

Impact de la nutrition périnatale sur la santé intestinale

Delphine Ley

▶ **To cite this version:**

Delphine Ley. Impact de la nutrition périnatale sur la santé intestinale. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. ⟨NNT : 2017LIL2S051⟩. ⟨tel-01787682⟩

HAL Id: tel-01787682

https://theses.hal.science/tel-01787682v1

Submitted on 7 May 2018

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.



HAL Authorization

UNIVERSITÉ LILLE 2 DROIT ET SANTÉ

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ – LILLE 2

Discipline : Biologie – Santé

présentée par

Delphine LEY

Impact de la nutrition périnatale sur la santé intestinale

dirigée par

le Professeur Frédéric GOTTRAND

Soutenue publiquement le 21 septembre 2017 devant le jury composé de :

Madame le Docteur Corinne GOWER - ROUSSEAU	Examinateur
Monsieur le Professeur Dominique DARMAUN	Rapporteur
Monsieur le Professeur Umberto SIMEONI	Rapporteur
Monsieur le Professeur Frédéric GOTTRAND	Examinateur, Directeur de thèse

Ce travail a été réalisé au sein du Centre de Recherche LIRIC UMR 995, dirigé par le Professeur Pierre Desreumaux, dans l'équipe « Modulations nutritionnelles de l'inflammation et de l'infection » dirigée par le Professeur Frédéric Gottrand.

LIRIC – UMR 995 Inserm / Université Lille 2 / CHRU de Lille

Faculté de Médecine – Pôle Recherche

1 place de Verdun

59045 Lille Cedex

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Département de Biologie intestinale et de Microbiologie du groupe Danone Nutricia Research, dirigé par le Professeur Jan Knol.

Danone Nutricia Research

Uppsalalaan 12

3584 CT, Utrecht

Pays-Bas

Remerciements

Je remercie,

Mon maître et directeur de thèse, Monsieur le Professeur Frédéric Gottrand. Vous m'avez fait l'honneur de diriger cette thèse. Merci de vos conseils avisés, de votre enthousiasme sans faille et de votre disponibilité tout au long de ce travail. Je vous remercie de votre soutien et de la confiance que vous me témoignez. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Dominique Darmaun. Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Soyez assuré de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Umberto Simeoni. Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Soyez assuré de mon profond respect.

Madame le Docteur Corinne Gower - Rousseau. Tu me fais l'honneur de juger ce travail. Je te remercie de ton soutien et de ta confiance.

Monsieur le Professeur Laurent Storme, d'avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse. Merci de vos conseils et de votre soutien.

Monsieur le Docteur Vincent Prévot, d'avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse. Merci de tes conseils et de ton soutien.

Les membres de l'équipe U995, en particulier Monsieur le Docteur Jean-Luc Desseyn, Madame le Docteur Valérie Gouyer et Ségolène Plet. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de m'avoir guidée tout au long de ce travail. Merci de votre disponibilité, de votre aide, de vos conseils et de la sympathie que vous me témoignez.

Mon maître, Monsieur le Professeur Dominique Turck, de veiller sur moi et de m'accompagner dans mon projet.

Madame le Docteur Marie-Odile Husson, d'avoir suivi d'un œil bienveillant le déroulement de ce travail.

Monsieur le Docteur Thierry Jouault, de ses conseils et de sa relecture attentive de ce manuscrit de thèse.

L'équipe du Département de Biologie intestinale et de Microbiologie du groupe Danone Nutricia Research, pour cette collaboration. Merci en particulier à Mona Mischke et Ingrid Renes de m'avoir accueillie dans leur équipe à Utrecht. Merci à Sebastian Tims de son aide précieuse dans l'analyse du séquençage du microbiote.

Le personnel de l'animalerie de l'Université Lille 2, d'avoir veillé au bon déroulement des expérimentations.

Le service commun de Morphologie Cellulaire de l'Université Lille 2, et particulièrement Rose-Mary Siminski et Marie-Hélène Gevaert, pour la réalisation des coupes histologiques. Merci de vos conseils et de votre disponibilité.

La Fondation pour la Recherche Médicale, la SFNEP, la Fondation Nutricia Research et le CHRU de Lille, pour leur soutien financier.

Mes collègues du service de Gastroentérologie, hépatologie et nutrition pédiatriques du CHRU de Lille, de leurs encouragements et du temps qu'ils m'ont accordé pour terminer la rédaction de ce manuscrit.

Mon mari, Alban. Merci de tout ton amour et du bonheur que tu m'apportes. Merci de ta patience et de ton soutien dans mes choix.

Ma fille, Fidéline, de tout le bonheur qu'elle m'apporte.

Mes parents, sans qui je ne serais pas arrivée là aujourd'hui. Vous m'avez inculqué les valeurs du travail et du respect qui font de moi le médecin que je suis. Merci de votre soutien sans faille tout au long de ce parcours.

Ma famille et mes amis, de leur soutien et de leurs encouragements.

Publications et conférences

PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES AVEC COMITÉ DE LECTURE

1 - Husson M-O, **Ley D**, Portal C, Gottrand M, Hueso T, Desseyn J-L, Gottrand F. Modulation of host defence against bacterial and viral infections by omega-3 polyunsaturated fatty acids. ***Journal of Infection*** 2016;73:523-535; IF : 4,441.

2 - **Ley D**, Desseyn J-L, Mischke M, Knol J, Turck D, Gottrand F. Early life origin of intestinal inflammatory disorders. ***Nutrition Reviews*** 2017;75:175-187; IF : 5,591.

COMMUNICATIONS À DES CONGRÉS SCIENTIFIQUES INTERNATIONAUX

(CO : communication orale, CA : communication affichée)

Ley D, Desseyn J-L, Gouyer V, Husson MO, Turck D, Gottrand F. Effects of early postnatal undernutrition on intestinal maturation in mouse.

. 46th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), London, 8-11 May 2013 (CA).

. Second Conference on Nutrition & Growth, Barcelona, 30 January-1 February 2014 (CA).

COMMUNICATIONS À DES CONGRÉS SCIENTIFIQUES FRANCOPHONES

(CO : communication orale, CA : communication affichée)

1 - **Ley D**, Desseyn J-L, Gouyer V, Husson MO, Turck D, Gottrand F. Effets de la dénutrition post-natale précoce sur la maturation intestinale de la souris au sevrage.

. Congrès de la Société Francophone des Origines Développementales de la Santé (SFDOHaD), Paris, 8-9 Novembre 2012 (CO).

. Journées Francophones d'Hépato-Gastroentérologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD), Paris, 21-24 Mars 2013 (CA).

2 - **Ley D**, Desseyn J-L, Gouyer V, Gottrand F. Postnatal growth restriction delays intestinal maturation in mice.

15ème Journée André Verbert, Lille, 14 Septembre 2015 (CA).

PRÉSENTATIONS ORALES AU SEIN DU LIRIC

1 - Consequences of postnatal growth restriction on intestinal maturation in mice and susceptibility to gut inflammation later in life.

Journée des étudiants du LIRIC, Lille, le 16 Mai 2014.

Prix de la meilleure présentation.

2 - Origine développementale des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Café scientifique du LIRIC, Lille, le 27 Avril 2017.

PRIX DE RECHERCHE

1 - Prix de recherche de la Société Francophone de Nutrition Entérale et Parentérale (SFNEP) (2013)

2 - Prix de recherche de la Fondation Nutricia Research (2015)

3 - Bourse de mobilité dans le cadre du « Fond hospitalier d'aide à l'émergence et à la structuration des activités et équipes de recherche » du CHRU de Lille (2015-2016).

Sommaire

Sommaire 8

Liste des figures 11

Liste des tableaux 13

Abréviations utilisées 14

Résumé 16

Abstract 18

Introduction 19

Stratégie de recherche 22

Matériels et méthode 24

1. Animaux 24

2. Croissance et composition corporelle 25

3. Prélèvement et fixation des tissus 25

4. Analyse histologique 25

5. Immunohistochimie 26

6. Mesure *in vivo* de la perméabilité intestinale 27

7. Activité des enzymes digestives 27

8. Colite chronique chimiquement induite 28

9. Activité de la myéloperoxydase 29

10. Expression des cytokines 30

11. Séquençage du microbiote intestinal 30

12. Analyse statistique 32

Résultats 33

1. Croissance et composition corporelle à l'âge adulte 33

2. Le RCPN retarde la maturation de l'intestin 33

2.1. Le RCPN altère la morphogénèse de l'iléon et du côlon 35

2.2. Le RCPN diminue l'expression des enzymes digestives à la bordure en brosse au sevrage 35

2.3. Le RCPN altère le profil de glycosylation de l'épithélium intestinal au sevrage 38

2.4. Le RCPN altère la barrière intestinale au sevrage 38

2.5. Le RCPN est responsable d'une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon au sevrage 41

3. Impact à long terme du RCPN sur la santé intestinale 43

3.1. Le RCPN modifie à long terme la structure de l'iléon et du côlon 43

3.2. Le RCPN modifie à long terme l'activité des enzymes digestives de la bordure en brosse 43

3.3. Le RCPN modifie à long terme le profil de glycosylation de l'épithélium intestinal.. 43

3.4. Le RCPN est associé à une perméabilité intestinale normale à l'âge adulte 44

3.5. Le RCPN augmente la susceptibilité à une colite chimiquement induite à l'âge adulte 44

4. Le RCPN modifie la colonisation bactérienne de l'intestin 52

Discussion 58

1. Validation du modèle de RCPN 58

2. Impact du RCPN sur la maturation intestinale 62

3. Impact du RCPN sur la susceptibilité aux colites inflammatoires à l'âge adulte ... 69

4. Impact du RCPN sur la composition du microbiote intestinal ... 71

Conclusion et perspectives ... 75

Références bibliographiques ... 80

Annexe ... 97

Liste des figures

Figure 1. Concept de programmation périnatale ou origine développementale des maladies. 21

Figure 2. Le retard de croissance postnatal modifie la composition corporelle à long terme 34

Figure 3. Le retard de croissance postnatal altère la morphogénèse de l'iléon et du côlon . 36

Figure 4. Le retard de croissance postnatal diminue l'expression des enzymes digestives à la bordure en brosse au sevrage 37

Figure 5. Le retard de croissance postnatal altère le profil de glycosylation de l'épithélium intestinal au sevrage 39

Figure 6. Le retard de croissance postnatal altère la barrière intestinale au sevrage 40

Figure 7. Le retard de croissance postnatal est responsable d'une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon au sevrage 42

Figure 8. Le retard de croissance postnatal modifie la structure de l'iléon et du côlon à l'âge adulte 45

Figure 9. Le retard de croissance postnatal modifie l'activité des enzymes digestives de la bordure en brosse à l'âge adulte 46

Figure 10. Le retard de croissance postnatal modifie le profil de glycosylation de l'épithélium intestinal à l'âge adulte 47

Figure 11. Le retard de croissance postnatal est associé à une perméabilité intestinale normale à l'âge adulte 48

Figure 12. Le retard de croissance postnatal modifie la réponse inflammatoire de l'intestin à l'âge adulte 49

Figure 13. Le retard de croissance postnatal augmente la susceptibilité à une colite chimiquement induite à l'âge adulte.....51

Figure 14. Le retard de croissance postnatal modifie la colonisation bactérienne de l'intestin 54

Figure 15. Moyenne des écart-types (min-max) de la masse corporelle des animaux des grandes portées et des portées contrôles.....61

Figure 16. Remplacement progressif des entérocytes vacuolisés par des entérocytes matures adultes entre PN18 et PN21 chez le rat.....63

Figure 17. Effet de programmation du retard de croissance postnatal sur la santé intestinale.....79

Liste des tableaux

Tableau 1. Score de sévérité de la colite chimiquement induite selon Dieleman *et al.* 29

Tableau 2. Profil taxonomique du microbiote fécal 55

Abréviations utilisées

AB-PAS	Bleu alcian - acide périodique de Schiff
ARNr	ARN ribosomal
BFS	Bactérie filamenteuse segmentée
BSA	Sérum albumine bovine
CTRL	Contrôle
DPPIV	Dipeptidyl peptidase IV
DSS	Dextran sodium sulfate
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
GP	Grandes portées
HE	Hématoxyline - éosine
HGF	Hepatocyte growth factor
HTAB	Hexadecyl triméthyl ammonium bromide
IAP	Phosphatase alcaline intestinale
IBD	Inflammatory bowel disease
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IHC	Immunohistochimie
IL-1β	Interleukine-1β
IL-6	Interleukine-6
IL-10	Interleukine-10
IL-17	Interleukine-17

LGG	*Lactobacillus rhamnosus GG*
LPS	Lipopolysaccharide
MAA	*Maackia amurensis* agglutinin
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MPO	Myéloperoxydase
OR	Odds ratio
OTU	Unités taxonomiques opérationnelles
PC	Portées contrôles
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PN1	Jour postnatal 1
PN4	Jour postnatal 4
PN18	Jour postnatal 18
PN19	Jour postnatal 19
PN21	Jour postnatal 21
PN60	Jour postnatal 60
PNGR	Postnatal growth restriction
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RCPN	Retard de croissance postnatal
SCFAs	Short chain fatty acids
sIgA	Immunoglobulines A sécrétoires
TGF-α	Transforming growth factor-α
TLRs	Toll-like receptors
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TRITC	Tetramethylrhodamine
UEA1	*Ulex europaeus* agglutinin 1

Résumé

La période des 1000 premiers jours de vie constitue une fenêtre de sensibilité au cours de laquelle l'environnement peut moduler le développement du fœtus et du nourrisson, et conditionner la santé tout au long de la vie. Les conséquences à long terme de l'environnement périnatal sur le risque de maladies intestinales sont toutefois encore peu connues. L'objectif de ce travail était de montrer l'impact de l'environnement nutritionnel précoce sur la maturation intestinale et la santé intestinale à long terme.

Un retard de croissance postnatal (RCPN) était induit chez la souris FVB/NRj par augmentation de la taille des portées. Le RCPN était responsable d'un retard de maturation de l'intestin chez la souris au sevrage, en particulier de la barrière intestinale, caractérisé par une augmentation de la perméabilité intestinale, concomitante d'une désorganisation des protéines des jonctions serrées. Le microbiote intestinal était moins riche en espèces bactériennes chez la souris au sevrage en cas de RCPN et sa composition était différente, avec en particulier une proportion anormalement élevée de *Parabacteroides* spp, *Enterococcus* spp, *Erysipelatoclostridium* spp, *Eubacterium coprostanoligenes* spp, *Staphylococcus* spp, et *Escherichia-Shigella* spp, et une plus faible proportion d'espèces productrices de butyrate. L'absence de barrière intestinale efficace et la dysbiose induites par le RCPN, étaient associées à une altération de la réponse inflammatoire de l'intestin à l'âge adulte, caractérisée par une augmentation des réponses immunitaires Th1, Th17 et Treg et une plus grande susceptibilité à la colite chimiquement induite.

Ce travail démontre l'importance de l'environnement nutritionnel précoce dans la programmation de la santé intestinale au cours de la vie, et conforte l'hypothèse d'une origine développementale des maladies intestinales chroniques.

Mots clés : programmation périnatale, retard de croissance, maturation intestinale, colite inflammatoire, microbiote

Abstract

The first thousand days of life are a critical time for the development of both the fetus and the infant, and can modify the risk profile for diseases in later life. However, the long-term consequences of the perinatal environment on the susceptibility to intestinal disorders have not yet been assessed. The aim of the present study was to investigate the impact of the early nutritional environment on intestinal maturation and gut health in later life.

Postnatal growth restriction (PNGR) was induced in FVB/NRj mice during the suckling period by adjusting the litter size. PNGR delayed intestinal maturation in pups at weaning. PNGR was associated with a maturation delay of the intestinal barrier, characterized by an increased intestinal permeability and impaired tight junctions. At the same time, PNGR affected gut bacterial colonization. Pups with PNGR harbored a decreased bacterial diversity, higher *Parabacteroides* spp, *Enterococcus* spp, *Erysipelatoclostridium* spp, *Eubacterium coprostanoligenes* spp, *Staphylococcus* spp, and *Escherichia-Shigella* spp, and lower butyrate producers. The lack of an efficient intestinal barrier and the dysbiosis induced by PNGR were associated with an altered intestinal inflammatory response in adult mice, characterized by an increase of Th1, Th17 and Treg immune responses, and a higher susceptibility to chemically induced colitis.

Our data emphasize the importance of the early nutritional environment in programming of gut health in later life, and support the hypothesis of the developmental origin of chronic intestinal disorders.

Introduction

La période des 1000 premiers jours de vie, qui s'étend de la conception à la fin des deux premières années de vie, est une période critique du développement du fœtus et du nourrisson, et conditionne la santé à long terme. Elle constitue en effet une fenêtre de sensibilité au cours de laquelle l'environnement, nutritionnel, écologique, socio-économique, psycho-affectif, peut moduler le développement des fonctions biologiques, et programmer ainsi le risque futur de maladie chronique au cours de la vie (figure 1). Cette plasticité développementale est un processus adaptatif par lequel un génotype peut conduire à plusieurs phénotypes en fonction de l'exposition à différents facteurs environnementaux au cours du développement (Barker, 2007). La capacité de l'organisme à s'adapter à l'environnement précoce implique des modifications épigénétiques. Ces dernières, en régulant l'expression des gènes sans en modifier la séquence, permettent à l'individu de s'adapter à l'environnement précoce en modulant ses fonctions biologiques. Ces mécanismes d'adaptation permettent à court terme la survie de l'individu face à un environnement potentiellement délétère. À long terme, si la réponse adaptative programmée par l'environnement précoce est adaptée à l'environnement plus tard au cours de la vie, elle est alors bénéfique pour la santé de l'individu. À l'inverse, la réponse adaptative peut être inappropriée lorsque l'environnement change au cours de la vie, et peut favoriser ainsi la survenue de maladies (Hanson et Gluckman, 2014 ; Barouki *et al.*, 2012 ; Simeoni *et al.*, 2016). La réponse adaptative peut être variable d'un individu à l'autre en fonction de son patrimoine génétique (polymorphisme génétique) (Heindel et Vandenberg, 2015 ; Barouki *et al.*, 2012), expliquant que deux individus exposés au même facteur environnemental n'auront pas le même risque de maladie plus tard au cours de la vie. Les modifications épigénétiques

constituent des marques de l'exposition précoce et potentiellement du risque de maladie plus tard au cours de la vie.

Le rôle de la programmation périnatale, ou origine développementale des maladies chroniques, a été clairement démontré dans la survenue d'un syndrome métabolique et de ses complications cardiovasculaires à l'âge adulte. Les enfants nés avec un retard de croissance intra-utérin (RCIU) ont un risque accru d'obésité et de diabète de type 2 à l'âge adulte. Les modifications épigénétiques, en modulant la réponse des circuits régulant le métabolisme, induisent un phénotype économe chez le fœtus soumis à une malnutrition, permettant ainsi sa survie. En cas d'exposition à un environnement nutritionnel excessif, ou tout simplement normal, plus tard au cours de la vie, ce phénotype économe est responsable d'un risque accru de syndrome métabolique à l'âge adulte (Hales et Barker, 1992 ; Barker, 2007 ; Vickers, 2014).

Une dysfonction de la barrière intestinale et une réponse inappropriée du système immunitaire sont impliquées dans la survenue de maladies inflammatoires chroniques, telles que l'obésité, les allergies alimentaires, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), ou encore la maladie cœliaque (Anderson *et al.,* 2012 ; Groschwitz et Hogan, 2009 ; Marchesi *et al.*, 2016 ; West *et al.*, 2015). Au cours de la période périnatale, l'intestin subit une maturation importante pour répondre aux besoins nutritionnels élevés du nouveau-né et former une barrière efficace contre des agents potentiellement délétères (antigènes alimentaires, micro-organismes et leurs toxines) (Montgomery *et al.*, 1999 ; Colony 1983 ; Anderson *et al.*, 2012). Des études épidémiologiques suggèrent que l'environnement périnatal pourrait moduler le risque de maladies intestinales chroniques au cours de la vie. Ces études ont mis en évidence un lien entre des facteurs périnataux, tels que l'allaitement, la naissance par césarienne, et une antibiothérapie pendant les premiers mois de vie, et un risque accru de MICI et/ou de maladie cœliaque plus tard au cours de la vie. Les travaux chez l'animal ont montré le rôle de l'environnement précoce sur le développement des

fonctions intestinales, sans toutefois démontrer son rôle dans la survenue de maladies intestinales à l'âge adulte. Des études expérimentales sont nécessaires pour prouver l'impact à long terme de l'environnement périnatal sur la santé intestinale. Une altération de la composition du microbiote intestinal et des mécanismes épigénétiques semblent être impliqués dans la programmation de la santé intestinale par l'environnement périnatal (voir annexe).

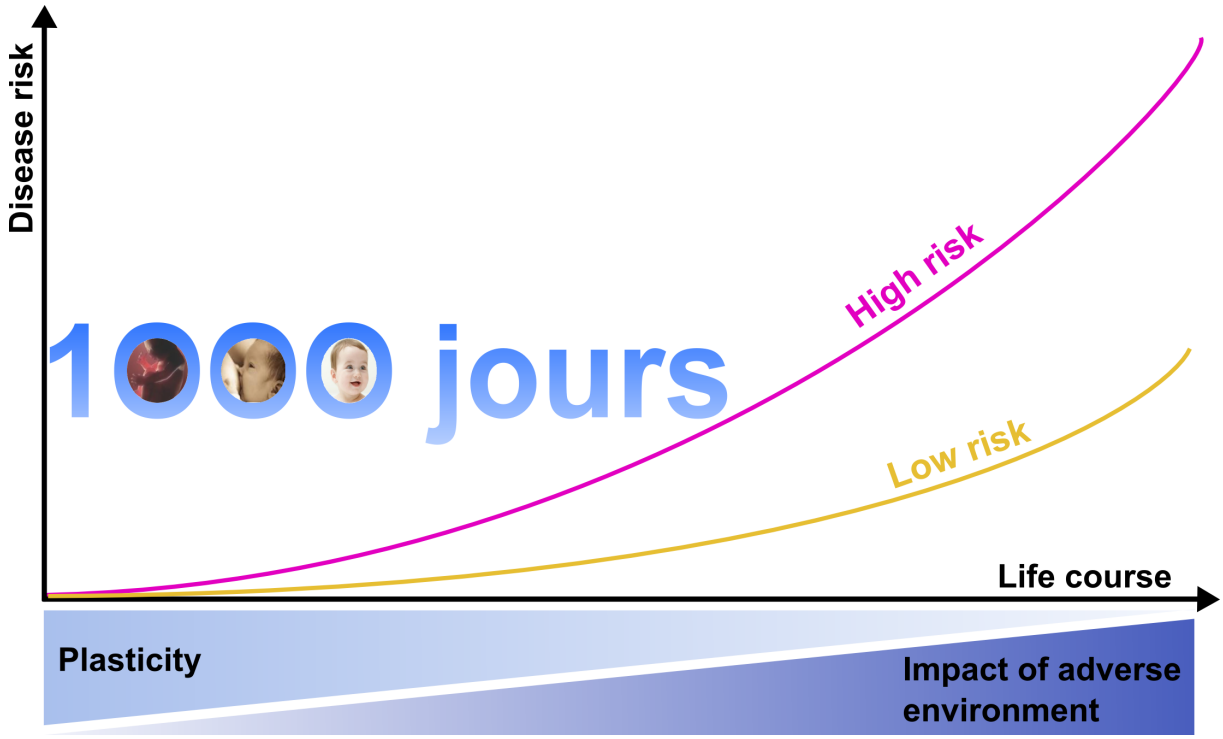


Figure 1. Concept de programmation périnatale ou origine développementale des maladies. Adaptée de Hanson et Gluckman, 2014.

