] Slamova R., Trckova M., Vondruskova H., Zraly Z., Pavlik I. Clay minerals in animal nutrition. *Applied Clay Science.* (2011) **51** 395-398.
- [18] Reichardt F., Habold C., Chaumande B., Ackermann A., Ehret-Sabatier L., Le Maho Y., et al. Interactions between ingested kaolinite and the intestinal mucosa in rat: proteomic and cellular evidences. *Fund. Clin. Pharmacol.* (2009) **23** 69-79.
- [19] Voinot F., Fischer C., Bœuf A., Schmidt C., Delval-Dubois V., Reichardt F., et al. Effects of controlled ingestion of kaolinite (5%) on food intake, gut morphology and in vitro motility in rats. *Fund. Clin. Pharmacol.* Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-8206.2011.00978.x/abstract>
- [20] Habold C., Reichardt F., Le Maho Y., Angel F., Liewig N., Lignot J.-H., et al. Clay ingestion enhances intestinal triacylglycerol hydrolysis and non-esterified fatty acid absorption. *Brit. J. Nutr.* (2009) **102** 249.
- [21] Wood J.D. Enteric nervous system: sensory physiology, diarrhea and constipation. *Curr. Opin. Gastroenterol.* (2010) **26** 102-108.
- [22] Furness J.B. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroent. Motil.* (2008) **20** 32-38.
- [23] De Winter B.Y., Bredenoord A.J., De Man J.G., Moreels T.G., Herman A.G., Pelckmans P.A. Effect of inhibition of inducible nitric oxide synthase and guanylyl cyclase on endotoxin-induced delay in gastric emptying and intestinal transit in mice. *Shock.* (2002) **18** 125-131.
- [24] Orihata M., Sarna S.K. Inhibition of nitric oxide synthase delays gastric emptying of solid meals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1994) **271** 660-670.
- [25] Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* (1994) **372** 425-432.

- [26] Pellemounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B., Hecht R., Winters D., Boone T., et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. (1995) **269** 540-543.
- [27] Barbier M., Attoub S., Galmiche J.P. La leptine : aspects physiologiques et implications en Hépatogastroentérologie. *Gastroenterol. Clin. Biol.* (2000) **24** 509-519.
- [28] Zhang Y., Guo K.-Y., Diaz P.A., Heo M., Leibel R.L. Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am. J. Physiol.-Reg. I.* (2002) **282** R226 -R234.
- [29] Reichardt F., Krueger D., Schemann M. Leptin excites enteric neurons of guinea-pig submucous and myenteric plexus. *Neurogastroent. Motil.* (2011) **23** e165-e170.
- [30] Shah V., Lyford G., Gores G., Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. (2004) **126** 903-913.
- [31] Zhou L., Zhu D.-Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*. (2009) **20** 223-230.
- [32] Sessa W.C. eNOS at a glance. *J. Cell. Sci.* (2004) **117** 2427-2429.
- [33] Dijkstra G., van Goor H., Jansen P.L.M., Moshage H. Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. (2004) **5** 529-536.
- [34] Tanović A., Jiménez M., Fernández E. Actions of NO donors and endogenous nitrenergic transmitter on the longitudinal muscle of rat ileum in vitro: mechanisms involved. *Life Sci.* (2001) **69** 1143-1154.
- [35] Toda N., Herman A.G. Gastrointestinal function regulation by nitrenergic efferent nerves. *Pharmacol. Rev.* (2005) **57** 315 -338.
- [36] Kaputlu I., Sadan G. Evidence that nitric oxide mediates non-adrenergic non-cholinergic relaxation induced by GABA and electrical stimulation in the rat isolated duodenum. *J. Auton. Pharmacol.* (1996) **16** 177-182.
- [37] Plourde V., Quintero E., Suto G., Coimbra C., Taché Y. Delayed gastric emptying induced by inhibitors of nitric oxide synthase in rats. *Eur. J. Pharmacol.* (1994) **256** 125-129.
- [38] Wirthlin D.J., Cullen J.J., Spates S.T., Conklin J.L., Murray J., Caropreso D.K., et al. Gastrointestinal transit during endotoxemia: the role of nitric oxide. *J. Surg. Res.* (1996) **60** 307-311.
- [39] Mizuta Y., Takahashi T., Owyang C. Nitrenergic regulation of colonic transit in rats. *Am. J. Physiol.-Gastr. L.* (1999) **277** G275-G279.
- [40] Reddi L.N., Inyang H.I. *Geoenvironmental engineering: principles and applications*. CRC Press; 2000.