Stratégie de recherche

L'objectif général de ce travail était d'évaluer l'impact de l'environnement nutritionnel précoce sur la maturation intestinale et la santé intestinale à long terme.

Alors que l'intestin est quasi mature à la naissance chez l'Homme, le rongeur naît avec un intestin immature. Chez ce dernier, la maturation intestinale a lieu pendant la période postnatale précoce, essentiellement au cours de la troisième semaine de vie pour se terminer au moment du sevrage (Drozdowski *et al.*, 2010 ; Montgomery *et al.*, 1999 ; Moog, 1979 ; Tsuboi et Castillo, 1989). Au cours de cette période, l'épithélium intestinal est soumis à un phénomène de redifférenciation intense au terme duquel l'épithélium fœtal devient un épithélium mature adulte (Moog, 1979 ; Tsuboi et Castillo, 1989). La hauteur des villosités diminue dans l'intestin grêle distal, conduisant à l'apparition du gradient jéjuno-iléal retrouvé chez l'adulte (Trahair, 1989 ; Tsuboi et Castillo, 1989). Les microvillosités formant la bordure en brosse des entérocytes deviennent plus régulières, plus denses et plus longues permettant d'accroître de façon considérable les capacités d'absorption de l'épithélium intestinal (Dekaney *et al.*, 1997). De façon concomitante, on assiste à une augmentation de l'activité des enzymes de la bordure en brosse et à la modification de leur distribution le long du tube digestif avec l'apparition d'un gradient proximo-distal (Drozdowski *et al.*, 2010 ; Montgomery *et al.*, 1999 ; Moog, 1979 ; Tsuboi et Castillo, 1989). C'est également au cours de cette période que se met en place la fonction de barrière de l'épithélium intestinal avec l'augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées (Holmes *et al.*, 2006), ainsi que la prolifération et la maturation des cellules sécrétrices de mucus (Dekaney *et al.*, 1997 ; Fança-Berthon *et al.*, 2009). Bien qu'il existe des différences anatomiques et

physiologiques avec l'Homme, chez le rongeur, l'intestin pendant les trois premières semaines de vie correspond à l'intestin aux deuxième et troisième trimestres de grossesse chez l'Homme, faisant du rongeur un bon modèle animal pour étudier l'impact de l'environnement périnatal sur la maturation intestinale (Puiman et Stoll, 2008).

Pour tester l'impact de l'environnement nutritionnel périnatal sur la santé intestinale, nous avons choisi un modèle murin de retard de croissance postnatal (RCPN), induit par dénutrition pendant la période postnatale précoce en augmentant la taille des portées chez la souris FVB/NRj. Notre hypothèse était que le retard de croissance pendant la période postnatale précoce pourrait altérer le développement des fonctions intestinales chez la souris, ainsi que la colonisation bactérienne de l'intestin, et augmenter ainsi la susceptibilité aux colites inflammatoires à l'âge adulte.

Les objectifs étaient d'étudier :

1. Les conséquences du RCPN sur la maturation intestinale chez la souris au sevrage.
2. Les effets à long terme du RCPN sur les fonctions intestinales de la souris adulte et la susceptibilité à une colite chimiquement induite.
3. L'influence du RCPN sur l'implantation du microbiote intestinal chez la souris au sevrage, et à long terme sur la diversité et la composition du microbiote de la souris adulte.

Compte-tenu de la faible sensibilité des femelles à une colite chimiquement induite (Bábíčková *et al.*, 2015), seuls les mâles étaient étudiés dans ce travail.

Matériels et méthode

1. Animaux

Les expérimentations animales étaient réalisées selon les recommandations françaises et européennes relatives à l'utilisation et aux soins des animaux utilisés à des fins scientifiques, et étaient approuvées par le Comité d'éthique en expérimentation animale de la région Nord-Pas-de-Calais (numéro d'autorisation: 01564.01). Des souris FVB/NRj (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), âgées de huit semaines, étaient hébergées dans une animalerie exempt d'organismes pathogènes spécifiques. Après huit jours d'acclimatation, les femelles étaient mises à mâles pendant huit jours. Pendant la gestation et la lactation, les femelles recevaient une alimentation standard à base de graines (RM3, Special Diet Services, France). Le RCPN était induit pendant la période postnatale précoce par modification de la taille des portées. Après mise à bas, la production de lait par les mères était normalisée du premier au quatrième jour de vie en homogénéisant le nombre de petits par portées à huit et par exclusion des portées extrêmes (moins de six souriceaux ou plus de 11 souriceaux). De grandes portées (GP) comprenant 15 souriceaux étaient formées au jour postnatal 4 (PN4) par échange des petits entre les mères, pour induire un retard de croissance. Des portées contrôles (PC) fixées à huit petits servaient de référence. Chaque souriceau était attribué à une nouvelle mère au moment de l'échange des petits, de façon à ce que le stress lié au changement de mère soit identique pour tous les animaux. Les PC et les GP étaient laissées en l'état jusqu'au sevrage réalisé au jour postnatal 21 (PN21). À partir du sevrage, les animaux recevaient une alimentation standard *ad libitum* (figure 2A).

2. **Croissance et composition corporelle**

Les souriceaux étaient pesés tous les deux jours de PN4 à PN21, puis une fois par semaine à partir du sevrage jusqu'à l'âge adulte, fixé au jour postnatal 60 (PN60). La composition corporelle des mâles issus des PC et des GP était comparée à PN60 par CT-Scan (LaTheta 100 X-ray Computed Tomography scanner) permettant de quantifier la masse grasse totale, la masse grasse sous-cutanée, la masse grasse viscérale, ainsi que la masse maigre.

3. Prélèvement et fixation des tissus

Les mâles étaient sacrifiés à PN21 ou PN60 par dislocation cervicale. L'iléon distal et le côlon descendant étaient immédiatement prélevés. Les tissus étaient immédiatement fixés par immersion dans du paraformaldéhyde 4% (USB, 19943) pendant 18h puis inclus en paraffine pour les analyses histologiques et immunohistochimiques, ou immédiatement immergées dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C. Pour le dosage de l'activité des enzymes digestives, les biopsies d'iléon étaient ouvertes longitudinalement puis rincées avec une solution saline à +4°C (154 mM NaCl, 0,1 mM PMSF, pH 7,4). La muqueuse iléale était ensuite collectée en grattant la surface luminale du prélèvement, puis immergée dans de l'azote liquide et conservée à -80°C. Les fèces étaient fraîchement collectées puis congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C.

4. Analyse histologique

Des coupes de 6 µm d'iléon et de côlon inclus en paraffine étaient colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) ou de l'acide périodique Schiff et du bleu alcian (AB-PAS). L'épaisseur de la muqueuse colique, la profondeur des cryptes et la hauteur des villosités iléales étaient mesurées sur dix champs par coupe bien orientés et choisis de manière aléatoire. Le nombre de cellules en gobelet était déterminé comme le nombre de cellules PAS positives sur dix cryptes et dix villosités par coupe, bien orientées et choisies de

manière aléatoire. Les mesures étaient répétées sur trois coupes par biopsie d'iléon et de côlon. L'analyse histologique était réalisée en aveugle de la portée d'origine.

5. Immunohistochimie

Des coupes de 6 µm de tissus inclus en paraffine étaient déparaffinées dans du xylène, puis réhydratées par des bains successifs d'éthanol de concentration décroissante. Les sites de liaison non spécifiques étaient saturés en incubant les coupes avec de la sérum-albumine bovine (BSA) 1 % (Sigma-Aldrich, A4503) pendant 45 minutes à température ambiante. Les coupes étaient ensuite incubées avec différents anticorps primaires dilués dans la BSA 1 % pendant une nuit à +4°C : anticorps polyclonal anti-claudine 7 (1:150 ; Invitrogen, 34-9100) ; anticorps polyclonal anti-occludine (1:200 ; Novusbio, NBP1-87402) ; anticorps polyclonal anti-phosphatase alcaline intestinale (IAP) (1:500 ; Abcam, ab7322) ; anticorps polyclonal anti-dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) (1:500 ; donné par A. Hubbard, Baltimore, USA). Pour le marquage de la claudine 7, de l'occludine et de la DPPIV, un démasquage des antigènes par la chaleur était préalablement réalisé par immersion des coupes pendant 20 minutes dans du tampon citrate (10 mM sodium citrate, Tween 20 0,05 %, pH 6,0) à 100°C, puis à température ambiante pendant 20 minutes. Après trois lavages dans du PBS, les coupes étaient incubées avec un anticorps secondaire couplé au FITC (1:150 ; Jackson ImmunoResearch, 111-096-046), dilué dans la BSA 1 %, pendant deux heures, à l'abri de la lumière, à température ambiante. La lectine UEA1 (*Ulex europaeus* agglutinin 1), qui reconnaît le fucose α-1,2-galactose, et la lectine MAA (*Maackia amurensis* agglutinin), qui reconnaît l'acide sialique α-2,3-galactose, étaient utilisées à la concentration de 25 µg/mL (EY Laboratories, Biovalley, Marne La Vallée, France). Les lectines UEA1 et MAA étaient respectivement conjuguées au FITC et au TRITC. Les coupes étaient incubées avec du Hoescht 33258 (1:1000 ; Molecular probes, H3569) pour marquer les noyaux cellulaires, puis montées entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage (Mowiol). Les images étaient obtenues à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica TCS LCSM, Leica Microsystems, InC., Exton, PA) et travaillées de façon identique à l'aide du

logiciel Gimp 2.8. L'intensité de la fluorescence était quantifiée en aveugle de la portée d'origine, à l'aide du logiciel Image J 1.48 sur trois coupes par biopsie d'iléon et de côlon et sur dix champs bien orientés et choisis de manière aléatoire pour chaque coupe.

6. Mesure *in vivo* de la perméabilité intestinale

La perméabilité paracellulaire de l'épithélium intestinal était mesurée *in vivo* après gavage des animaux à PN21 ou PN60 à l'aide d'une sonde gastrique par une solution de dextran - FITC 4 KDa (440 mg/Kg de masse corporelle ; Sigma-Aldrich, FD4). Quatre heures après le gavage, le sang était prélevé par voie intracardiaque, et le sérum état isolé par centrifugation à 1000 X *g* pendant 10 minutes. La concentration sérique de FITC était calculée en fonction de la fluorescence mesurée à 485 nm grâce au lecteur de microplaques FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

7. Activité des enzymes digestives

La bordure en brosse était purifiée par précipitation en présence de magnésium et centrifugations répétées selon une méthode précédemment décrite (Fan *et al.*, 1999). La muqueuse iléale était broyée à l'aide d'un homogénéisateur dans 1000 µL de tampon d'homogénéisation à +4°C (D-Mannitol 50 mM, PMSF 0,1 mM, pH 7,4 ajusté avec du tampon HEPES 0,5 M), puis centrifugée à 2000 X *g* pendant 15 minutes à +4ºC. Le surnageant était incubé avec 100 µL de tampon $MgCl_2$ à la concentration finale de 10 mM pendant 15 minutes, puis centrifugé à 2400 X *g* pendant 15 minutes à +4°C. La couche supérieure de mousse était jetée et le surnageant était à nouveau centrifugé à 19 000 X *g* pendant 30 minutes à +4°C. Après avoir jeté le surnageant, le culot de bordure en brosse était re-suspendu dans 500 µL de tampon D-Mannitol 300 mM, pH 7,4 ajusté avec du tampon HEPES 0,5 M, et centrifugé à 30 000 X *g* pendant 30 minutes. Le surnageant était jeté et le culot de bordure en brosse était à nouveau re-suspendu dans 500 µL de tampon D-Mannitol. La quantité de protéines présente dans l'échantillon de bordure en brosse purifiée était dosée à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay (Biotechnology, 23227). Le dosage de

l'activité de IAP était réalisé dans un volume final de 1000 µL contenant l'échantillon de bordure en brosse purifiée (10 µg de protéines), 1 mM de 4-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich, 73737), 2 mM de potassium fluoride et 4 mM de $MgCl_2$, pH 10,5. L'incubation était réalisée à 37°C pendant 10 minutes. La réaction enzymatique était stoppée en ajoutant 1 mL de NaOH 0,5M. Le produit final de la réaction, le p-nitrophenol, était mesuré à 400 nm grâce au lecteur de microplaques FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Le dosage de l'activité de DPPIV était réalisé dans un volume final de 200 µL contenant l'échantillon de bordure en brosse purifiée (20 µg de protéines), 1 mM de Gly-Pro p-nitroanilide (Sigma-Aldrich, G2901), et 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. L'incubation était réalisée à 37°C pendant 30 minutes. La réaction enzymatique était stoppée en ajoutant 800 µL de sodium acétate 1M, pH 4,5. Le produit final de la réaction, la 4-nitroaniline, était mesuré à 405 nm grâce au lecteur de microplaques FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). L'activité enzymatique était exprimée en UI/mg de protéines, une unité internationale (UI) correspondant à la quantité d'enzyme hydrolysant 1 µmol de substrat par minute à 37°C.

8. Colite chronique chimiquement induite

Une colite chronique était chimiquement induite chez les souris adultes (PN60) par administration de DSS (dextran sodium sulfate) 3 % (TdB Consultancy AB, DB001) via l'eau de boisson pendant trois cycles de cinq jours entrecoupés d'un intervalle libre de sept jours entre chaque cycle. Les animaux étaient pesés tous les deux jours, et sacrifiés au terme des trois cycles. Les lésions histologiques du côlon étaient évaluées selon le score de Dieleman *et al.* (Dieleman *et al.*, 1998) en aveugle du groupe de traitement (tableau 1). L'activité de la myéloperoxydase (MPO), ainsi que l'expression des cytokines, étaient quantifiées sur des biopsies coliques conservées à -80°C.

Tableau 1. Score de sévérité de la colite chimiquement induite selon Dieleman *et al.* (Dieleman *et al.*, 1998)

Item	Score	Description
Inflammation	0	Aucune
	1	Légère
	2	Modérée
	3	Sévère
Extension	0	Aucune
	1	Muqueuse
	2	Muqueuse et sous-muqueuse
	3	Transmurale
Régénération	4	Aucune
	3	Régénération partielle de l'épithélium
	2	Régénération complète de l'épithélium mais déplétion des cryptes
	1	Quasi complète
	0	Complète
Lésions des cryptes	0	Aucune
	1	1/3 basal
	2	2/3 des cryptes
	3	Conservation de l'épithélium uniquement
	4	Lésions des cryptes et de l'épithélium
Surface atteinte	1	1-25 %
	2	26-50 %
	3	51-75 %
	4	76-100 %

9. Activité de la myéloperoxydase

L'activité de la MPO était mesurée dans le côlon selon une méthode adaptée de Han *et al.* (Han *et al.*, 2006). Les biopsies coliques étaient broyées dans 1 mL de tampon phosphate (50 mM KH_2PO_4, pH 6,0), puis centrifugées à 8500 X *g* pendant 15 minutes à +4°C. Le surnageant était jeté et le culot était incubé dans 1 mL de tampon phosphate (50 mM KH_2PO_4, 0,5 % HTAB, pH 6,0) pendant 15 minutes à +4°C, puis centrifugé à 8500 X *g* pendant 15 minutes à +4°C. Cent µL du surnageant était incubé avec 1 mL du réactif de la MPO (50 mM KH_2PO_4 pH 6,0, H_2O_2 0,0005 %, O-diani 0,167 mg/mL (Sigma D3252)) pendant 5 minutes à température ambiante. La réaction était stoppée en ajoutant 50 µL d'azide 2 %. Une courbe d'étalonnage était préparée à partir de MPO de leucocytes humains (Sigma, M6908) à une concentration allant de 0 à 0,33 U/100 µL. Le produit final de la

réaction était mesuré à 450 nm grâce au lecteur de microplaques FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). L'activité de la MPO était exprimée en UI/mg de protéines, une unité internationale (UI) correspondant à la quantité de MPO hydrolysant 1 µmol de peroxyde d'hydrogène par minute à 25°C.

10. Expression des cytokines

Les biopsies d'iléon et de côlon étaient broyés dans 700 µL de tampon de lyse (Dithiotreitol 0,1 M, NP40 0,01 %, Complete mini EDTA-free (Roche, 11836170001)), puis centrifugés à 1000 X *g* pendant 10 minutes. La concentration d'IL-1β (eBioscience, 88-7013-88), TNF-α (eBioscience, 88-7324-88), IL-17A (eBioscience, 88-7371-88), IL-6 (eBioscience, 88-7064-88), IFN-γ (eBioscience, 88-7314-88), et IL-10 (eBioscience, 88-7105-88) étaient mesurées dans le surnageant par la méthode ELISA selon les conditions recommandées par le fournisseur.

11. Séquençage du microbiote intestinal

L'ADN bactérien était isolé à partir des fèces à l'aide du kit QIAmp DNA Stool Mini Kit® (QIAGEN, 51504) selon les conditions recommandées par le fournisseur. Deux étapes supplémentaires d'agitation étaient réalisées. Deux cents mg de fèces étaient agités pendant 30 secondes à trois reprises (FastPrep®-24 instrument, programme 5,5) en présence de 300 mg de microbilles de 0,1 mm de diamètre (ITS, 11079101) et de 1,4 mL de tampon de lyse (tampon ASL). La seconde étape d'agitation était réalisée après ajout de la tablette InhibitEx, pendant 30 secondes à trois reprises (FastPrep®-24 instrument, programme 5,5) pour homogénéiser l'échantillon. Après chaque étape d'agitation, l'échantillon était refroidi pendant 5 minutes sur de la glace. La pureté de l'ADN extrait était contrôlée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc.). La qualité et la concentration d'ADN étaient mesurées à l'aide du kit Qubit® dsDNA BR Assay kit (Life technologies, Q32850). L'ADN bactérien extrait était conservé à -20°C.

Les régions V3-V5 du gène bactérien codant l'ARN ribosomal (ARNr) 16S étaient amplifiées à l'aide des amorces Bact-0341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') et Bact-0785R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth *et al.*, 2012). Les amplicons étaient ensuite séquencés à l'aide du séquenceur à haut débit Illumina MiSeq comme décrit précédemment (Caporaso *et al.*, 2012). Le séquençage était réalisé par la société Lifesequencing S.L., Valence, Espagne. Les données du séquençage étaient analysées à l'aide du logiciel de bioinformatique QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, v.1.9.0) (Caporaso *et al.*, 2010) en collaboration avec le Département de Biologie intestinale et de Microbiologie du groupe Danone Nutricia Research. Les critères de qualité des séquences étaient les suivants : (i) une longueur entre 200 et 1000 bases ; (ii) un score de qualité moyen >15 sur une fenêtre de cinq nucléotides ; (iii) l'absence de bases ambiguës. Les séquences retenues étaient groupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) à l'aide de l'algorithme USEARCH sur la base d'une homologie de séquence de 97 % (Edgar, 2010). Un genre bactérien était assigné à chaque OTU en comparant la séquence la plus représentative de chaque OTU (c'est à dire la plus abondante) à la base de données SILVA ribosomal RNA (version 1.1.9) (Pruesse *et al.*, 2007). Les séquences chimères étaient exclues à l'aide de l'outil de détection ChimeraSlayer du logiciel QIIME (Haas *et al.*, 2011).

Le degré de (dis)similitude entre les échantillons était évalué selon la distance phylogénétique entre chaque échantillon par la méthode Unifrac pondérée permettant de calculer la diversité beta (Lozupone *et al.*, 2006 ; Lozupone et Knight, 2005). La courbe de raréfaction réalisée pour chaque OTU à l'aide du logiciel QIIME permettait de déterminer un nombre de lectures identique pour chaque échantillon à partir duquel la diversité alpha pouvait être calculée selon l'indice Chao1. L'abondance relative de chaque OTU (exprimée en proportion où 1 = 100 %) était comparée entre les groupes de l'étude à l'aide du test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Le taux de faux positifs était estimé en calculant la valeur de q à partir des valeurs de p pour chaque comparaison (Storey, 2002). Une valeur de $p < 0,05$ et une valeur de $q < 0,05$ étaient considérées comme significatives.

12. Analyse statistique

Les variables sont exprimées par la médiane et l'intervalle interquartile. L'analyse statistique était réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc). Le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney était utilisé pour comparer les variables non appariées. La comparaison entre les groupes ayant reçu du DSS et ceux n'en n'ayant pas reçu était effectuée à l'aide du test de Kruskall-Wallis, suivie du test de Wilcoxon-Mann-Whitney. La masse corporelle des animaux des PC et des GP était comparée à l'aide du test de Wilcoxon-Mann-Whitney à partir des moyennes de la masse corporelle de tous les mâles d'une même portée. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme significative.

Résultats

1. Croissance et composition corporelle à l'âge adulte

Les souriceaux mâles issus des GP présentaient une masse corporelle inférieure à celle des PC dès le sixième jour de vie et pendant toute la période postnatale précoce (médiane (Q1-Q3) : 3,3 g (3,1-3,5) *vs* 4,0 g (3,7-4,0), p = 0,004 à PN6 ; 5,7 g (5,3-6,2) *vs* 9,4 g (9,1-9,5), p = 0,001 à PN20) (figure 2B). Nous avons vérifié que la masse corporelle des GP était inférieure au 10ème percentile de la distribution de la masse corporelle des PC. Après le sevrage, les animaux avec RCPN présentaient une croissance de rattrapage (gain de masse corporelle de PN23 à PN60 : +217 % (177-246) *vs* +101 % (89-106), p = 0,001) leur permettant d'atteindre une masse corporelle normale à l'âge adulte (figure 2C).

À masse corporelle égale à PN60, les mâles avec RCPN présentaient une masse grasse inférieure, aussi bien totale (3,6 % (2,4-4,8) *vs* 7,1 % (5,4-7,9), p = 0,0003), sous-cutanée (2,4 % (1,6-2,9) *vs* 3,9 % (3,1-4,1), p = 0,0008) que viscérale (1,4 % (0,9-1,9) *vs* 3,4 % (2,3-3,7), p = 0,0004), ainsi qu'une masse maigre augmentée (54,8 % (52,9-55,9) *vs* 52,6 % (50,5-53,8), p=0,016) (figure 2D).

2. Le RCPN retarde la maturation de l'intestin

L'impact du RCPN sur la morphogénèse de l'intestin et la maturation des fonctions intestinales était étudié chez la souris au sevrage (PN21) au niveau de l'iléon et du côlon.

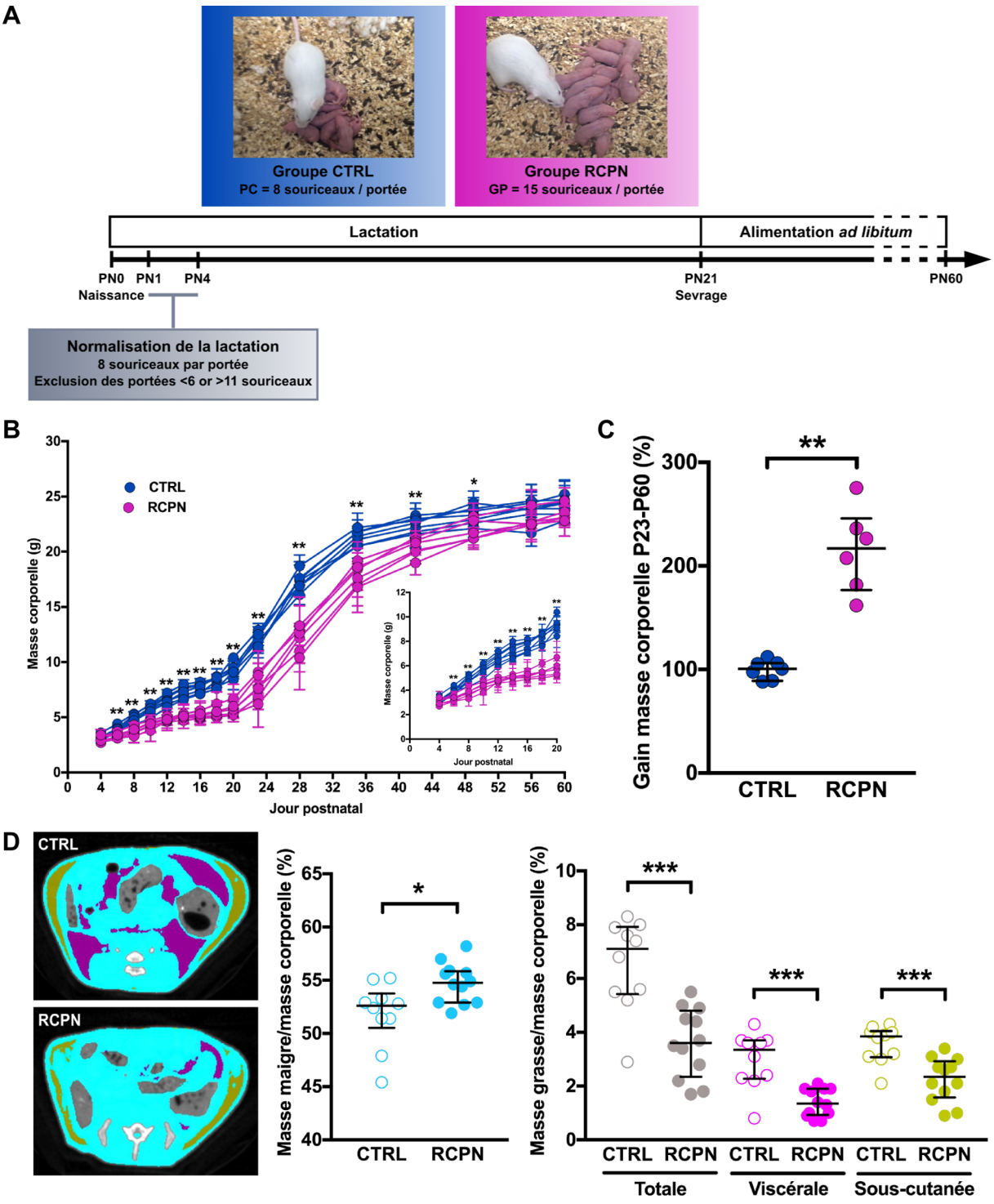


Figure 2. Le retard de croissance postnatal modifie la composition corporelle à long terme
(A) Diagramme shématisant la procédure expérimentale du modèle de retard de croissance postnatal. (B) Courbes de croissance des portées contrôles (PC) et des grandes portées (GP) (n = 6 GP et 7 PC). (C) Gain de masse corporelle de PN23 à PN60 (n = 6 GP et 7 PC). (D) Analyse par CT-Scan de la composition corporelle à l'âge adulte (n = 10-12 par groupe, provenant d'au moins trois portées). **p*<0,05 ; ***p*<0,01 ; ****p*<0,001. *CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal ; PC, portées contrôles ; GP, grandes portées.*

2.1. Le RCPN altère la morphogénèse de l'iléon et du côlon

L'iléon des souriceaux avec RCPN était caractérisé par la persistance de la vacuolisation postnatale des entérocytes villositaires, disparaissant normalement au cours de la troisième semaine de vie chez le rongeur (figure 3A). La profondeur des cryptes iléales était diminuée chez les souriceaux avec RCPN (40,9 µm (37,0-46,2) *vs* 53,9 µm (46,5-61,3), $p = 0,0005$) (figures 3A et 3B). La hauteur des villosités iléales n'était pas différente entre les deux groupes (168,4 µm (139,9-180,1) *vs* 145,0 µm (136,2-154,5), $p = 0,08$) (figures 3A et 3C).

Dans le côlon, la muqueuse était plus fine en cas de RCPN (176,2 µm (167,5-190,6) *vs* 197,6 µm (186,4-206,2), $p = 0,004$) (figures 3D et 3E) et la profondeur des cryptes était diminuée (162,2 µm (156,2-178,1) *vs* 179,0 µm (169,4-187,4), $p = 0,04$) (figures 3D et 3F). Le nombre de cellules sécrétrices de mucus était diminué dans les cryptes coliques (15,5 (12,9-16,2) *vs* 17,1 (16,4-18,4), $p = 0,004$) (figure 3G).

2.2. Le RCPN diminue l'expression des enzymes digestives à la bordure en brosse au sevrage

L'expression de DPPIV (figures 4A et 4B) et de IAP (figures 4D et 4E) était diminuée au niveau de la bordure en brosse de l'iléon des souriceaux avec RCPN ($p = 0,0003$; $p < 0,0001$, respectivement). La DPPIV était exprimée dans le cytoplasme des entérocytes vacuolisés villositaires (figure 4A).

L'activité de DPPIV dans l'iléon n'était pas différente entre les deux groupes (1458 UI/g (1189-1952) *vs* 1581 UI/g (1217-1932), $p = 0,95$) (figure 4C). L'activité de IAP dans l'iléon était augmentée chez les souriceaux avec RCPN (128,7 UI/mg (91,4-161,8) *vs* 49,5 UI/mg (33,0-120,9), $p = 0,04$) (figure 4F).

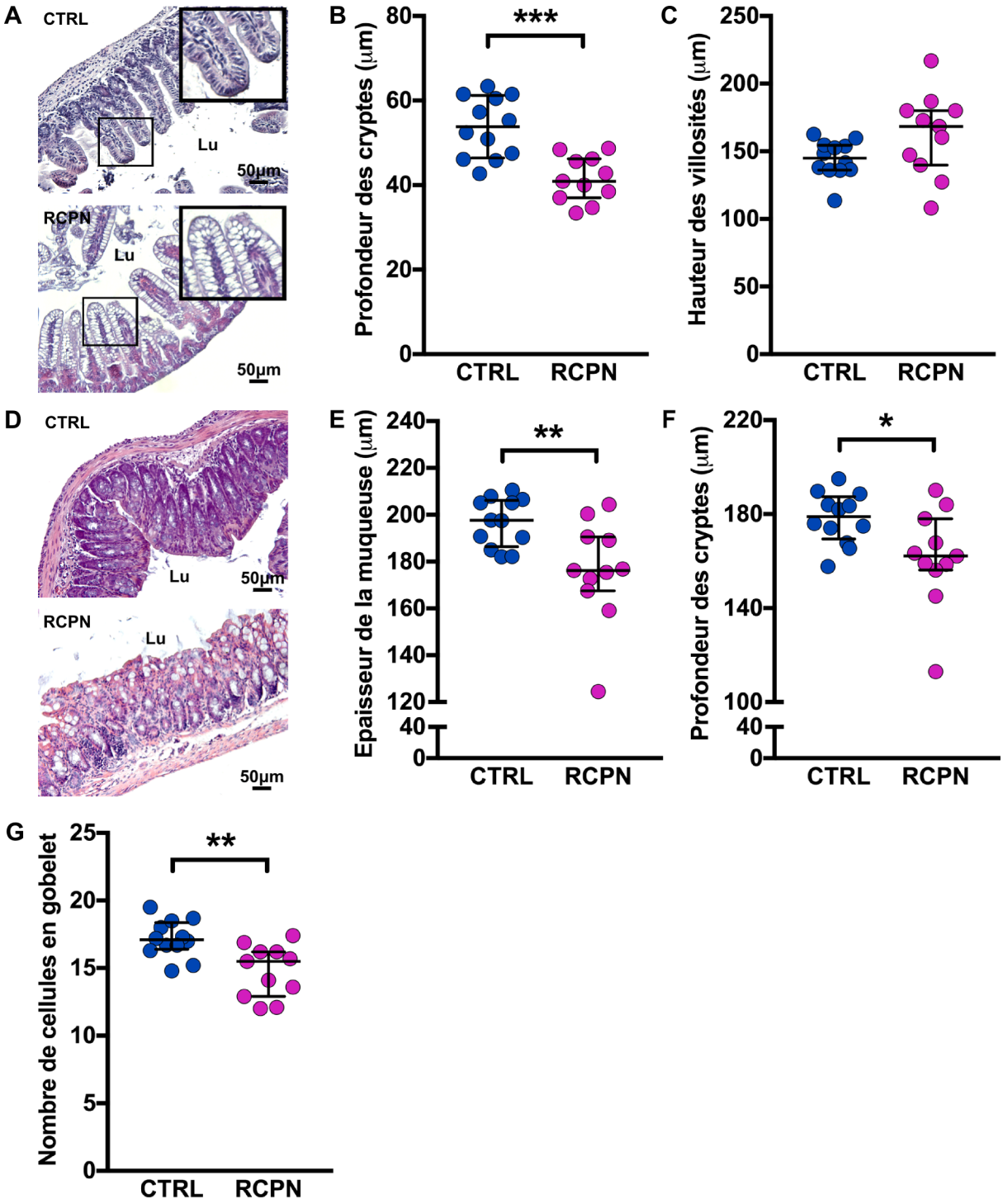


Figure 3. Le retard de croissance postnatal altère la morphogénèse de l'iléon et du côlon
(A) Coloration hématoxyline-éosine de coupes d'iléon montrant la présence d'entérocytes vacuolisés chez les souriceaux avec retard de croissance postnatal. (B) Profondeur des cryptes dans l'iléon (n = 11-12 par groupe, provenant de quatre portées). (C) Hauteur des villosités dans l'iléon (n = 11-12 par groupe, provenant de quatre portées). (D) Coloration hématoxyline-éosine de coupes de côlon. (E) Épaisseur de la muqueuse colique (n = 11-12 par groupe, provenant de quatre portées). (F) Profondeur des cryptes dans le côlon (n = 11-12 par groupe, provenant de quatre portées). (G) Nombre de cellules sécrétrices de mucus dans le côlon (n = 11-12 par groupe, provenant de quatre portées) *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001. *CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal ; Lu, lumière digestive.*

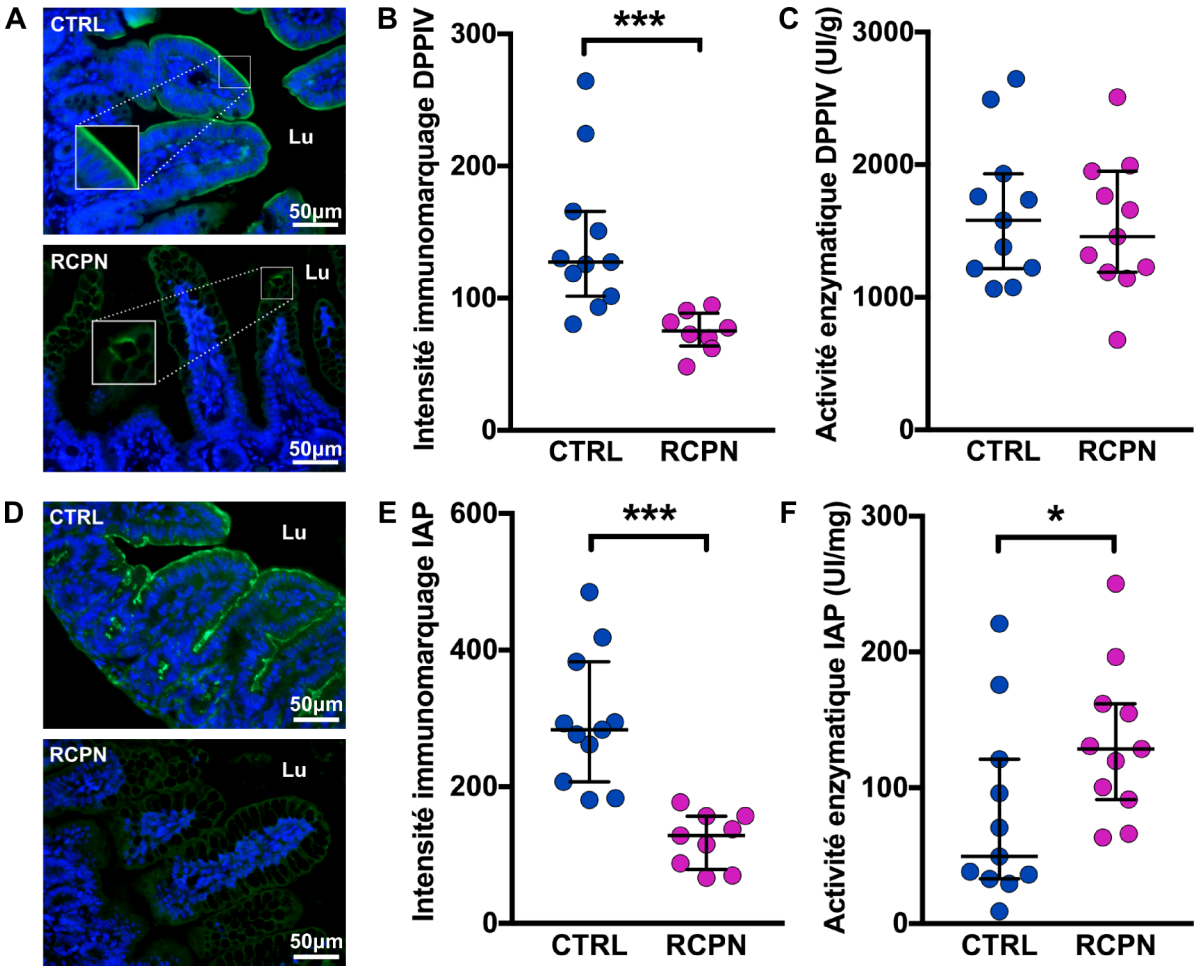


Figure 4. Le retard de croissance postnatal diminue l'expression des enzymes digestives à la bordure en brosse au sevrage

(A) Immunomarquage de la dipeptidyl-peptidase IV (DDPIV) dans l'iléon. (B) Comparaison de l'intensité de l'immunomarquage de DPPIV dans l'iléon (n = 8-11 par groupe, provenant de quatre portées). (C) Activité de DPPIV dans l'iléon (n = 11 par groupe, provenant de quatre portées). (D) Immunomarquage de la phosphatase alcaline intestinale (IAP) dans l'iléon. (E) Comparaison de l'intensité de l'immunomarquage de IAP dans l'iléon (n = 9-11 par groupe, provenant de quatre portées). (F) Activité de IAP dans l'iléon (n = 11 par groupe, provenant de quatre portées). *p<0,05 ; ***p<0,001. *DPPIV, dipeptidyl-peptidase IV ; IAP, phosphatase alcaline intestinale ; CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal ; Lu, lumière digestive.*

2.3. Le RCPN altère le profil de glycosylation de l'épithélium intestinal au sevrage

L'expression des glycoconjugués sialylés, mesurée par immunomarquage par la lectine MAA était diminuée chez les souriceaux avec RCPN dans l'iléon et le côlon (p = 0,0005 ; p <0,0001 respectivement) (figure 5A). L'expression des glycoconjugués fucosylés, mesurée par immunomarquage par la lectine UEA1, n'était pas différente entre les deux groupes dans l'iléon et le côlon (figure 5B).

2.4. Le RCPN altère la barrière intestinale au sevrage

Le RCPN était associé à une désorganisation de l'expression des protéines des jonctions serrées chez la souris au sevrage. La claudine 7 était exprimée normalement au niveau des cryptes iléales, mais prenait un aspect déformé en épingle à cheveux au niveau de l'épithélium villositaire (figure 6A). L'occludine, normalement présente le long de l'axe crypto-villositaire dans l'iléon mature, était exprimée uniquement au niveau des cryptes dans le groupe RCPN (figure 6B). Dans le côlon, l'expression de la claudine 7 n'était pas différente entre les deux groupes (figure 6A). L'occludine était moins exprimée dans le côlon des souriceaux avec RCPN (figure 6B).

Cette expression anormale des protéines des jonctions serrées était associée à une augmentation de la perméabilité intestinale paracellulaire, mesurée *in vivo* quatre heures après le gavage des souriceaux avec du dextran 4KDa-FITC (dextran-FITC sérique : 14,6 µg/ml (3,9-31,3) *vs* 0,9 µg/ml (0,8-1,2), p <0,0001) (figure 6C).

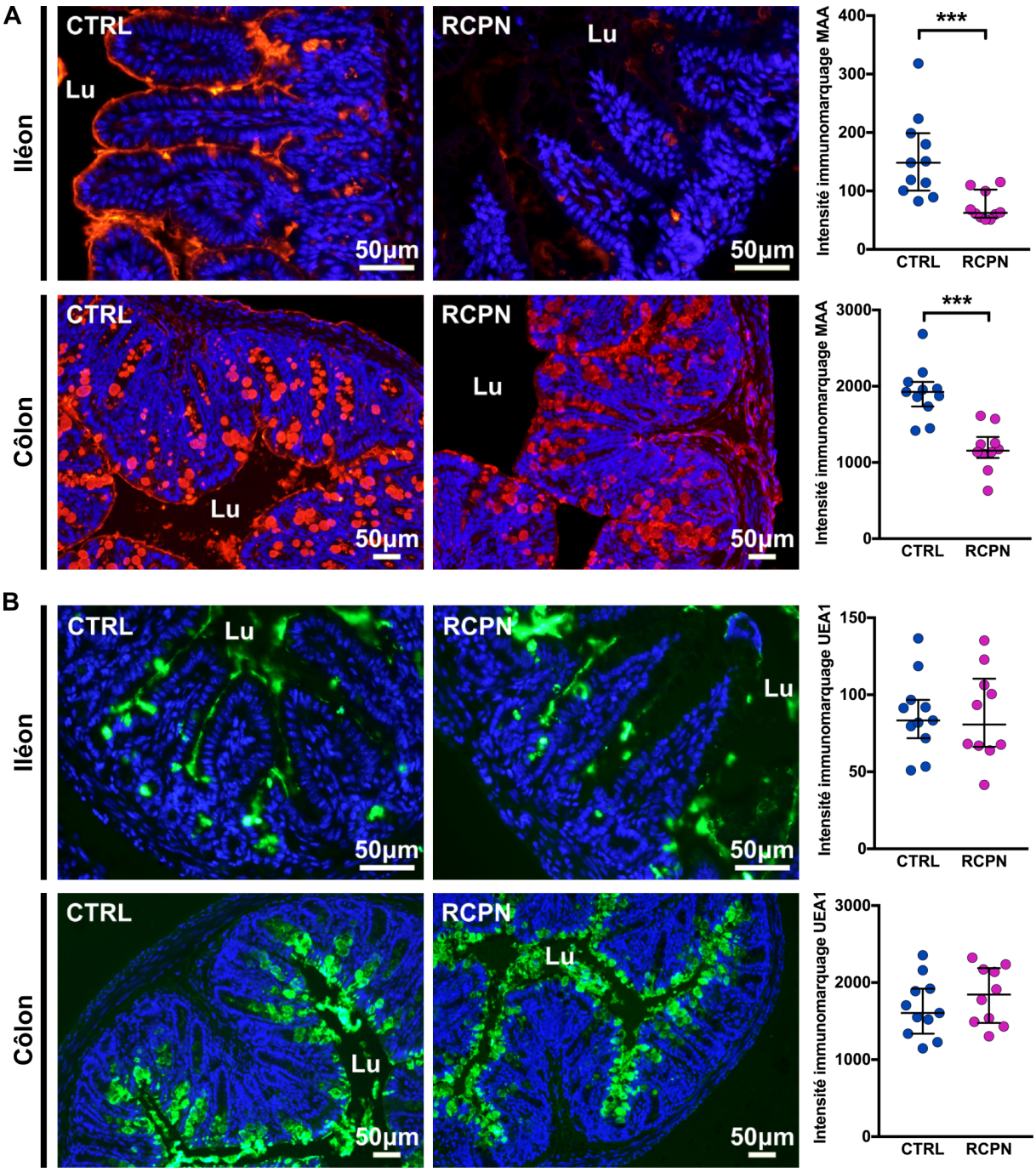


Figure 5. Le retard de croissance postnatal altère le profil de glycosylation de l'épithélium intestinal au sevrage

(A) Marquage des glycanes sialylés par la lectine MAA dans l'iléon et le côlon et comparaison de l'intensité du marquage (n = 10-11 par groupe, provenant de quatre portées). (B) Marquage des glycanes fucosylés par la lectine UEA1 dans l'iléon et le côlon et comparaison de l'intensité du marquage (n = 10-11 par groupe, provenant de quatre portées). ***p<0,001. *MAA, Maackia amurensis agglutinin ; UEA1, Ulex europaeus agglutinin 1 ; CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal ; Lu, lumière digestive.*