- [41] Carretero M.I. Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review. *Applied Clay Science*. (2002) **21** 155-163.
- [42] Walker R.R. Kaolin in the treatment of asiatic cholera: its action and uses. *Proc. R. Soc. Med.* (1921) **14** 23-29.
- [43] Li Z.S., Furness J.B. Inputs from intrinsic primary afferent neurons to nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of guinea pig ileum. *Cell Tissue Res.* (2000) **299** 1-8.
- [44] Furness J.B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* (2012) **9** 286-294.
- [45] Garnier C. von, Stünitz H., Decker M., Battegay E., Zeller A. Pica and refractory iron deficiency anaemia: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. (2008) **2** 324.
- [46] Klatt P., Pfeiffer S., List B.M., Lehner D., Glatter O., Bächinger H.P., et al. Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* (1996) **271** 7336-7342.
- [47] Goldblatt M.I., Choi S.H., Swartz-Basile D.A., Nakeeb A., Sarna S.K., Pitt H.A. Iron deficiency suppresses ileal nitric oxide synthase activity. *J. Gastrointest. Surg.* (2001) **5** 393-399; discussion 399-400.
- [48] Whitehead M.W., Farrar G., Christie G.L., Blair J.A., Thompson R.P., Powell J.J. Mechanisms of aluminum absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* (1997) **65** 1446-1452.
- [49] Mahieu S.T., Gionotti M., Millen N., Elías M.M. Effect of chronic accumulation of aluminum on renal function, cortical renal oxidative stress and cortical renal organic anion transport in rats. *Arch. Toxicol.* (2003) **77** 605-612.
- [50] Cucarella C., Montoliu C., Hermenegildo C., Sáez R., Manzo L., Miñana M., et al. Chronic exposure to aluminum impairs neuronal glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway. *J. Neurochem.* (1998) **70** 1609-1614.
- [51] Shaw C.A., Petrik M.S. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J. Inorg. Biochem.* (2009) **103** 1555-1562.
- [52] McMahan Z.H., Dupont H.L. Review article: the history of acute infectious diarrhoea management – from poorly focused empiricism to fluid therapy and modern pharmacotherapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2007) **25** 759–769.



Florian VOINOT



Axe cerveau-intestin et contrôle de la prise alimentaire : exemple d'altérations chez un modèle animal de schizophrénie

Résumé

L'axe cerveau-intestin désigne l'interaction bidirectionnelle entre le cerveau et le tube digestif. Bien que la leptine, hormone produite par le tissu adipeux, participe à la régulation de cet axe, son mode d'action dans le système nerveux entérique a été peu étudié. A l'heure actuelle, une relation étroite entre une perturbation de l'axe cerveau-intestin et la schizophrénie est supposée. Par conséquent, les objectifs de ce travail étaient d'évaluer 1) les effets *ex vivo* de la leptine dans la neurotransmission entérique chez le rat et 2) les altérations périphériques dans un modèle neurodéveloppemental de la schizophrénie (NVHL) chez le rat. Nous avons montré que la leptine module l'activité des neurones entériques inhibiteurs et excitateurs dans le jéjunum et le côlon proximal. L'implication des neurones afférents primaires intrinsèques a été discutée. Chez les rats NVHL, nous avons mis en évidence une réduction de la masse corporelle, des variations hormonales, une inflammation du jéjunum et des altérations motrices digestives. La relation entre les troubles périphériques, notamment vagues, et la physiopathologie de la schizophrénie a été discutée.

Axe cerveau-intestin, leptine, système nerveux entérique, schizophrénie, inflammation, fonctions gastro-intestinales, nerf vague.

Résumé en anglais

The brain-gut axis refers to the bidirectional interaction between the gut and the brain. Although leptin, a hormone released from fat tissue, is involved in the brain-gut axis control, its mechanism of action in the enteric nervous system has not been studied so far. Nowadays, brain-gut axis dysfunctions are supposed to be in close connection with schizophrenia. Therefore, the goals of this work were to determine 1) the effects of leptin on rat enteric nervous system neurotransmission and 2) peripheral alterations in the NVHL neurodevelopmental rat model of schizophrenia. We showed that leptin modulates inhibitory and excitatory enteric motor neurons activity in jejunum and proximal colon. Implication of intrinsic primary afferent neurons was discussed. In NVHL rats, we showed a decrease in body mass, some hormonal variations, jejunal inflammation and gastro-intestinal mechanical activities alterations. The relation peripheral alterations, like vagus nerve dysfunction, and the physiopathology of schizophrenia was discussed.

Brain-gut axis, leptin, enteric nervous system, schizophrenia, inflammation, gastrointestinal functions, vagus nerve.