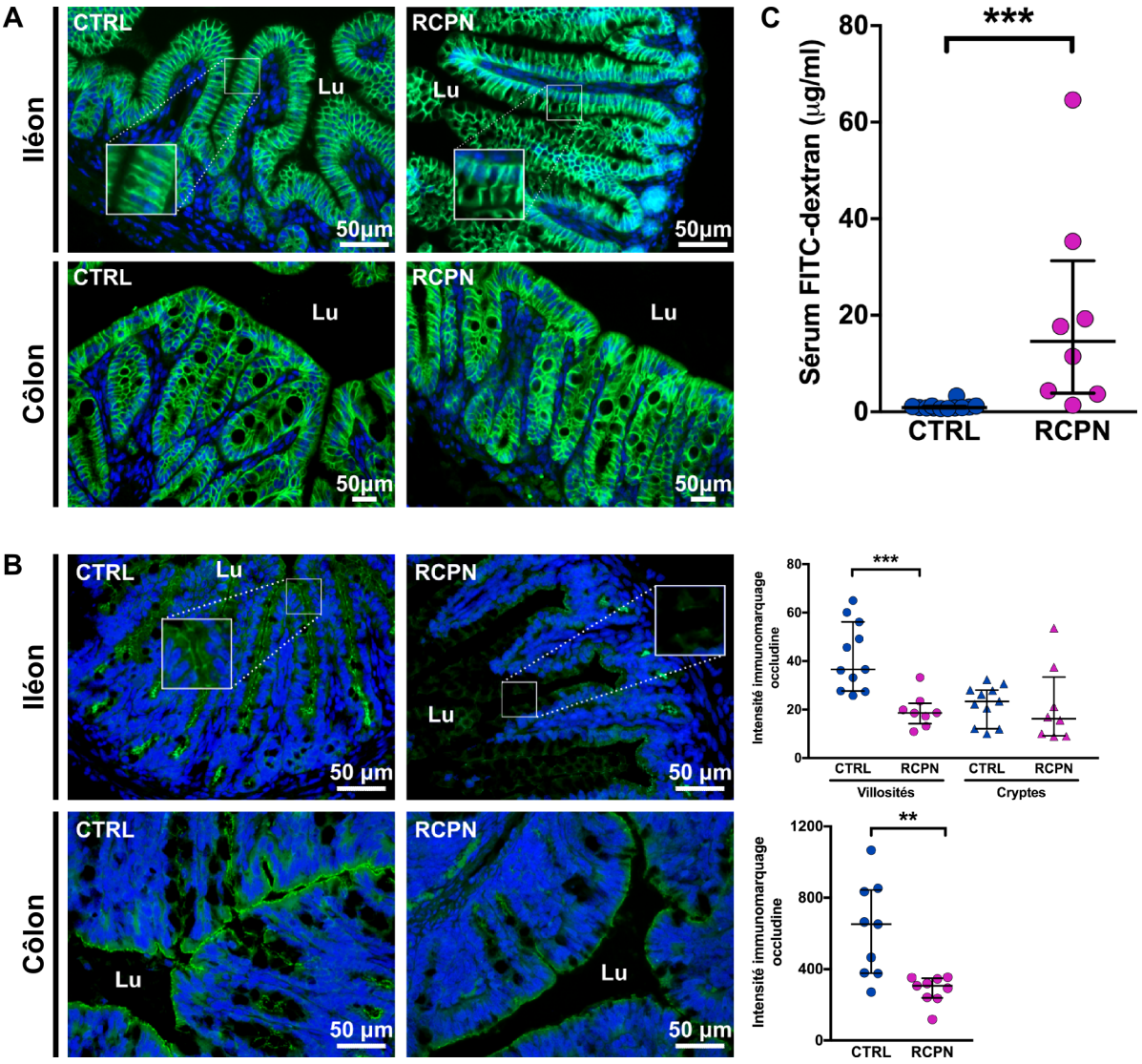


Figure 6. Le retard de croissance postnatal altère la barrière intestinale au sevrage
(A) Immunomarquage de la claudine 7 dans l'iléon et le côlon (n = 9-11 par groupe, provenant de quatre portées). (B) Immunomarquage de l'occludine dans l'iléon et le côlon (n = 8-11 par groupe, provenant de quatre portées) et comparaison de l'intensité de l'immunomarquage. (C) Concentration de dextran-FITC 4KDa dans le sérum mesurée quatre heures après le gavage des souriceaux avec une solution de dextran - FITC à la concentration de 88 mg/mL (n = 8-12 par groupe, provenant de quatre portées). ***p*<0,01 ; ****p*<0,001. *CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal ; Lu, lumière digestive.*

2.5. Le RCPN est responsable d'une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon au sevrage

L'expression des cytokines pro-inflammatoires était augmentée dans le côlon des souriceaux avec RCPN : TNF-α (104,8 pg/mL/mg protéines (89,3-329,5) *vs* 0,0 pg/mL/mg protéines (0,0-0,95), p <0,0001) (figure 7H), IL-1β (58,6 pg/mL/mg protéines (38,5-134,5) *vs* 35,7 pg/mL/mg protéines (32,8-47,5), p = 0,01) (figure 7I) et IL-6 (11,0 pg/mL/mg protéines (7,8-35,8) *vs* 5,0 pg/mL/mg protéines (3,6-6,8), p = 0,003) (figure 7J). L'expression des cytokines associées à la réponse immunitaire Th17 (IL-17) (figure 7L) et Treg (IL-10) (figure 7K) n'était pas différente entre les deux groupes. Dans l'iléon, seule l'expression de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α était augmentée dans le groupe RCPN (39,0 pg/mL/mg protéines (34,1-83,5) *vs* 3,5 pg/mL/mg protéines (0,0-6,1), p <0,0001) (figure 7B).

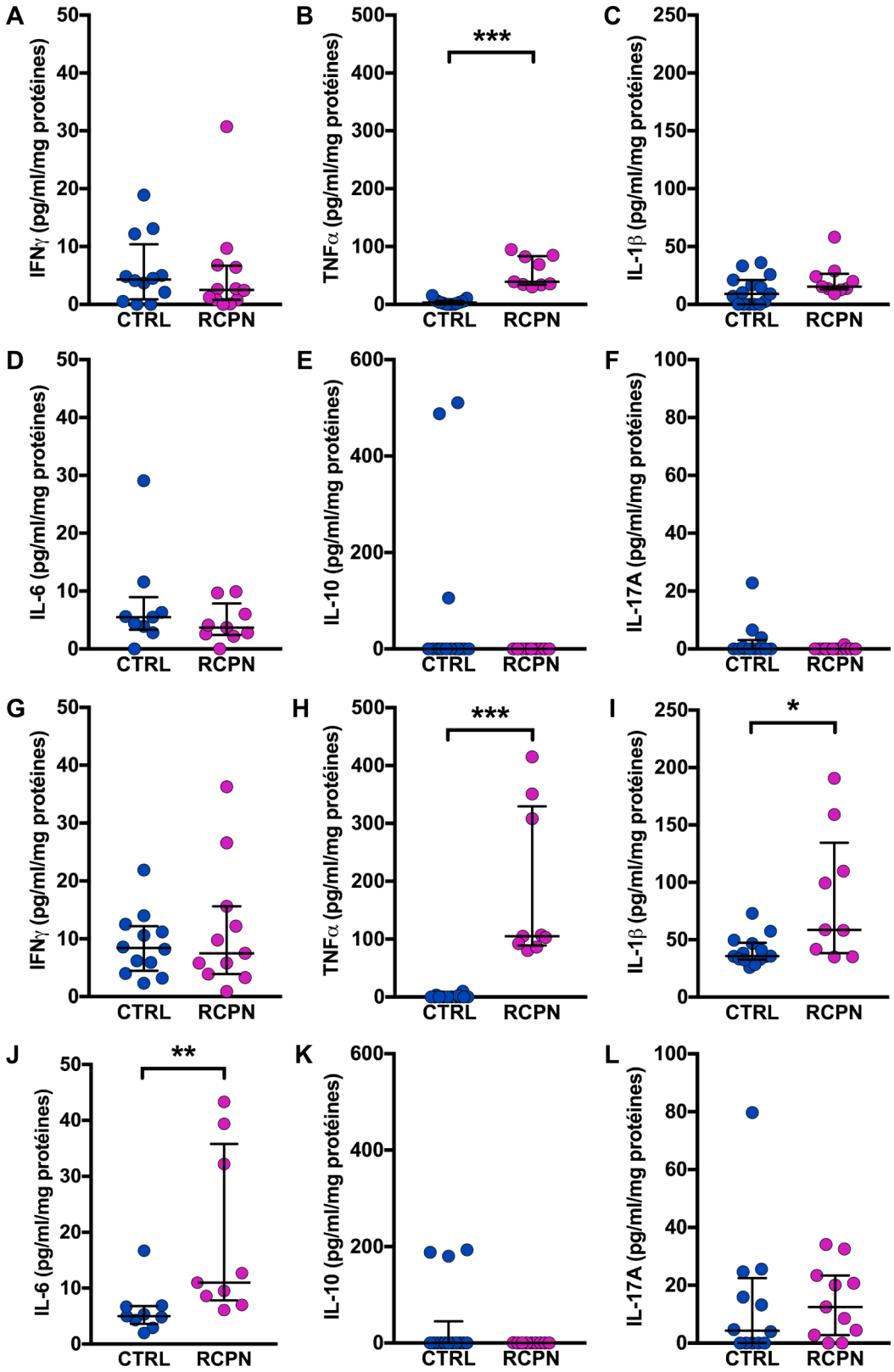


Figure 7. Le retard de croissance postnatal est responsable d'une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon au sevrage
(A-F) Expression des cytokines dans l'iléon mesurée par ELISA (n = 9-15 par groupe, provenant d'au moins quatre portées). (G-L) Expression des cytokines dans le côlon mesurée par ELISA (n = 9-15 par groupe, provenant d'au moins quatre portées). *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001. *CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal.*

3. Impact à long terme du RCPN sur la santé intestinale

L'impact du RCPN sur la structure, les fonctions de digestion et de barrière de l'intestin, et sur la susceptibilité à une colite chimiquement induite, était étudié chez la souris adulte (PN60).

3.1. Le RCPN modifie à long terme la structure de l'iléon et du côlon

À l'âge adulte, les cryptes dans l'iléon étaient plus profondes chez les animaux avec RCPN (98,0 µm (93,5-102,7) *vs* 83,4 µm (79,4-91,1), p = 0,002) (figures 8A et 8B). Les villosités iléales était plus hautes (186,3 µm (177,1-191,5) *vs* 166,8 µm (141,0-172,3), p = 0,001) (figures 8A et 8C). L'épaisseur de la muqueuse colique était augmentée chez les souris adultes avec RCPN (194,6 µm (188,6-203,6) *vs* 179,0 µm (170,7-187,3), p = 0,002) (figures 8D et 8E). Les cryptes coliques étaient plus profondes (164,9 µm (158,7-175,2) *vs* 149,3 µm (137,8-160,6), p = 0,0005) (figures 8D et 8F). Le nombre de cellules en gobelet n'était pas différent dans l'iléon ni dans le côlon entre les deux groupes.

3.2. Le RCPN modifie à long terme l'activité des enzymes digestives de la bordure en brosse

L'expression de DPPIV (figures 9A et 9B) et de IAP (figure 9D et 9E) à la bordure en brosse dans l'iléon n'était pas différente entre les deux groupes à l'âge adulte.

Par contre, l'activité de DPPIV était diminuée dans l'iléon des animaux avec RCPN (1184 UI/g (1120-1337) *vs* 1690 UI/g (1411-1925), p = 0,003) (figure 9C), de même que l'activité de IAP (23,8 UI/mg (20,8-25,5) *vs* 33,0 UI/mg (24,9-43,0), p = 0,02) (figure 9F).

3.3. Le RCPN modifie à long terme le profil de glycosylation de l'épithélium intestinal

L'expression des glycoconjugués sialylés, mesurée par immunomarquage par la lectine MAA était diminuée dans l'iléon des animaux adultes avec RCPN (p = 0,02) (figure 10A). L'expression des glycoconjugués fucosylés, mesurée par immunomarquage par la

lectine UEA1, n'était pas différente entre les deux groupes dans l'iléon et le côlon (figure 10B).

3.4. Le RCPN est associé à une perméabilité intestinale normale à l'âge adulte

La claudine 7 était moins exprimée au niveau des cryptes et des villosités iléales chez les souris adultes avec RCPN (figure 11A). Dans le côlon, l'expression de la claudine 7 n'était pas différente entre les deux groupes (figure 11A). L'expression de l'occludine n'était pas différente entre les deux groupes dans l'iléon et le côlon (figure 11B).

La perméabilité intestinale paracellulaire, mesurée *in vivo* quatre heures après le gavage des souris avec du dextran 4KDa-FITC, n'était pas différente entre les deux groupes (dextran-FITC sérique : 1,5 µg/mL (1,8-2,1) *vs* 1,3 µg/mL (1,0-1,6), p = 0,23) (figure 11C).

3.5. Le RCPN augmente la susceptibilité à une colite chimiquement induite à l'âge adulte

Dans l'iléon, l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β était augmentée dans le groupe RCPN (126,3 pg/mL/mg protéines (101,9-301,2) *vs* 72,0 pg/mL/mg protéines (56,2-91,9), p = 0,007) (figure 12C), de même que les cytokines IL-10 (407,0 pg/mL/mg protéines (11,9-649,2) *vs* 6,0 pg/mL/mg protéines (0,0-21,5), p = 0,04) (figure 12E) et IL-17 (40,3 pg/mL/mg protéines (26,3-139,1) *vs* 21,0 pg/mL/mg protéines (13,0-28,5), p = 0,01) (figure 12F). L'expression des cytokines associées à la réponse immunitaire Th1 était augmentée dans le côlon : IFN-γ (430 pg/mL/mg protéines (324,9-668,1) *vs* 42,1 pg/mL/mg protéines (26,8-103,4), p = 0,009) (figure 12G); TNF-α (103,4 pg/mL/mg protéines (60,5-140,1) *vs* 0,0 pg/mL/mg protéines (0,0-9,5), p = 0,02) (figure 12H) ; de même que l'expression des cytokines associées à la réponse immunitaire Th17 (IL-17 : 63,4 pg/mL/mg protéines (43,4-79,4) *vs* 5,4 pg/mL/mg (1,1-46,0), p = 0,02) (figure 12L) et Treg (IL-10 : 773,2 pg/mL/mg protéines (455,9-934,5) *vs* 145,3 pg/mL/mg protéines (0,0-408,4), p = 0,02) (figure 12K). L'expression de IL-6, associée à la réponse immunitaire Th2, n'était pas différente entre les deux groupes (figure 12J).

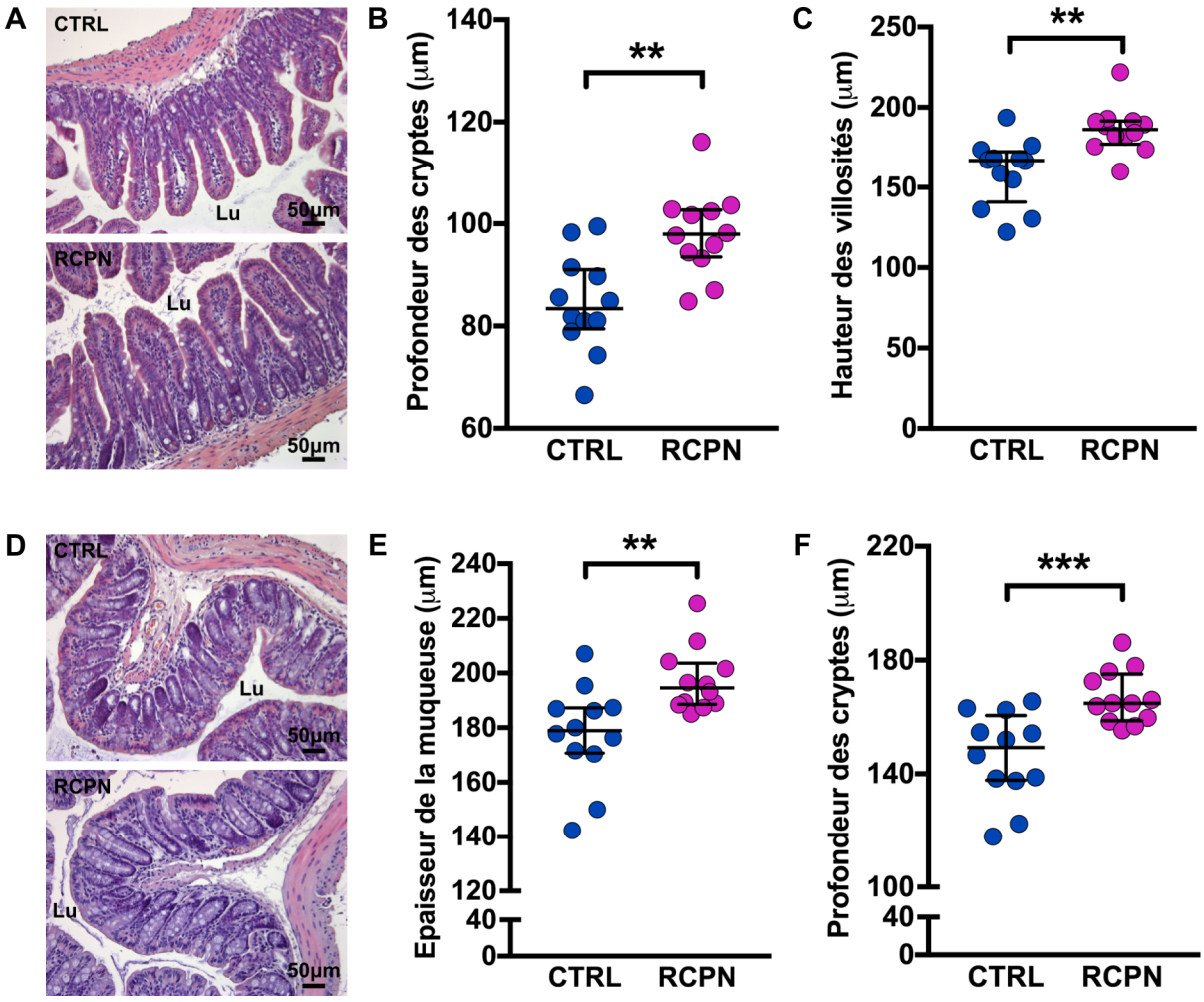


Figure 8. Le retard de croissance postnatal modifie la structure de l'iléon et du côlon à l'âge adulte

(A) Coloration hématoxyline-éosine de coupes d'iléon. (B) Profondeur des cryptes dans l'iléon (n = 12 par groupe, provenant de quatre portées). (C) Hauteur des villosités iléales (n = 12 par groupe, provenant de quatre portées). (D) Coloration hématoxyline-éosine de coupes de côlon. (E) Épaisseur de la muqueuse colique (n = 12 par groupe, provenant de quatre portées). (F) Profondeur des cryptes dans le côlon (n = 12 par groupe, provenant de quatre portées). ***p*<0,01 ; ****p*<0,001. *CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal ; Lu, lumière digestive.*

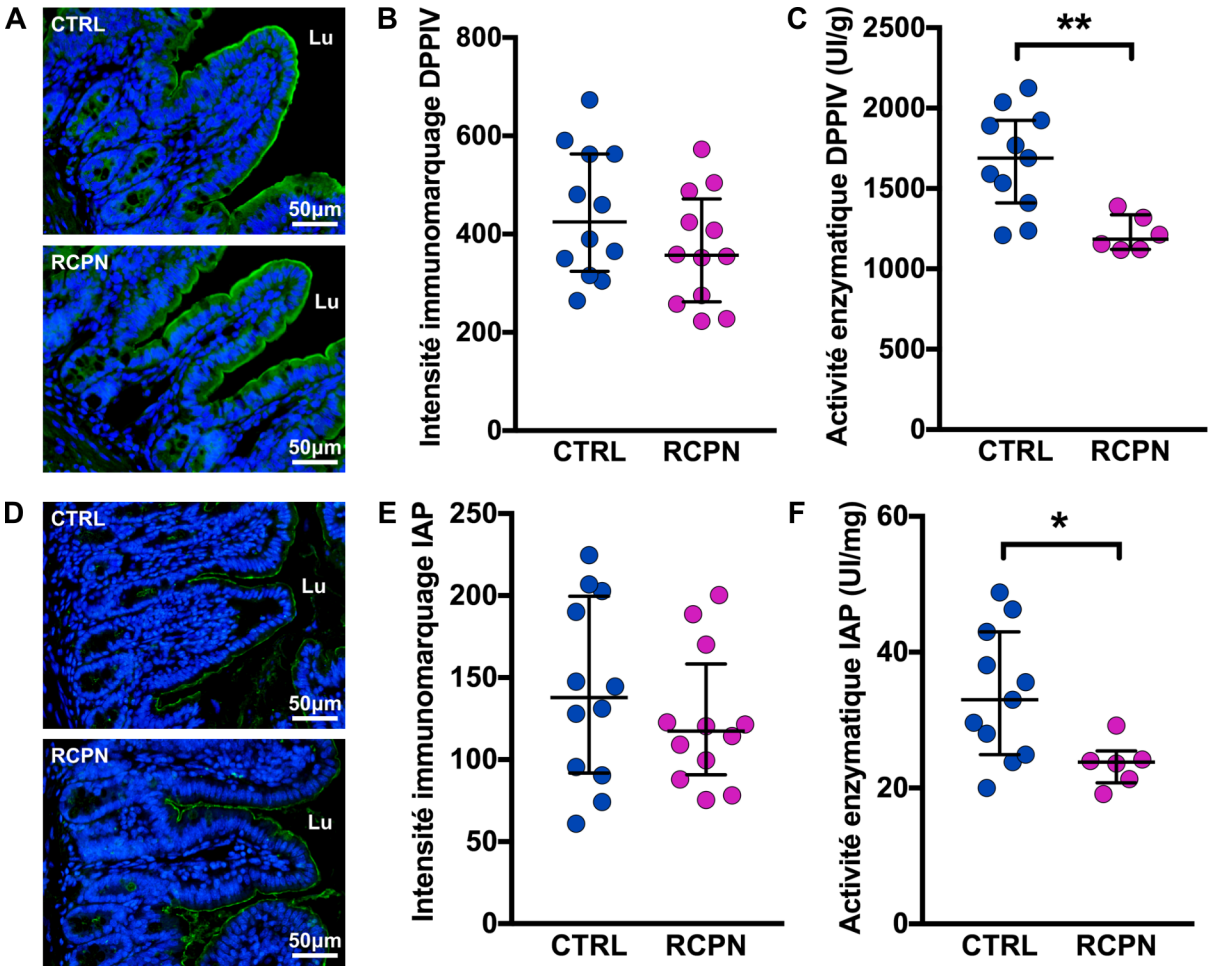


Figure 9. Le retard de croissance postnatal modifie l'activité des enzymes digestives de la bordure en brosse à l'âge adulte

(A) Immunomarquage de la dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV) dans l'iléon. (B) Comparaison de l'intensité de l'immunomarquage de DPPIV (n = 12 par groupe, provenant de quatre portées). (C) Activité de DPPIV dans l'iléon (n = 6-11 par groupe, provenant d'au moins deux portées). (D) Immunomarquage de la phosphatase alcaline intestinale (IAP) dans l'iléon. (E) Comparaison de l'intensité de l'immunomarquage de IAP (n = 12 par groupe, provenant de quatre portées). (F) Activité de IAP dans l'iléon (n = 6-11 par groupe, provenant d'au moins deux portées). *p<0,05 ; **p<0,01. *DPPIV, dipeptidyl-peptidase IV ; IAP, phosphatase alcaline intestinale ; CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal ; Lu, lumière digestive.*

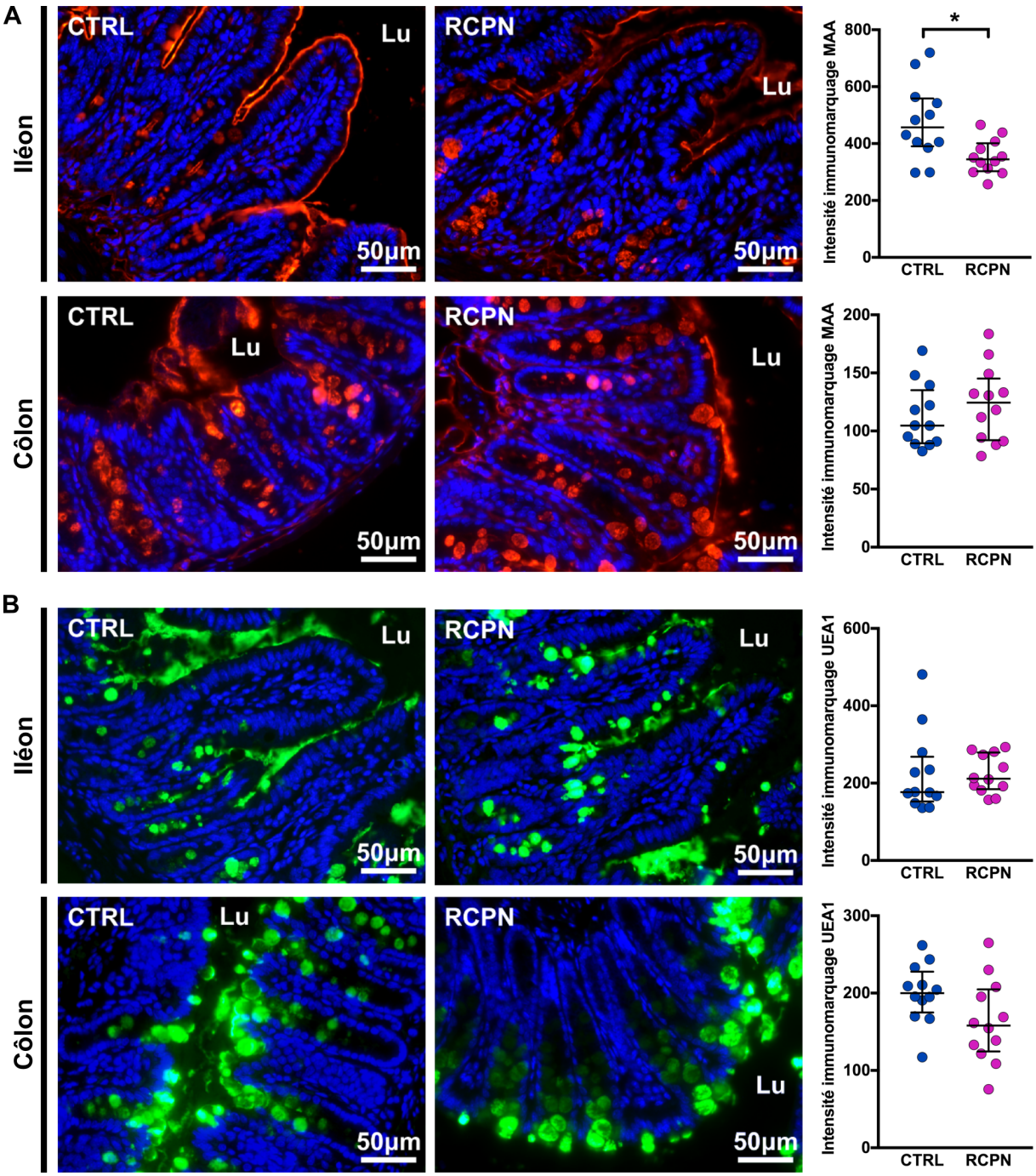


Figure 10. Le retard de croissance postnatal modifie le profil de glycosylation de l'épithélium intestinal à l'âge adulte

(A) Marquage des glycanes sialylés par la lectine MAA dans l'iléon et le côlon et comparaison de l'intensité du marquage (n = 12 par groupe, provenant de quatre portées). (B) Marquage des glycanes fucosylés par la lectine UEA1 dans l'iléon et le côlon et comparaison de l'intensité du marquage (n = 12 par groupe, provenant de quatre portées). ***p<0,001. *MAA, Maackia amurensis agglutinin ; UEA1, Ulex europaeus agglutinin 1 ; CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal ; Lu, lumière digestive.*

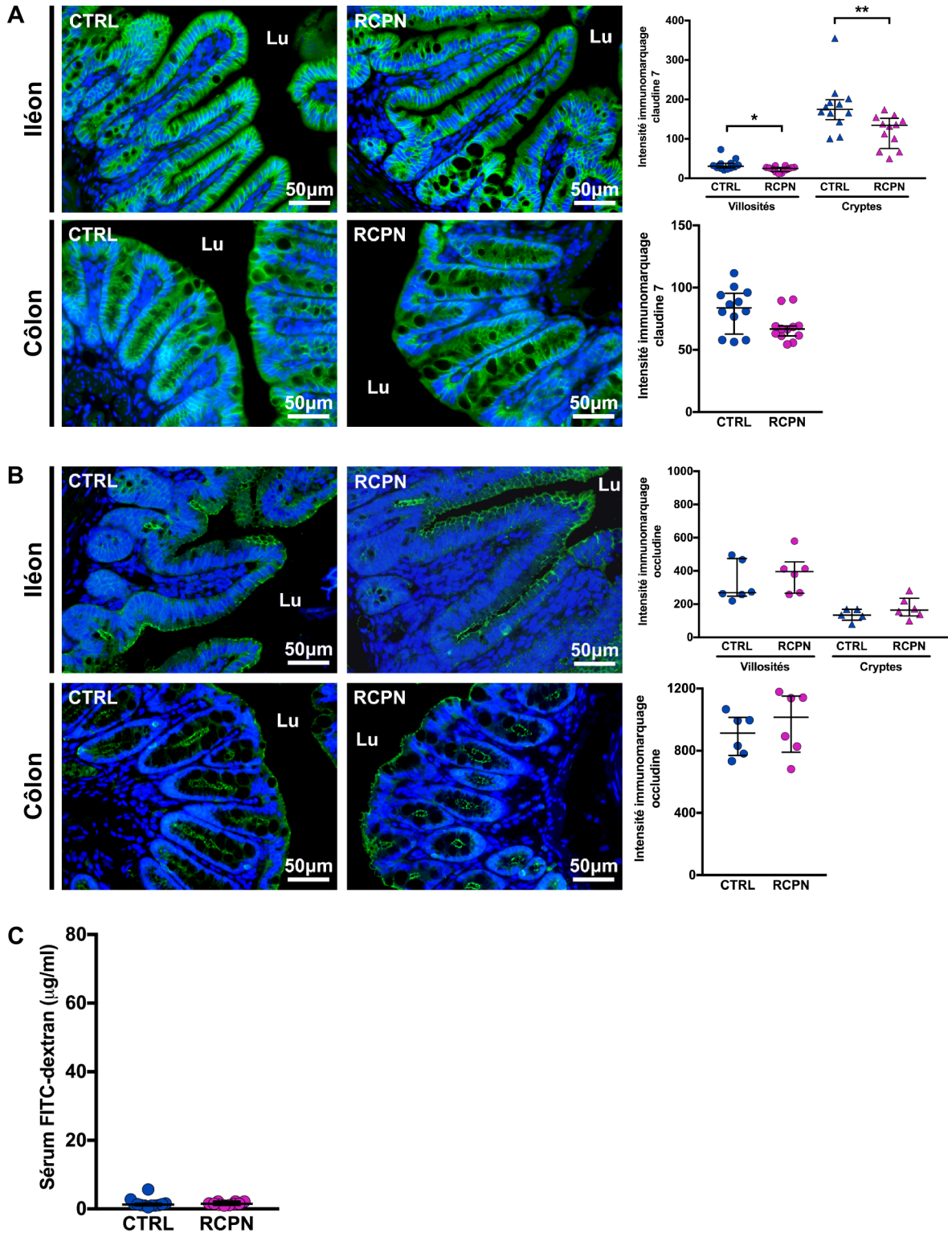


Figure 11. Le retard de croissance postnatal est associé à une perméabilité intestinale normale à l'âge adulte

(A) Immunomarquage de la claudine 7 dans l'iléon et le côlon et comparaison de l'intensité de l'immunomarquage (n = 12 par groupe, provenant de quatre portées). (B) Immunomarquage de l'occludine dans l'iléon et le côlon et comparaison de l'intensité de l'immunomarquage (n = 6 par groupe, provenant de trois portées). (C) Concentration de dextran-FITC 4KDa dans le sérum mesurée quatre heures après le gavage des souris avec une solution de dextran - FITC à la concentration de 88 mg/mL (n = 10-12 par groupe, provenant de quatre portées). *p<0,05 ; **p<0,01. *CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal ; Lu, lumière digestive.*

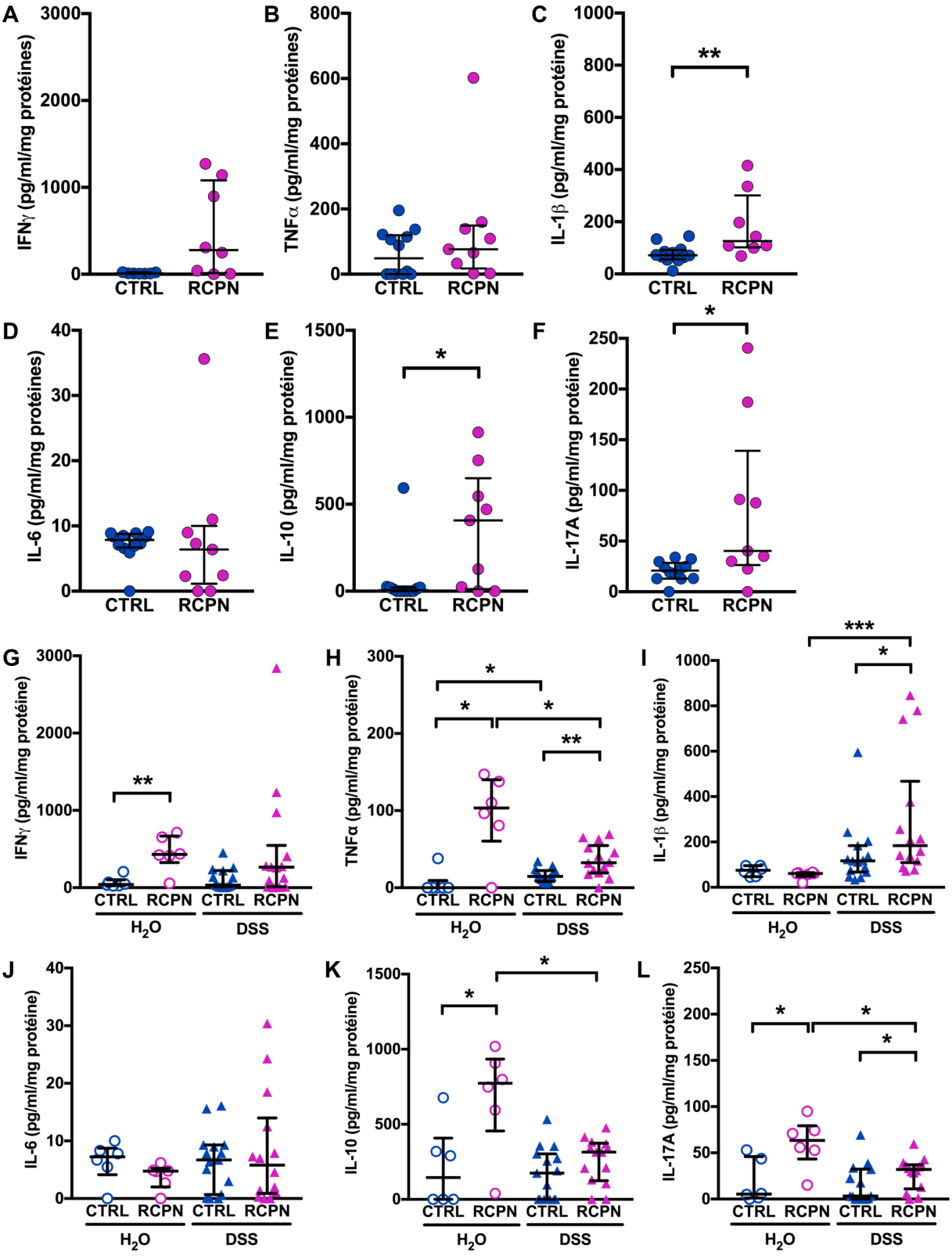


Figure 12. Le retard de croissance postnatal modifie la réponse inflammatoire de l'intestin à l'âge adulte

(A-F) Expression des cytokines dans l'iléon mesurée par ELISA (n = 8-12 par groupe, provenant d'au moins trois portées). (G-L) Expression des cytokines dans le côlon mesurée par ELISA (n = 6-15 par groupe, provenant d'au moins trois portées). *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001. *CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal.*

L'induction d'une colite chronique au DSS 3 % à l'âge adulte était responsable d'une perte de poids significative dans les deux groupes. Cette perte de poids était maximale à J9, après le premier cycle de DSS, et était plus importante chez les animaux CTRL (RCPN-DSS : -8,5 % ((-13,8)-(-1,5)) *vs* CTRL-DSS : -16 % ((-19,2)-(8-,7)), p = 0,03). Après J9, les animaux des deux groupes reprenaient du poids, mais de façon plus rapide chez les animaux avec RCPN, puisque ces derniers rattrapaient un poids normal dès J14, contre J28 pour les animaux CTRL (figure 13A). Chez les animaux n'ayant pas reçu de DSS, la masse du côlon était plus faible dans le groupe RCPN (0,024 g/cm (0,022-0,024) *vs* 0,027 g/cm (0,025-0,034), p = 0 ,02). L'augmentation de la masse du côlon après induction d'une colite chronique au DSS 3 % n'était pas différente entre les deux groupes (figure 13B). Le score histologique de sévérité de la colite était plus important chez les animaux avec RCPN (8,0 (7,0-9,5) *vs* 5,5 (4,0-8,0), p = 0,02) (figures 13C et 13D). Au terme des trois cycles de DSS, seule l'expression de la cytokine TNF-α était encore augmentée chez les animaux CTRL (CTRL-DSS : 14,7 pg/mL/mg protéines (8,1-22,4) *vs* CTRL-H_2O : 0,0 pg/mL/mg protéines (0,0-9,5), p = 0,02). L'expression des cytokines pro-inflammatoires était plus importante dans le groupe RCPN après induction de la colite : TNF-α (RCPN-DSS : 32,5 pg/mL/mg protéines (19,1-54,7) *vs* CTRL-DSS : 14,7 pg/mL/mg protéines (8,1-22,4), p = 0,006) (figure 12H), et IL-1β (RCPN-DSS : 183,8 pg/mL/mg protéines (109,3-467,6) *vs* CTRL-DSS : 117,0 pg/mL/mg protéines (67,4-183,5), p = 0,04) (figure 12I). L'expression de la cytokine IL-10 (RCPN-DSS : 314,6 pg/mL/mg protéines (124,4-374,3) *vs* RCPN-H_2O : 773,2 pg/mL/mg protéines (455,9-934,5), p = 0,01) (figure 12K), de même que l'expression de la cytokine IL-17 (32,0 pg/mL/mg protéines (11,1-37,1) *vs* 3,2 pg/mL/mg protéines (0,0-32,4), p = 0,04) (figure 12L), diminuaient chez les animaux avec RCPN au terme des trois cycles de DSS.

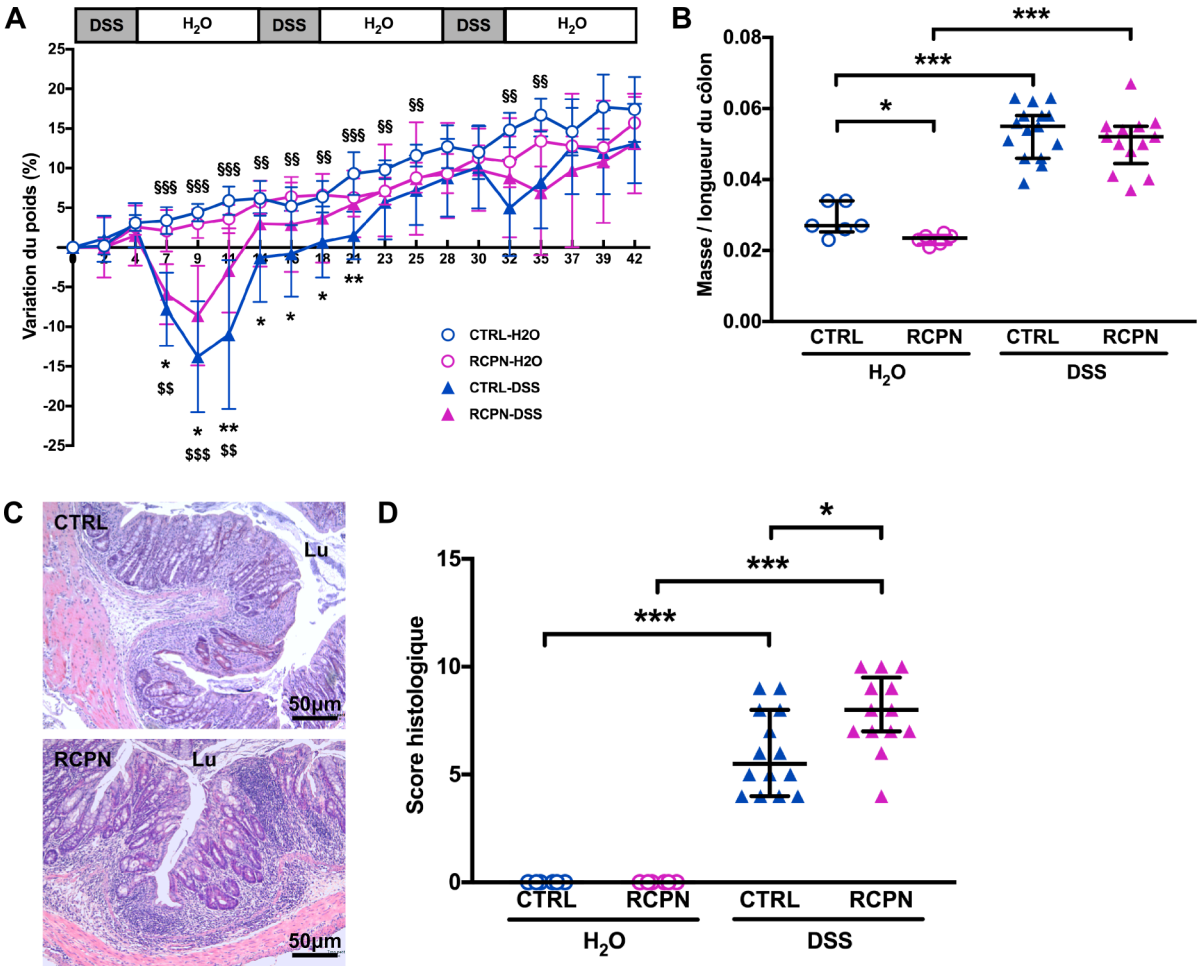


Figure 13. Le retard de croissance postnatal augmente la susceptibilité à une colite chimiquement induite à l'âge adulte

Les animaux contrôles (n = 15, provenant de cinq portées) et les animaux avec RCPN (n = 14, provenant de quatre portées) recevaient du DSS 3 % via l'eau de boisson pendant trois cycles de cinq jours entrecoupés d'un intervalle libre de sept jours entre chaque cycle. (A) Variation du poids. **p*<0,05 ; ***p*<0,01, RCPN-DSS *vs* CTRL-DSS. $^{\$\$}$*p*<0,01 ; $^{\$\$\$}$*p*<0,001, RCPN-DSS *vs* RCPN-H_2O. §§*p*<0,01 ; §§§*p*<0,001, CTRL-DSS *vs* CTRL-H_2O. (B) Masse du côlon. **p*<0,05 ; ***p*<0,01 ; ****p*<0,001 (C) Coloration hématoxyline-éosine de coupes de côlon provenant d'animaux ayant reçu du DSS 3 %. (D) Score histologique. **p*<0,05 ; ***p*<0,01 ; ****p*<0,001. *CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal, Lu, lumière digestive.*

4. Le RCPN modifie la colonisation bactérienne de l'intestin

Le nombre médian de séquences par échantillon était de 66397 (58818-76509), correspondant à 2075 OTU. La mesure de la diversité alpha montrait une augmentation de la richesse en espèces bactériennes du microbiote fécal entre PN21 et PN60 dans les deux groupes. La richesse du microbiote fécal était moindre à PN21 en cas de RCPN. À l'âge adulte, la richesse du microbiote fécal n'était pas différente entre les deux groupes (figure 14A). La composition globale du microbiote fécal, mesurée par la distance Unifrac pondérée, était différente entre les deux groupes à PN21 (figure 14B), alors qu'à l'âge adulte le microbiote fécal des animaux avec RCPN apparaissait superposable au microbiote fécal du groupe CTRL (figure 14C). L'abondance relative des groupes d'espèces bactériennes était en faveur d'un microbiote fécal plus distinct entre les deux groupes à PN21 par rapport à PN60 (tableau 2). Trente-deux groupes d'espèces bactériennes avaient un profil d'évolution entre PN21 et PN60 similaire entre les deux groupes (tableau 2). Sept groupes avaient un développement inverse au cours du temps dans le groupe RCPN par rapport au groupe CTRL. *Odoribacter* spp (Bacteroidetes), et certains genres de l'embranchement des Firmicutes, principalement ceux appartenant à la famille des Lachnospiraceae, étaient moins abondants à PN21, puis augmentaient à PN60, inversement à ce qui était observé dans le groupe CTRL (figure 14D). Par ailleurs, certains groupes bactériens augmentaient au cours du temps dans le groupe CTRL mais pas dans le groupe RCPN : *Atopobium* spp, certains membres de la famille des Ruminococcaceae (groupe NK4A214, UCG-005, UCG-010, et UCG-013), *Turicibacter* spp, et *Bilophila* spp. À l'inverse, *Candidatus Arthromitus* spp augmentait à PN60 dans le groupe RCPN uniquement (figure 14D), et le groupe Family XIII *Eubacterium nodatum* (Firmicutes), ainsi que *Desulfovibrio* spp (Proteobacteria), diminuaient au cours du temps dans le groupe RCPN uniquement (tableau 2). Parmi les Firmicutes, cinq genres bactériens avaient un développement prématuré dans le groupe RCPN par rapport au groupe CTRL. Trois groupes avaient une abondance déjà faible à PN21 telle qu'observée dans le groupe CTRL à PN60 (*Bacillus* spp, Lachnospiraceae UCG-010, et un genre Lachnospiraceae non cultivé) (tableau 2), alors que *Intestinimonas* spp et *Lachnoclostridium*

spp étaient déjà à PN21 au taux élevé observé à PN60 dans le groupe CTRL (tableau 2). Six genres étaient anormalement présents à des taux élevés à PN21 dans le groupe RCPN : *Parabacteroides* spp, *Enterococcus* spp, *Erysipelatoclostridium* spp, *Eubacterium coprostanoligenes* spp, *Staphylococcus* spp, et *Escherichia-Shigella* spp (figure 14E). Un genre Lachnospiraceae, non connu dans la base de données SILVA, avait une abondance faible à PN21 dans le groupe RCPN par rapport au groupe CTRL.

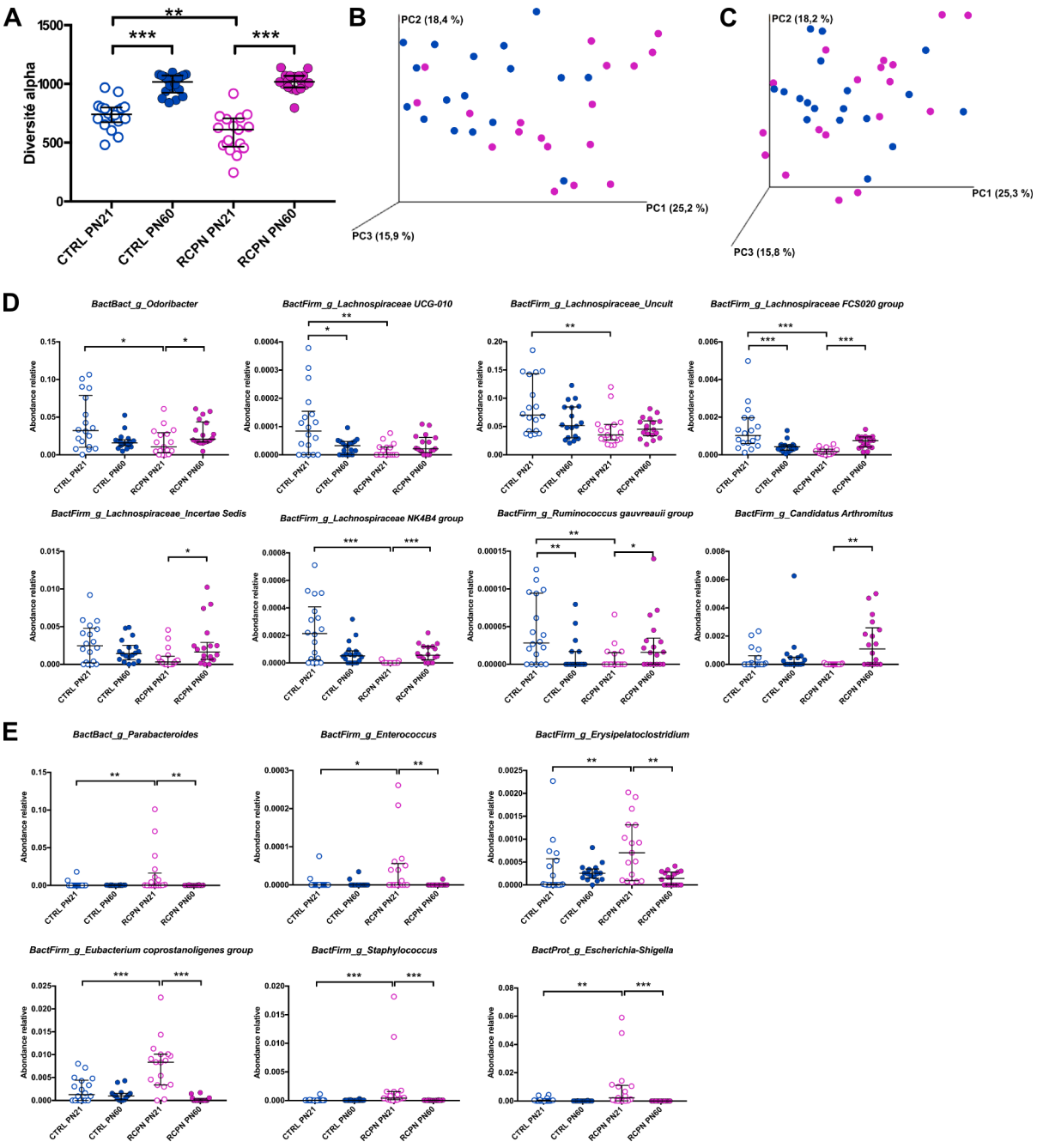


Figure 14. Le retard de croissance postnatal modifie la colonisation bactérienne de l'intestin
(A) Diversité alpha selon l'indice Chao1 du microbiote fécal (n = 17-18 par groupe, provenant de six portées). (B) Distance phylogénétique entre les échantillons de microbiote fécal à PN21 (n = 17-18 par groupe, provenant de six portées). (C) Distance phylogénétique entre les échantillons de microbiote fécal à PN60 (n = 17-18 par groupe, provenant de six portées). (D) Genres bactériens dont l'abondance était diminuée à PN21 dans le groupe RCPN (n = 17-18 par groupe, provenant de six portées). (E) Genres bactériens anormalement présents à un taux élevé à PN21 dans le groupe RCPN (n = 17-18 par groupe, provenant de six portées). *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001. *CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe avec retard de croissance postnatal.*

Tableau 2. Profil taxonomique du microbiote fécal

Phylum	Genre	CTRL PN21 *vs* RCPN PN21				CTRL PN60 *vs* RCPN PN60				CTRL PN21 *vs* CTRL PN60		RCPN PN21 *vs* RCPN PN60		Description
		médiane RCPN	médiane CTRL	*p*	*q*	médiane RCPN	médiane CTRL	*p*	*q*	*p*	*q*	*p*	*q*	
Actinobacteria	*Atopobium*	0,0	0,0	0,50	0,26	0,0	0,0	0,22	0,36	**0,01**	**0,02**	0,44	0,17	Absence d'augmentation chez RCPN
Actinobacteria	*Coriobacteriaceae [Uncultured]*	6,18E-05	1,69E-05	0,06	0,07	0,00022	0,00035	0,36	0,44	**9,44E-06**	**7,82E-05**	**1,20E-05**	**2,95E-05**	Augmentation au cours du temps[c]
Actinobacteria	*Enterorhabdus*	0,00068	0,00125	0,19	0,16	0,00501	0,00394	0,13	0,26	**2,40E-05**	**0,00015**	**8,82E-10**	**1,41E-08**	Augmentation au cours du temps[c]
Bacteroidetes	*Bacteroidales S24-7 group [Other]*	0,0	0,0	0,32	0,21	3,35E-05	2,59E-05	0,92	0,70	**0,019**	**0,031**	**0,023**	**0,016**	Augmentation au cours du temps[c]
Bacteroidetes	*Alistipes*	0,04430	0,03529	0,30	0,20	0,06374	0,04161	0,009	0,080	0,19	0,18	**0,035**	**0,022**	Augmentation au cours du temps[b]
Bacteroidetes	*Bacteroidales S24-7 group [Uncultured]*	0,20150	0,25006	0,045	0,065	0,37349	0,39818	0,15	0,27	**1,54E-09**	**8,94E-08**	**2,24E-07**	**1,80E-06**	Augmentation au cours du temps[c]
Bacteroidetes	*Bacteroides*	0,18501	0,08674	**0,0005**	**0,003**	0,03746	0,03175	0,25	0,40	**1,12E-07**	**2,16E-06**	**3,09E-09**	**3,30E-08**	Diminution au cours du temps[c]; Plus élevé à PN21 chez RCPN
Bacteroidetes	*Odoribacter*	0,01048	0,03219	**0,011**	**0,024**	0,02065	0,01583	0,013	0,079	0,059	0,075	**0,038**	**0,023**	Développement inverse
Bacteroidetes	*Parabacteroides*	0,00039	0,0	**0,003**	**0,011**	0,0	2,03E-05	0,40	0,46	0,28	0,24	**0,006**	**0,005**	Elevé à PN21 chez RCPN
Bacteroidetes	*Porphyromonadaceae [Uncultured]*	0,0	0,0	0,63	0,30	4,04E-05	9,19E-05	0,052	0,15	**6,30E-06**	**6,09E-05**	**4,73E-06**	**1,38E-05**	Augmentation au cours du temps[c]
Bacteroidetes	*Rikenellaceae RC9 gut group*	0,04054	0,00748	0,22	0,17	0,01054	0,00479	0,027	0,11	0,10	0,11	**0,038**	**0,023**	Diminution au cours du temps[b]
Bacteroidetes	*Bacteroidales [Other]*	0,00010	0,00013	**0,014**	**0,028**	0,00073	0,00064	0,52	0,54	**2,14E-08**	**6,20E-07**	**7,99E-07**	**5,12E-06**	Augmentation au cours du temps[c]; Plus bas à PN21 chez RCPN
Unclassified	*Bacteria [Other]*	1,22E-05	9,05E-05	0,035	0,055	0,00033	0,00042	0,21	0,36	**0,0002**	**0,0007**	**6,53E-05**	**0,0001**	Augmentation au cours du temps[c]
Firmicutes	*Clostridiales vadinBB60 group [Other]*	4,89E-05	0,0	0,35	0,21	0,00150	0,00034	0,048	0,15	0,012	0,022	0,001	0,002	Augmentation au cours du temps[c]
Firmicutes	*Lachnospiraceae [Other]*	0,00054	0,00356	**0,001**	**0,005**	0,00253	0,00297	0,32	0,44	0,63	0,43	**4,01E-06**	**1,29E-05**	Diminué à PN21 chez RCPN
Firmicutes	*Anaerotruncus*	0,00483	0,00678	0,17	0,14	0,00209	0,00388	0,004	0,075	**0,003**	**0,007**	**0,002**	**0,002**	Diminution au cours du temps[c]
Firmicutes	*Bacillus*	0,0	1,74E-05	**0,004**	**0,011**	0,0	0,0	0,36	0,44	**0,016**	**0,028**	0,57	0,20	Diminution prématurée chez RCPN
Firmicutes	*Candidatus Arthromitus*	0,0	0,0	0,25	0,18	0,00108	1,59E-05	0,098	0,22	0,65	0,43	**0,007**	**0,006**	Augmentation uniquement chez RCPN
Firmicutes	*Clostridiales vadinBB60 group [Uncultured]*	0,00082	0,00110	0,66	0,31	0,00324	0,00368	0,96	0,71	**0,001**	**0,004**	**0,004**	**0,004**	Augmentation au cours du temps[c]
Firmicutes	*Coprococcus 1*	0,00198	0,00206	0,81	0,35	0,00080	0,00092	0,41	0,46	**0,0007**	**0,003**	**0,013**	**0,011**	Diminution au cours du temps[c]
Firmicutes	*Enterococcus*	0,0	0,0	**0,022**	**0,039**	0,0	0,0	0,53	0,54	0,98	0,58	**0,005**	**0,005**	Elevé à PN21 chez RCPN
Firmicutes	*Erysipelatoclostridium*	0,00070	1,29E-05	**0,003**	**0,011**	0,00014	0,00025	0,043	0,15	0,16	0,15	**0,002**	**0,002**	Elevé à PN21 chez RCPN
Firmicutes	*Erysipelotrichaceae [Uncultured]*	6,18E-05	0,00016	0,40	0,23	0,00075	0,00145	0,11	0,22	**0,006**	**0,012**	**0,025**	**0,016**	Augmentation au cours du temps[c]

La valeur médiane de l'abondance relative de chaque genre bactérien est donnée pour chaque groupe à PN21 et à PN60. Une valeur de p < 0,05 et une valeur de q < 0,05 étaient considérées comme significatives. [a]Ev55olution au cours du temps significative dans le groupe CTRL uniquement, mais tendance à la même évolution dans le groupe RCPN ; [b]Evolution au cours du temps significative dans le groupe RCPN uniquement, mais tendance à la même évolution dans le groupe CTRL [c]Evolution au cours du temps significative et dans le même sens dans les deux groupes. CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe retard de croissance postnatal ; PN21, jour postnatal 21 ; PN60, jour postnatal 60.

Tableau 2 *(suite)*

Phylum	Genre	CTRL PN21 *vs* RCPN PN21				CTRL PN60 *vs* RCPN PN60				CTRL PN21 *vs* CTRL PN60		RCPN PN21 *vs* RCPN PN60		Description
		médiane RCPN	médiane CTRL	*p*	*q*	médiane RCPN	médiane CTRL	*p*	*q*	*p*	*q*	*p*	*q*	
Firmicutes	*Eubacterium coprostanoligenes group*	0,00836	0,00127	**0,0004**	**0,003**	0,0	0,00010	0,002	0,057	0,69	0,45	**2,10E-06**	**9,61E-06**	Elevé à PN21 chez RCPN
Firmicutes	*Eubacterium oxidoreducens group*	0,0	0,0	0,33	0,21	2,69E-05	1,64E-05	0,37	0,44	0,35	0,28	**0,0004**	**0,0006**	Augmentation au cours du temps[b]
Firmicutes	*Intestinimonas*	0,00065	0,00012	**0,023**	**0,039**	0,00087	0,00100	0,52	0,54	**0,032**	**0,049**	0,68	0,23	Augmentation prématurée chez RCPN
Firmicutes	*Lachnoclostridium*	0,00784	0,01151	0,17	0,14	0,00593	0,00545	0,61	0,56	**0,002**	**0,005**	0,13	0,064	Diminution au cours du temps[a]
Firmicutes	*Lachnoclostridium 5*	2,45E-05	0,0	**0,0006**	**0,003**	0,0	8,49E-06	0,78	0,66	**0,002**	**0,006**	0,26	0,11	Augmentation prématurée chez RCPN
Firmicutes	*Lachnospiraceae FCS020 group*	0,00018	0,00103	**9,02E-06**	**0,0004**	0,00075	0,00042	0,017	0,087	**0,0006**	**0,002**	**5,27E-05**	**0,0001**	Développement inverse
Firmicutes	*Lachnospiraceae NK4B4 group*	0,0	0,00021	**6,50E-05**	**0,0009**	5,56E-05	5,11E-05	0,55	0,54	0,037	0,052	**6,50E-05**	**0,0001**	Développement inverse
Firmicutes	*Lachnospiraceae UCG-001*	1,03E-05	0,00010	0,28	0,20	0,01930	0,01275	0,39	0,45	**3,95E-06**	**5,05E-05**	**1,89E-05**	**4,05E-05**	Augmentation au cours du temps[c]
Firmicutes	*Lachnospiraceae UCG-004*	0,0	0,00029	0,060	0,074	0,00054	0,00051	0,62	0,57	**0,024**	**0,037**	**0,002**	**0,002**	Augmentation au cours du temps[c]
Firmicutes	*Lachnospiraceae UCG-005*	0,0	4,88E-05	0,095	0,10	0,00034	0,00021	0,68	0,62	**0,005**	**0,012**	**0,003**	**0,003**	Augmentation au cours du temps[c]
Firmicutes	*Lachnospiraceae UCG-006*	0,00139	0,00067	0,55	0,28	0,00247	0,00203	0,37	0,44	**0,013**	**0,023**	**0,004**	**0,004**	Augmentation au cours du temps[c]
Firmicutes	*Lachnospiraceae UCG-010*	0,0	8,40E-05	**0,004**	**0,011**	2,12E-05	3,22E-05	0,79	0,66	**0,035**	**0,050**	0,063	0,034	Diminution prématurée chez RCPN
Firmicutes	*Lachnospiraceae Incertae Sedis*	0,00032	0,00247	0,044	0,065	0,00163	0,00143	0,70	0,63	0,39	0,31	**0,013**	**0,011**	Développement inverse
Firmicutes	*Lachnospiraceae [Uncultured]*	0,03506	0,070182	**0,002**	**0,007**	0,04509	0,05166	0,37	0,44	0,10	0,11	0,22	0,096	Diminution prématurée chez RCPN
Firmicutes	*Marvinbryantia*	0,00129	0,00198	0,23	0,17	0,006	0,00433	0,32	0,44	0,069	0,081	**9,53E-05**	**0,0002**	Augmentation au cours du temps[b]
Firmicutes	*Roseburia*	0,00528	0,01254	0,062	0,074	0,00972	0,00987	0,91	0,70	0,48	0,35	**0,041**	**0,024**	Développement inverse
Firmicutes	*Ruminiclostridium 5*	0,00083	0,00190	**0,005**	**0,013**	0,00282	0,00364	0,31	0,44	0,051	0,068	**3,18E-06**	**1,13E-05**	Augmentation au cours du temps[b]; Plus bas à PN21 chez RCPN
Firmicutes	*Ruminococcaceae NK4A214 group*	8,26E-05	1,83E-05	0,44	0,25	8,46E-05	0,000523	**0,0006**	**0,042**	**1,22E-05**	**8,84E-05**	0,99	0,31	Absence d'augmentation chez RCPN
Firmicutes	*Ruminococcaceae UCG-005*	0,0	0,0	0,95	0,40	0,0	0,00045	0,013	0,079	**4,35E-06**	**5,05E-05**	0,26	0,11	Absence d'augmentation chez RCPN
Firmicutes	*Ruminococcaceae UCG-010*	0,0	0,0	0,17	0,14	0,0	0,00028	0,017	0,087	**6,60E-05**	**0,0003**	0,90	0,29	Absence d'augmentation chez RCPN
Firmicutes	*Ruminococcaceae UCG-013*	0,0	0,0	0,35	0,21	0,0	0,00052	0,025	0,11	**0,001**	**0,004**	0,66	0,22	Absence d'augmentation chez RCPN
Firmicutes	*Ruminococcaceae UCG-014*	**0,00407**	**1,54E-05**	0,005	0,012	0,00220	0,00453	0,040	0,15	**0,011**	**0,021**	0,18	0,084	Développement inverse

La valeur médiane de l'abondance relative de chaque genre bactérien est donnée pour chaque groupe à PN21 et à PN60. Une valeur de p < 0,05 et une valeur de q < 0,05 étaient considérées comme significatives. [a]Evolution au cours du temps significative dans le groupe CTRL uniquement, mais tendance à la même évolution dans le groupe RCPN ; [b]Evolution au cours du temps significative dans le groupe RCPN uniquement, mais tendance à la même évolution dans le groupe CTRL [c]Evolution au cours du temps significative et dans le même sens dans les deux groupes. CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe retard de croissance postnatal ; PN21, jour postnatal 21 ; PN60, jour postnatal 60.

Tableau 2 *(suite)*

Phylum	Genre	CTRL PN21 *vs* RCPN PN21				CTRL PN60 *vs* RCPN PN60				CTRL PN21 *vs* CTRL PN60		RCPN PN21 *vs* RCPN PN60		Description
		médiane RCPN	médiane CTRL	*p*	*q*	médiane RCPN	médiane CTRL	*p*	*q*	*p*	*q*	*p*	*q*	
Firmicutes	*Ruminococcus gauvreauii group*	0,0	2,83E-05	**0,004**	**0,011**	1,59E-05	0,0	0,082	0,21	**0,006**	**0,012**	**0,049**	**0,028**	Développement inverse
Firmicutes	*Staphylococcus*	0,00040	2,63E-05	**0,0002**	**0,002**	1,22E-05	1,85E-05	0,28	0,43	0,84	0,53	**1,89E-05**	**4,05E-05**	Elevé à PN21 chez RCPN
Firmicutes	*Streptococcus*	0,00150	0,00028	**1,80E-05**	**0,0004**	0,00012	0,00012	1,0	0,72	**5,81E-05**	**0,0003**	**4,41E-10**	**1,41E-08**	Diminution au cours du temps[c]; Plus élevé à PN21 chez RCPN
Firmicutes	*Turicibacter*	0,0	0,0	0,15	0,14	0,0	3,16E-05	0,011	0,079	**5,04E-05**	**0,0003**	0,13	0,064	Absence d'augmentation chez RCPN
Firmicutes	*Tyzzerella*	0,00064	0,00086	0,54	0,28	9,44E-05	0,00011	0,78	0,66	0,084	0,096	**0,0007**	**0,0009**	Diminution au cours du temps[b]
Firmicutes	*Tyzzerella 3*	0,0	0,0	0,089	0,096	0,0	0,00011	0,046	0,15	**0,002**	**0,005**	**0,023**	**0,016**	Augmentation au cours du temps[c]
Firmicutes	*Clostridiales [Other]*	1,69E-05	1,47E-05	0,48	0,26	5,79E-05	4,07E-05	0,74	0,65	0,49	0,35	**0,014**	**0,011**	Augmentation au cours du temps[b]
Firmicutes	*Firmicutes Family XIII [Eubacterium] brachy group*	0,00011	7,52E-05	0,96	0,40	0,00016	0,00012	0,30	0,44	0,46	0,35	**0,015**	**0,012**	Augmentation au cours du temps[b]
Firmicutes	*Firmicutes Family XIII [Eubacterium] nodatum group*	7,88E-05	0,00015	0,77	0,35	0,0	0,00014	0,003	0,075	0,83	0,53	**0,019**	**0,014**	Diminution uniquement chez RCPN
Firmicutes	*Firmicutes Family XIII [ClosFamily XIII AD3011 group*	0,0	0,0	0,56	0,28	4,81E-05	4,08E-05	0,55	0,54	**0,011**	**0,021**	**0,005**	**0,005**	Augmentation au cours du temps[c]
Firmicutes	*Firmicutes Family XIII [ClosFamily XIII UCG-001*	2,63E-05	0,00022	**0,002**	**0,007**	0,00039	0,00049	0,36	0,44	**0,004**	**0,011**	**1,74E-06**	**9,33E-06**	Augmentation au cours du temps[c]; Plus bas à PN21 chez RCPN
Proteobacteria	*Bilophila*	0,00013	0,00013	0,85	0,37	0,00022	0,00052	0,008	0,08	**0,001**	**0,004**	0,45	0,17	Absence d'augmentation chez RCPN
Proteobacteria	*Desulfovibrio*	0,01413	0,00781	0,14	0,14	0,00716	0,00978	0,10	0,22	0,91	0,57	**0,008**	**0,007**	Diminution uniquement chez RCPN
Proteobacteria	*Escherichia-Shigella*	0,00221	5,42E-05	**0,008**	**0,017**	0,0	8,51E-06	0,084	0,21	0,055	0,070	**8,50E-06**	**2,27E-05**	Elevé à PN21 chez RCPN
Proteobacteria	*Oryza meyeriana [mitochondrial]*	0,0	0,0	0,49	0,26	2,24E-05	0,0	0,10	0,22	0,94	0,57	**0,017**	**0,013**	Augmentation uniquement chez RCPN
Proteobacteria	*Parasutterella*	0,00052	0,00061	0,27	0,19	0,00166	0,00205	0,28	0,43	**0,006**	**0,014**	**0,0002**	**0,0003**	Augmentation au cours du temps[c]
Tenericutes	*Anaeroplasma*	1,31E-05	0,0004	0,073	0,083	0,00546	0,00232	0,025	0,11	**0,021**	**0,034**	**0,0002**	**0,0003**	Augmentation au cours du temps[c]

La valeur médiane de l'abondance relative de chaque genre bactérien est donnée pour chaque groupe à PN21 et à PN60. Une valeur de p < 0,05 et une valeur de q < 0,05 étaient considérées comme significatives. [a]Evolution au cours du temps significative dans le groupe CTRL uniquement, mais tendance à la même évolution dans le groupe RCPN ; [b]Evolution au cours du temps significative dans le groupe RCPN uniquement, mais tendance à la même évolution dans le groupe CTRL [c]Evolution au cours du temps significative et dans le même sens dans les deux groupes. CTRL, groupe contrôle ; RCPN, groupe retard de croissance postnatal ; PN21, jour postnatal 21 ; PN60, jour postnatal 60.

Discussion

L'objectif général de ce travail était d'évaluer l'impact de l'environnement nutritionnel précoce sur la santé intestinale à long terme.

Nous avons montré que le RCPN altère la maturation intestinale chez la souris au sevrage. Le RCPN est responsable en particulier d'une augmentation de la perméabilité intestinale, concomitante d'une désorganisation des protéines des jonctions serrées. Le RCPN altère la colonisation bactérienne de l'intestin. Le microbiote intestinal est moins riche en espèces bactériennes en cas de RCPN chez la souris au sevrage et sa composition est différente, avec en particulier une proportion anormalement élevée de *Parabacteroides* spp, *Enterococcus* spp, *Erysipelatoclostridium* spp, *Eubacterium coprostanoligenes* spp, *Staphylococcus* spp, et *Escherichia-Shigella* spp, et une proportion plus faible d'espèces productrices de butyrate. L'absence de barrière intestinale efficace et la dysbiose induites par le RCPN, sont associés à long terme à une altération de la réponse inflammatoire de l'intestin, caractérisée par une augmentation des réponses immunitaires Th1, Th17 et Treg et une plus grande susceptibilité à la colite chimiquement induite à l'âge adulte.

1. Validation du modèle de RCPN

Pour tester l'impact de l'environnement nutritionnel précoce sur la maturation intestinale et la santé intestinale à long terme, nous avons choisi un modèle murin de RCPN. Le RCPN était induit par dénutrition pendant la période postnatale précoce en augmentant artificiellement la taille des portées à 15 au quatrième jour de vie. Les animaux issus des GP présentaient une masse corporelle inférieure à celle des animaux CTRL dès le sixième jour de vie et pendant toute la période postnatale précoce. Après le sevrage, les souriceaux avec

RCPN présentaient une croissance de rattrapage leur permettant d'atteindre une masse corporelle normale à l'âge adulte. À masse corporelle égale à PN60, les mâles avec RCPN présentaient une masse grasse totale, sous-cutanée et viscérale inférieures et une masse maigre augmentée. Chez l'Homme, les enfants qui naissent avec un petit poids à la naissance présentent une croissance post-natale accélérée telle qu'ils rattrapent un poids normal ou supérieur au poids normal pour leur âge dans les 18 premiers mois de la vie. Le modèle de RCPN par augmentation de la taille des portées mime ainsi l'évolution du RCIU chez l'Homme.

Le modèle de RCPN par augmentation de la taille des portées a été largement décrit dans la littérature. L'augmentation de la taille des portées induit un retard de croissance précoce, suivi d'une croissance de rattrapage après le sevrage (Faust *et al.*, 1980 ; Bulfin *et al.*, 2011 ; Clarke *et al.*, 2013 ; Hausberger et Volz, 1984 ; Dimitsantos *et al.*, 2007). Il est supposé que la croissance de rattrapage observée après le sevrage soit liée à une alimentation plus abondante sans qu'il ait été montré toutefois une augmentation de la prise alimentaire après le sevrage chez les animaux soumis au RCPN (Lambert et Koeslag, 1992). Les conséquences métaboliques à l'âge adulte du RCPN sont variables selon les travaux. La majorité des travaux montrent la persistance d'une masse corporelle inférieure à l'âge adulte chez les animaux ayant présenté un RCPN (Faust *et al.*, 1980 ; Bulfin *et al.*, 2011 ; Clarke *et al.*, 2013 ; Hausberger et Volz, 1984). Deux études ont montré que les rats issus des GP avaient une masse corporelle normale à l'âge adulte, avec un rattrapage plus rapide chez les femelles (Lambert et Koeslag, 1992 ; Dimitsantos *et al.*, 2007). La masse grasse, évaluée selon la masse des tissus adipeux (épididymal, rétropéritonéal, et inguinal), ou par absorptiométrie biphotonique à rayons X, était inférieure chez les animaux adultes avec RCPN (Faust *et al.*, 1980 ; Bulfin *et al.*, 2011 Hausberger et Volz, 1984). La différence de masse corporelle à l'âge adulte des animaux issus des GP selon les études peut s'expliquer par la procédure expérimentale utilisée. La lactation diffère d'une espèce à l'autre et selon le nombre de petits par portée à la naissance. Les travaux antérieurs étaient tous réalisés chez

le rat, contrairement à notre étude réalisée chez la souris. Par ailleurs, les GP étaient créées dès le premier jour de vie dans les travaux antérieurs (Fiorotto *et al.*, 1991 ; Crnic et Chase, 1978 ; Russell, 1980 ; Faust *et al.*, 1980 ; Bulfin *et al.*, 2011 ; Clarke *et al.*, 2013 ; Crnic, 1980 ; Hausberger et Volz, 1984 ; Lambert et Koeslag, 1992). Dans notre étude, nous avons choisi de créer les GP après une période de quatre jours au cours de laquelle le nombre de petits par portées était homogénéisé à huit de façon à normaliser la production de lait par les mères, et supprimer ainsi l'influence du nombre de souriceaux à la naissance sur la lactation. Dans la majorité des études, la taille des portées était artificiellement modifiée avec un nombre d'animaux par GP qui variait de 16 à 24 selon les études. Dans l'étude de Dimitsantos *et al.*, des portées naturellement grandes à la naissance (>15 ratons) étaient utilisées (Dimitsantos *et al.*, 2007). Le nombre de petits par PC était également variable de 8 à 14 selon les études. La quantité de lait ingéré par les petits étant supposée être influencée par la taille de la portée, cette différence de nombre d'animaux par portée rend difficile la comparaison d'une étude à l'autre. Enfin, l'effet « portée » n'était pas pris en compte dans les travaux antérieurs. Il a été montré en effet que l'impact de l'augmentation de la taille de la portée sur la masse corporelle des animaux d'une même portée est très variable (Galler et Turkewitz, 1975). Certains animaux plus vigoureux ne présentent pas de RCPN. Dans notre étude, il existait de la même façon une grande variabilité de la masse corporelle entre les souriceaux d'une même GP, et d'une GP à l'autre (figure 15). De façon à prendre en compte l'effet « portée », l'analyse statistique était réalisée à partir de la moyenne de la masse corporelle de tous les animaux d'une même portée et seuls les animaux ayant une masse corporelle <10ème percentile de la distribution de la masse corporelle des PC étaient inclus dans l'analyse.

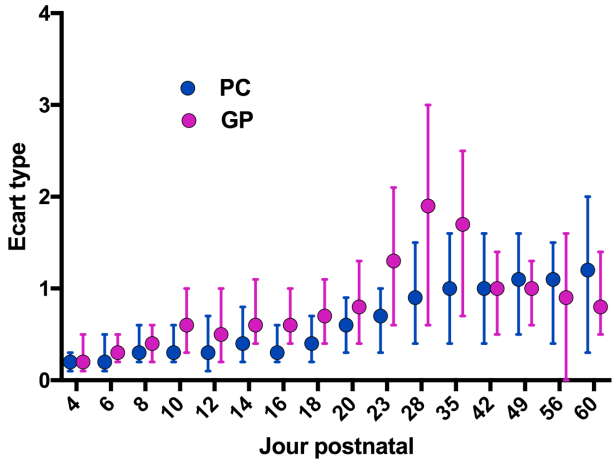


Figure 15. Moyenne des écart-types (min-max) de la masse corporelle des animaux des grandes portées et des portées contrôles
PC, portées contrôles ; GP, grandes portées

Une diminution de la quantité de lait ingéré, ainsi qu'une composition différente du lait, semblent être responsables de l'apparition du RCPN chez les animaux des GP. Bien que la quantité de lait produite par les mères des GP augmente rapidement après l'augmentation de la taille de la portée (Russel, 1980 ; Fiorotto *et al.*, 1991), les souriceaux des GP reçoivent moins de lait (Fiorotto *et al.*, 1991). Dans l'étude de Fiorotto et *al.*, la quantité quotidienne de lait produite par les mères des GP était augmentée pendant les dix premiers jours de la lactation. Cette augmentation de la lactation n'était pas associée à une augmentation de l'apport calorique chez les souriceaux puisque le lait des mères des GP était moins riche en lipides que celui des mères des portées de taille moyenne, alors que la teneur en protéines était plus importante. La teneur faible en lipides du lait des mères des GP conduisait à un déficit non protéino-énergétique chez les souriceaux des GP caractérisé par l'absence d'augmentation de la masse grasse des souriceaux jusqu'au quinzième jour de vie (Fiorotto *et al.*, 1991). La dépense énergétique plus importante chez les animaux issus des GP pourrait expliquer également en partie leur masse corporelle inférieure. Les petits des GP ont une dépense énergétique élevée en raison d'une activité physique plus intense (Hall, 1984). Ils dépensent également plus d'énergie pour la thermorégulation. Leur

température corporelle est plus basse du fait d'une masse grasse moins importante et du temps réduit passé par leur mère dans le nid (Fiorotto *et al.*, 1991).

2. Impact du RCPN sur la maturation intestinale

Le RCPN altère la morphogénèse intestinale chez le souriceau. Dans l'iléon, le retard de maturation de l'épithélium intestinal était caractérisé par la persistance de la vacuolisation postnatale des entérocytes. Ces entérocytes immatures apparaissent physiologiquement chez le rongeur en fin de gestation (Wilson, 1991) pour permettre l'absorption de macromolécules, d'hormones et de facteurs de croissance présents dans le lait maternel, grâce à leur propriété d'endocytose (Carlile et Beck, 1983 ; Colony, 1983 ; Dekaney *et al.*, 1997 ; Trahair et Harding, 1995 ; Wilson, 1991). Ils sont normalement présents jusqu'à la troisième semaine de vie. Entre PN18 et PN21 l'épithélium iléal est soumis à un phénomène de redifférenciation conduisant à l'apparition d'entérocytes matures non endocytiques (Carlile et Beck, 1983 ; Trahair et Harding, 1995 ; Wilson, 1991). Ces entérocytes matures adultes apparaissent à partir de PN18 à la base des villosités, puis remontent progressivement le long de la villosité pour remplacer totalement l'épithélium immature à PN21 (figure 16) (Carlile et Beck, 1983). Nous avons mis en évidence une diminution de la profondeur des cryptes dans l'iléon et le côlon, ainsi qu'une diminution de l'épaisseur de la muqueuse colique en cas de RCPN. Ces mêmes conséquences du retard de croissance sur la morphogénèse intestinale avaient été mises en évidence chez le rat à six semaines de vie dans un modèle de retard de croissance pré- et postnatal induit par une restriction alimentaire chez la mère et après le sevrage (Firmansyah *et al.*, 1989).

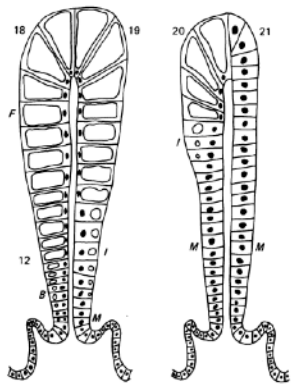


Figure 16. Remplacement progressif des entérocytes vacuolisés par des entérocytes matures adultes entre PN18 et PN21 chez le rat (Carlile et Beck ,1983)

Nous avons montré que le RCPN est associé à une diminution de l'expression des enzymes digestives à la bordure en brosse. L'expression de IAP et de DPPIV à la bordure en brosse était diminuée dans l'iléon des souriceaux avec RCPN. La DPPIV était exprimée dans le cytoplasme des entérocytes vacuolisés villositaires. L'expression des enzymes digestives à la bordure en brosse dépend de la différenciation des entérocytes le long de l'axe crypto-villositaire (Hodin *et al.*, 1995 ; Fan *et al.*, 2001 ; Darmoul *et al.*, 1991). Une expression des enzymes digestives sous forme soluble dans le cytoplasme des entérocytes vacuolisés a été mise en évidence chez le raton au cours de la lactation. Cette localisation intracellulaire semble être liée à l'internalisation des enzymes digestives lors de l'invagination de la bordure en brosse accompagnant l'endocytose des entérocytes vacuolisés. L'expression intra-cytoplasmique des enzymes digestives disparaît de façon concomitante à la différenciation des entérocytes fœtaux vacuolisés en entérocytes matures adultes au cours de la troisième semaine de vie chez le rongeur (Tsuboi et Castillo, 1989). Nous avons montré une augmentation relative de l'activité de DPPIV dans l'iléon en cas de RCPN, puisque l'activité de DPPIV n'était pas modifiée malgré une diminution de son expression. L'activité enzymatique de IAP était augmentée dans l'iléon des souriceaux avec RCPN, malgré une diminution de son expression. Dans l'étude de Hatch *et al.*, l'activité de IAP était augmentée à PN19 chez les ratons issus de GP (Hatch *et al.*, 1979). La maturation

postnatale de l'activité des enzymes digestives est liée au mode d'alimentation. L'activité des dipeptidases de la bordure en brosse est détectable dès la gestation chez le rat, puis augmente progressivement pendant la période postnatale pour atteindre un pic entre la deuxième et la troisième semaine de vie. Après le sevrage, l'activité des dipeptidases diminue pour atteindre à la fin du premier mois de vie le niveau d'activité retrouvé chez l'adulte (Auricchio *et al.*, 1981). Chez le cochon, le sevrage est associé à une diminution de l'activité de IAP de 22 % dans l'intestin grêle (Lackeyram *et al.*, 2010). La diminution de l'activité des enzymes digestives après le sevrage chez l'animal est liée au fait que le lait maternel est plus riche en lipides et en protéines que la nourriture adulte. Les animaux issus des PC, plus grand et plus vigoureux, commencent à manger la nourriture adulte de leur mère vers PN18, alors que les souriceaux des GP n'y ont accès qu'après le sevrage (PN21). L'introduction d'une alimentation moins riche en lipides et en protéines pourrait expliquer la diminution de l'activité des enzymes digestives chez les animaux CTRL.

Le RCPN est associé à une diminution de l'expression des glycoconjugués sialylés dans l'iléon et le côlon des souriceaux au sevrage. Le glycome intestinal représente l'ensemble des oligosaccharides et des glycoconjugués associés à l'épithélium intestinal. Ces derniers sont essentiellement présents dans la couche de mucus et le glycocalix. Le glycome intestinal est primordial au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. En recouvrant la muqueuse intestinale, le mucus protège les cellules épithéliales des agressions chimiques et physiques, et de l'adhésion et de l'invasion bactérienne (Kavanaugh *et al.*, 2015). Les glycanes associés à l'épithélium intestinal constituent de nombreux sites de liaison pour des ligands exogènes (hémagglutinines virales, toxines bactériennes, et adhésines microbiennes), et participe ainsi à la reconnaissance des antigènes présents dans la lumière intestinale, et à la défense contre l'invasion d'organismes potentiellement pathogènes (Kavanaugh *et al.*, 2015). L'alimentation, en modifiant l'activité des glycosyltransférases et la biodisponibilité des substrats, peut moduler le profil de glycosylation de l'épithélium intestinal. Pendant la période de lactation, les cellules de

l'épithélium intestinal expriment principalement des glycoconjugués se terminant par un acide sialique. La sialylation dépend de l'apport d'acide sialique via les oligosaccharides présents dans le lait maternel. Après le sevrage, les glycoconjugués associés à l'épithélium intestinal deviennent principalement fucosylés avec l'augmentation de l'activité fucosyltransférase et la diminution de l'apport en acide sialique par le lait maternel (Kavanaugh *et al.*, 2015 ; Rautava et Walker, 2007). La diminution de l'expression des glycoconjugués sialylés en cas de RCPN pourrait être liée à une diminution de l'apport en acide sialique via le lait maternel chez les animaux des GP. Toutefois, à notre connaissance, la teneur en oligosaccharides du lait des mères des GP n'a jamais été mesurée. Le glycome intestinal représente une source importante de nutriments pour le microbiote et peut ainsi en moduler la composition (Kavanaugh *et al.*, 2015 ; Rautava et Walker, 2007). Le microbiote peut à son tour moduler le profil de glycosylation de l'épithélium intestinal. L'augmentation des glycoconjugués fucosylés normalement observée au moment du sevrage est absente chez les animaux axéniques (Hooper, 2004). La colonisation de ces animaux par *Bacteroides thetaiotaomicron* est associée à une augmentation de la fucosylation de l'épithélium iléal (Hooper, 2001). La modification du profil de glycosylation de l'épithélium intestinal chez les souriceaux avec RCPN, concomitante d'une altération de la colonisation bactérienne, souligne le lien étroit entre le glycome intestinal et le microbiote.

Le RCPN est associé à une immaturité de la barrière intestinale chez la souris au sevrage, caractérisée par une désorganisation des protéines des jonctions serrées, associée à une augmentation de la perméabilité intestinale paracellulaire. La perméabilité intestinale est élevée pendant les deux premières semaines de vie chez le rongeur (Moussaoui *et al.*, 2014 ; Iiboshi *et al.*, 1996 ; Patel *et al.*, 2012). Elle est associée à une translocation des bactéries commensales du microbiote intestinal vers les ganglions mésentériques, supposée participer à l'éducation du système immunitaire (Yajima *et al.*, 2001 ; Moussaoui *et al.*, 2014). *Enterobacteriaceae* spp, *Lactobacillus* spp, et *Staphylococcus* spp sont les espèces bactériennes les plus fréquemment retrouvés dans les ganglions mésentériques des ratons

au septième jour de vie (Yajima *et al.*, 2001). Au cours de la troisième semaine de vie, la perméabilité intestinale diminue et devient équivalente à PN28 à celle de l'adulte (Iiboshi *et al.*, 1996 ; Patel *et al.*, 2012). L'épithélium intestinal n'est alors plus perméable aux bactéries commensales puisqu'il n'est pas mis en évidence de translocation bactérienne à PN20 (Moussaoui *et al.*, 2014). De façon concomitante à la diminution de la perméabilité intestinale, on assiste à une augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées dans l'intestin grêle chez la souris entre la deuxième et la troisième semaine de vie, et à leur redistribution le long de l'axe crypto-villositaire (Holmes *et al.*, 2006 ; Patel *et al.*, 2012).

Le stress lié à une attention moins importante de la mère (Dimitsantos *et al.*, 2007), et à la compétition entre les animaux d'une même portée pour téter, pourrait impacter sur les conséquences du RCPN sur les fonctions biologiques. Les glucocorticoïdes jouent un rôle important dans la maturation intestinale. Chez le rongeur, la sécrétion de glucocorticoïdes au cours des deux premières semaines de vie stimule la morphogenèse intestinale et permet l'établissement d'une barrière intestinale efficace (Pàcha *et al.*, 2009 ; Henning, 1978). Le taux basal de corticostérone est extrêmement faible au cours des 12 premiers jours de vie chez le rat, puis augmente significativement à partir de PN14 pour atteindre un pic à PN24. L'augmentation de corticostérone précède de deux jours la maturation des enzymes digestives (diminution de l'activité de la lactase et augmentation concomitante de la sucrase) (Henning, 1978). L'augmentation de la corticostéronémie pendant la lactation accélère la croissance des villosités et des cryptes dans l'intestin grêle chez le rat (Pàcha *et al.*, 2009). Une sécrétion inappropriée de glucocorticoïdes, secondaire à un stress aigu ou chronique, peut toutefois avoir des effets délétères sur les fonctions intestinales, en particulier sur la fonction de barrière. Un stress aigu de séparation maternelle induit une augmentation de la perméabilité intestinale concomitante d'une sécrétion accrue de corticostérone chez le raton, et s'accompagne d'une translocation digestive des bactéries commensales (Moussaoui *et al.*, 2014). L'induction d'un stress chronique par séparation maternelle quotidienne au cours

des premières semaines de vie est responsable d'une sécrétion accrue de corticostérone à l'âge adulte (Oisnes *et al.*, 2012 ; Barreau *et al.*, 2007), et d'une altération à long terme de la barrière intestinale prédisposant à une susceptibilité accrue aux colites inflammatoires chez le rongeur (Barreau *et al.*, 2004 ; Barreau *et al.*, 2007 ; Lennon *et al.*, 2013 ; Fuentes *et al.*, 2016). Les études comportementales chez les rongeurs issus des GP montrent une anxiété moins importante chez le raton et à l'âge adulte lors du test du labyrinthe en croix, avant et après un stress aigu de contention (Bulfin *et al.*, 2011 ; Clarke *et al.*, 2013 ; Dimitsantos *et al.*, 2007). La corticostéronémie n'était pas augmentée chez les ratons des GP, voire même diminuée dans ces études (Bulfin *et al.*, 2011 ; Rödel *et al.*, 2010). Un stress aigu de contention induisait une augmentation de la corticostéronémie équivalente chez les animaux des GP et ceux des PC, avec un retour au taux basal plus rapide dans le groupe des GP (Bulfin *et al.*, 2011). Il semble donc que les conséquences du RCPN sur les fonctions intestinales ne soient pas liées à une sécrétion excessive de corticostérone secondaire au stress induit par l'augmentation de la taille de la portée.

La croissance de l'intestin grêle des animaux allaités est plus rapide que celle des animaux non alimentés ou alimentés artificiellement (Stoddart et Widdowson, 1976 ; Hall et Widdowson, 1979 ; Rothman *et al.*, 1985 ; Woliński *et al.*, 2003). Chez l'Homme, la perméabilité intestinale des nouveau-nés allaités est significativement plus basse à sept jours de vie par rapport à ceux recevant une préparation pour nourrissons, suggérant que le lait maternel puisse accélérer la maturation de l'épithélium intestinal (Catassi *et al.*, JPGN 1995). Le lait maternel contient de nombreux facteurs de croissance, tels que EGF (epidermal growth factor), TGF-α (transforming growth factor-α), l'érythropoïétine, HGF (hepatocyte growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), et des hormones ayant une action intestinotrophique (Cummins et Thompson, 2002 ; Wagner *et al.*, 2008). L'expression dans l'intestin grêle des récepteurs des facteurs de croissance EGF, HGF, et IGF-1, augmente dès la naissance chez la souris, pour atteindre un pic à PN14. Elle diminue ensuite fortement pour atteindre au moment du sevrage le niveau d'expression retrouvé

dans l'intestin adulte. L'augmentation de l'expression dans l'intestin grêle des récepteurs des facteurs de croissance au cours de la lactation chez la souris est concomitante d'une augmentation de la sécrétion de EGF et IGF-1 dans le lait maternel (Zhang *et al.*, 2016). Les études réalisées chez l'animal, ou sur des cultures primaires, montrent que les facteurs de croissance présents dans le lait maternel stimulent la prolifération des cellules intestinales, et la maturation des enzymes digestives (Cummins et Thompson, 2002). La présence de leptine et d'insuline dans le lait maternel a été mise en évidence chez l'Homme et le rongeur (Casabiell *et al.*, 1997 ; Aoki *et al.*, 1999 ; Shehadeh *et al.*, 2006). La concentration de leptine dans le lait maternel est corrélée avec la concentration plasmatique chez le nourrisson (Uçar *et al.*, 2000). Outre leur rôle dans la régulation du métabolisme et de la satiété, la leptine et l'insuline ont une action intestinotrophique. Les entérocytes des mammifères expriment les récepteurs de la leptine et de l'insuline très tôt au cours de la vie (Barrenetxe *et al.*, 2002 ; Buts *et al.*, 1997). L'affinité de l'insuline pour son récepteur est trois fois supérieure chez le raton par rapport au rat adulte (Buts *et al.*, 1997). L'administration de leptine ou d'insuline orale pendant la lactation chez l'animal accélère la croissance de l'intestin et la maturation des enzymes digestives, avec un effet dose-dépendant (Woliński *et al.*, 2003 ; Buts *et al.*, 1990 ; Ménard *et al.*, 1981). Chez l'Homme, la supplémentation en insuline par voie entérale est associée à une augmentation de l'activité de la lactase et de la tolérance alimentaire chez le prématuré (Shulman, 2002). Il a été montré que les taux de leptine et d'insuline plasmatiques au cours des trois premières semaines de vie sont plus faibles chez les ratons issus des GP (Patterson *et al.*, 2010 ; Plagemann *et al.*, 1999). L'administration de leptine orale permet de restaurer un taux plasmatique de leptine normal chez ces animaux (Patterson *et al.*, 2010), suggérant que la diminution de lait ingéré pourrait expliquée la diminution du taux plasmatique de leptine chez les animaux issus des GP. Le rôle de la diminution des facteurs intestino-trophiques ingérés via le lait maternel dans le retard de maturation intestinale induit par le RCPN reste à démontrer. Des études montrant : (i) la diminution des facteurs intestino-trophiques dans le lait maternel des GP ; (ii) la diminution de l'expression et de l'activation des récepteurs des facteurs intestino-trophiques dans

l'intestin des souriceaux issus des GP ; (iii) la prévention des effets délétères du RCPN sur la maturation intestinale par l'administration précoce de facteurs intestino-trophiques contenus dans le lait maternel, sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

3. Impact du RCPN sur la susceptibilité aux colites inflammatoires à l'âge adulte

Le retard de maturation de la barrière intestinale induit par le RCPN est associé à une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IL-1β et IL-6 dans le côlon des souriceaux avec RCPN. À l'âge adulte, il persiste une altération de la réponse inflammatoire de l'intestin, caractérisée par une augmentation de l'expression des cytokines associées aux réponses immunitaires Th1, Th17 et Treg. Après induction d'une colite chronique au DSS 3 %, le score histologique de sévérité de la colite plus élevé chez les souris avec RCPN, ainsi que la persistance d'une élévation des cytokines pro-inflammatoires, et la diminution de la réponse immunitaire Treg, sont en faveur d'une plus grande susceptibilité à la colite chimiquement induite en cas de RCPN.

Le DSS est un polysaccharide sulfaté toxique pour les colonocytes qui, en altérant la barrière intestinale, expose les cellules immunitaires présentes dans la muqueuse et la sous-muqueuse aux antigènes bactériens, entraînant une réponse inflammatoire rapide et profonde (Valatas *et al.*, 2015 ; Kiesker *et al.*, 2015 ; Wirtz *et al.*, 2017). Le DSS induit ainsi une colite sévère, touchant préférentiellement le côlon gauche, caractérisée par la présence d'ulcérations, une perte des cryptes, et une infiltration granulocytaire (Kiesker *et al.*, 2015 ; Elson *et al.*, 1995 ; Wirtz *et al.*, 2017). L'administration répétée de DSS induit une colite chronique associant des ulcérations, des zones de régénération épithéliale, et une infiltration lymphocytaire prédominante (Elson *et al.*, 1995). Lors de sa première administration, le DSS entraîne une perte de poids importante et maximale entre J8 et J10 (Ottewell *et al.*, 2006 ; Gouyer *et al.*, 2015 ; Rodrigues-Sousa *et al.*, 2014). Les symptômes, à type de diarrhées et de rectorragies, sont plus modérés voire absents lors de la phase chronique et ne sont pas associés à une perte de poids (Rodrigues-Sousa *et al.*, 2014). Une étude de la composition

corporelle réalisée chez des souris soumises à une colite chronique au DSS 3 % montrait une diminution de la masse grasse, sans modification associée de la masse maigre (Melgar et al., 2007). La perte préférentielle de masse grasse pourrait expliquer que les animaux avec RCPN, ayant une masse grasse moins importante à l'âge adulte, perdent moins de poids au cours de la colite chronique. La phase aiguë de la colite au DSS est caractérisée par une réponse immunitaire de type Th1 et Th17 (Yan *et al.*, 2011). L'augmentation du TNF-α a un rôle délétère sur la barrière intestinale en altérant l'activité des jonctions serrées et en induisant l'apoptose des cellules épithéliales intestinales (Neurah, 2014). Au cours de la phase chronique, les réponses immunitaires Th1 et Th17 diminuent au profit des réponses Th2 et Treg (Rodrigues-Sousa *et al.*, 2014 ; Alex *et al.*, 2009). Les cellules Treg, en produisant des cytokines anti-inflammatoires tel que IL-10, jouent un rôle majeur dans la résolution de l'inflammation en supprimant la réponse des cellules T effectrices (Neurah, 2014). L'augmentation plus importante du TNF-α par rapport au groupe CTRL, et la diminution de la sécrétion d'IL-10, pourraient expliquer la sévérité plus importante de la colite chronique chez les animaux avec RCPN. Il conviendrait toutefois de préciser la cinétique de la réponse immune en mesurant l'expression des cytokines et des facteurs de transcription T-bet (Th1), GATA3 (Th2), RORγt (Th17) et FOXP3 (Treg) à la fin de chacun des trois cycles de DSS.

L'impact à long terme de l'environnement périnatal sur la susceptibilité aux colites inflammatoires à l'âge adulte a fait l'objet de peu d'études chez l'animal. Un stress chronique de séparation maternelle pendant les 14 à 18 premiers jours de vie était associé à une augmentation de la perméabilité intestinale à l'âge adulte et une sévérité accrue de la colite induite au TNBS chez le rongeur (Barreau *et al.*, 2004 ; Fuentes *et al.*, 2016), et de la colite spontanée chez la souris IL10$^{-/-}$ (Lennon *et al.*, 2013). L'administration d'une antibiothérapie (céfazoline) pendant la dernière semaine de gestation chez la souris était associée à une augmentation de la sévérité de la colite aiguë au DSS chez les descendants à l'âge adulte (Munyaka *et al.*, 2015). Un déséquilibre de l'apport en acides gras polyinsaturés à longue

chaîne de la série n-6 et n-3 dans l'alimentation maternelle pendant la gestation et la lactation augmentait la susceptibilité aux colites chimiquement induites chez le rat adulte (Innis *et al.*, 2010 ; Reddy et Naidu, 2015). Notre travail confirme que l'environnement périnatal peut programmer la réponse inflammatoire de l'intestin à l'âge adulte lors d'une colite chimiquement induite.

4. Impact du RCPN sur la composition du microbiote intestinal

Nous avons montré que le RCPN a un impact direct sur la richesse et la composition du microbiote fécal à PN21, alors qu'à l'âge adulte la composition du microbiote est superposable à celle du groupe CTRL. Le développement du microbiote intestinal entre le sevrage et l'âge adulte chez la souris FVB/NRj est caractérisé par une augmentation de la diversité et un enrichissement en certaines espèces bactériennes, appartenant principalement aux Firmicutes. La colonisation bactérienne de l'intestin est altérée en cas de RCPN. Le microbiote fécal est moins riche en espèces bactériennes chez la souris au sevrage, et le développement de certains genres bactériens est différent par rapport au groupe CTRL. Une abondance plus faible de *Odoribacter* spp, et d'un certain nombre de genres appartenant à la famille des Lachnospiraceae est mise en évidence dans le groupe RCPN à PN21. *Odoribacter* spp et les Lachnospiraceae sont des groupes d'espèces bactériennes productrices de butyrate (Göker *et al.*, 2011). Le butyrate est un acide gras à chaîne courte, issu de la fermentation bactérienne. Il constitue la première source d'énergie des cellules épithéliales intestinales (Ahmad *et al.*, 2000) et stimule la prolifération et la différenciation des cellules Treg de l'intestin (Atarashi *et al.*, 2013 ; Smith *et al.*, 2013), contribuant ainsi au renforcement de la barrière intestinale. Une diminution de *Odoribacter* spp et des Lachnospiraceae (Kostic *et al.*, 2014 ; Maukonen *et al.*, 2015 ; Gevers *et al.*, 2014), associée à une diminution du taux fécal de butyrate (Erickson *et al.*, 2012) a été mise en évidence chez les patients atteints de MICI, chez qui il existe une altération de la barrière intestinale. *Candidatus Arthromitus* spp était absent à PN21 dans les deux groupes et devenait abondant à PN60 dans le groupe RCPN uniquement. *Candidatus Arthromitus* spp,

ou bactérie filamenteuse segmentée (BFS), joue un rôle critique dans la maturation et le maintien de la barrière immune intestinale. BFS stimule le développement des plasmocytes, la production d'immunoglobuline A sécrétoire (sIgA), et les réponses T pro-inflammatoire et régulatrice (Caselli *et al.*, 2010). La colonisation de souris axéniques par *Candidatus Arthromitus* spp induit une réponse immune Th17 et une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et anti-microbienne, et confère ainsi une plus grande résistance au pathogène *Citrobacter rodentium* (Ivanov *et al.*, 2009). A l'inverse, BFS peut induire une réponse immune délétère pour l'hôte. L'utilisation de modèles expérimentaux d'auto-immunité a montré que la colonisation par BFS aggrave l'arthrite IL-17-dépendante (Wu *et al.*, 2010) et l'encéphalomyélite auto-immune (Lee *et al.*, 2010). *Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp et *Escherichia-Shigella* spp sont anormalement présents en proportion importante à PN21 dans le groupe RCPN. L'expansion de ces bactéries anaérobies facultatives est concordante avec l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon des souriceaux avec RCPN. Il a été montré que l'inflammation intestinale, du fait de l'hyperhémie et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et muqueuse, est responsable d'une augmentation de la concentration en oxygène intra-luminale favorisant alors l'expansion des bactéries anaérobies facultatives (Albenberg *et al.*, 2014). L'utilisation de traitement anti-inflammatoire à visée digestive, tel que l'acide 5-aminosalicylique, est associée à une diminution des *Escherichia-Shigella* spp (Morgan *et al.*, 2012). *Escherichia-Shigella* spp, est un groupe de bacilles Gram(-), anaérobies facultatifs, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Ce groupe comprend des espèces commensales et des espèces bactériennes potentiellement pathogènes et hautement invasives. La technique de séquençage de l'ARNr 16S bactérien ne permet pas de faire la différence entre les espèces entéro-invasives et *Escherichia coli* non pathogène. L'activation du TLR-4 (Toll-like receptor-4) par le lipopolysaccharide (LPS), composant de la paroi des bactéries Gram(-), participe au maintien de la barrière épithéliale en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires par la voie NF-κB, et en stimulant la prolifération des cellules épithéliales et l'activité des jonctions serrées (Pålsson-McDermott et O'Neill, 2004 ;

Abreu, 2010). L'activation excessive du TLR-4 en raison de la présence en abondance de bactéries productrices de LPS peut induire une réponse inflammatoire exagérée. Une augmentation des Enterobacteriaceae, en particulier *Escherichia-Shigella* spp, a été mise en évidence dans des modèles murins de colite inflammatoire (Lupp *et al.*, 2007), ainsi que chez des patients atteints de MICI (Kostic *et al.*, 2014 ; Maukonen *et al.*, 2015 ; Gevers *et al.*, 2014), et était associée à une surexpression du TLR-4 par les cellules épithéliales intestinales (Cario et Podolsky, 2000). La diminution des bactéries productrices de butyrate (*Odoribacter* spp et les Lachnospiraceae) et l'augmentation des bactéries pro-inflammatoires (*Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp et *Escherichia-Shigella* spp) à PN21 sont concordantes avec l'altération de la barrière intestinale et l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires mises en évidence en cas de RCPN dans le côlon de la souris au sevrage.

Le microbiote intestinal est indispensable à la maturation de la barrière intestinale et l'éducation du système immunitaire. L'invalidation du gène *MyD88*, essentiel dans la voie de signalisation des TLR, est associée à une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées et une augmentation de la perméabilité intestinale chez la souris à trois semaines de vie (Patel *et al.*, 2012), et s'accompagne d'une susceptibilité accrue aux colites inflammatoires à l'âge adulte (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004), soulignant l'importance du microbiote dans l'homéostasie immunitaire intestinale. Il a été montré également une sévérité plus importante de la colite induite à l'oxazolone chez les souris axéniques. La colonisation des souris axéniques par un microbiote conventionnel pendant la période néonatale diminue la sévérité de la colite, alors qu'une colonisation à l'âge adulte n'a pas d'effet protecteur (Olszak *et al.*, 2012), confirmant que la colonisation bactérienne au moment de la maturation du système immunitaire conditionne la réponse immunitaire plus tard au cours de la vie. Le type d'espèces bactériennes qui compose le microbiote intestinal influence l'intégrité de la barrière intestinale et la différenciation de la réponse immunitaire. Nous avons vu précédemment que le butyrate, produit par la fermentation bactérienne,

contribue au maintien de la barrière intestinale. La diminution de bactéries productrices de butyrate chez le raton est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale (Moussaoui *et al.*, 2017). La production de chimiokines et de cytokines par les cellules intestinales de l'immunité innée en réponse aux signaux bactériens permet le recrutement et l'activation des cellules effectrices. L'orientation de la réponse immunitaire induite par le microbiote est fonction du type d'antigènes bactériens présentés aux cellules de la réponse innée. La bactérie commensale *Bacteroides fragilis* spp influence l'équilibre entre les réponses immunes Th1 et Th2 (Mazmanian *et al.*, 2005). La colonisation de souris axéniques par la BFS stimule la prolifération des cellules Th17 dans la lamina propria et induit la production de IL-17 et IL-22 (Ivanov *et al.*, 2009). Les bactéries productrices de butyrate stimule la prolifération des Treg et la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Atarashi *et al.*, 2013 ; Arpaia *et al.*, 2013). Une altération de la colonisation bactérienne de l'intestin peut donc avoir un effet délétère sur la maturation de la barrière intestinale et l'homéostasie du système immunitaire à long terme. L'augmentation de la susceptibilité à la colite induite par le DSS à PN60 en cas de RCPN, malgré la normalisation de la composition du microbiote intestinal à l'âge adulte, suggère un effet de programmation du RCPN, et de la dysbiose induite par le RCPN, sur la santé intestinale au cours de la vie. Même si la dysbiose est transitoire, elle survient à un moment critique du développement de la barrière intestinale et du système immunitaire, et peut ainsi augmenter la susceptibilité aux colites inflammatoires plus tard au cours de la vie.

Conclusion et perspectives

Ce travail conforte l'hypothèse d'une origine développementale des maladies intestinales chroniques. Un environnement nutritionnel délétère pendant les premières semaines de vie altère la maturation de l'intestin, en particulier la barrière intestinale, ainsi que la colonisation bactérienne, chez la souris. Ces altérations du développement des fonctions intestinales sont associées à une susceptibilité accrue aux colites inflammatoires plus tard au cours de la vie, suggérant un effet de programmation de l'environnement nutritionnel précoce (figure 17).

Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer le rôle de l'environnement nutritionnel précoce sur le risque de maladies intestinales au cours de la vie, identifier d'autres facteurs environnementaux périnataux pouvant influencer la santé intestinale à long terme, préciser la fenêtre de sensibilité au cours de laquelle ces facteurs pourraient être délétères pour l'intestin, et enfin, identifier les mécanismes sous-jacents impliqués. L'intestin en développement est le siège de modifications épigénétiques. Ces dernières touchent en particulier des gènes impliqués dans la barrière intestinale, tels que MUC2, TFF3, TLR3, TLR4, et des gènes du HLA classe II (Kraiczy *et al.*, 2016). Les modifications épigénétiques sont extrêmement sensibles aux facteurs environnementaux, notamment nutritionnels (Schaible *et al.*, 2011). Le microbiote intestinal peut lui aussi induire des modifications épigénétiques au niveau de la muqueuse intestinale. Les acides gras à chaînes courtes et les folates, issus de la production bactérienne, modulent l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN respectivement (Alenghat et Artis, 2014). L'environnement nutritionnel précoce, et les modifications du microbiote intestinal associées,

pourraient induire des modifications épigénétiques dans l'intestin en développement. En modulant l'expression de gènes impliqués dans le maintien de la barrière intestinale et l'homéostasie immunitaire, ces modifications épigénétiques pourraient favoriser le risque de maladies intestinales au cours de la vie. Le défi des études futures est d'identifier les marques épigénétiques associées à une modification de l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire de l'intestin, et de déterminer leur caractère réversible ou non. La mise en évidence de modifications épigénétiques permettrait de développer des biomarqueurs pour identifier les sujets à risque de maladies intestinales chroniques et proposer ainsi des stratégies de prévention. Une étude de la méthylation de l'ADN au niveau de l'iléon et du côlon des animaux avec RCPN est en cours, et permettra peut être d'identifier les mécanismes impliqués dans l'impact du RCPN sur la santé intestinale à long terme.

La mise en évidence de l'impact à long terme de l'environnement nutritionnel au cours des 1000 premiers jours de vie sur la santé intestinale souligne l'importance de promouvoir des recommandations nutritionnelles pour les jeunes couples susceptibles d'avoir des enfants, les femmes enceintes, les mères allaitantes et les jeunes enfants. Des interventions permettant de prévenir les conséquences à long terme sur la santé intestinale d'un environnement nutritionnel délétère en renforçant la barrière intestinale pourraient être proposées chez les enfants identifiés comme ayant un risque ultérieur de maladies intestinales compte-tenu du contexte périnatal. Les pré- et les probiotiques semblent être des candidats prometteurs. L'administration de *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) accélère la maturation de la barrière intestinale chez la souris. La perméabilité intestinale de souriceaux âgés de deux semaines ayant reçu du LGG est comparable à celle de souriceaux âgés de trois semaines et s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la claudine 3 (Patel *et al.*, 2012). La supplémentation en *Lactobacillus* pendant la période postnatale précoce prévient l'augmentation de la perméabilité intestinale et l'adhésion bactérienne à la muqueuse secondaires à un stress de séparation maternelle chez le raton (Vanhaecke *et al.*,

2017 ; Gareau *et al.*, 2007). Les probiotiques sont capables également de moduler la réponse inflammatoire de l'intestin en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires et/ou en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires. *Bifidobacterium infantis* inhibe *in vitro* la production d'IL-17 et augmente la sécrétion d'IL-10 (Tanabe *et al.*, 2008). L'effet immunomodulateur des probiotiques est associé à une diminution de la susceptibilité aux colites chimiquement induites chez l'animal. L'administration du mélange de probiotiques VSL#3 diminue la sévérité de la colite induite par le DSS chez la souris *Muc2*$^{-/-}$ (Kumar *et al.*, 2016). L'administration de LGG pendant la gestation et la lactation augmente la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales, la formation des jonctions serrées, la production de sIgA, ainsi que la richesse et la diversité du microbiote intestinal chez le souriceau. À l'âge adulte, la colite induite par le DSS est moins sévère chez les animaux exposés au LGG pendant la période périnatale, suggérant un effet de programmation des probiotiques (Yan *et al.*, 2017). L'effet immunomodulateur des probiotiques est toutefois variable selon la souche utilisée, la dose, la fenêtre d'administration, et l'environnement nutritionnel et bactérien (López *et al.*, 2010 ; Tanabe *et al.*, 2008 ; Pot *et al.*, 2013). Les résultats des essais cliniques portant sur l'efficacité des probiotiques dans le traitement des MICI sont d'ailleurs décevants (Ghouri *et al.*, 2014), probablement parce que les interventions étaient réalisées chez des patients adultes dont le système immunitaire n'est plus aussi modulable que le système immunitaire en développement du jeune enfant. Seule la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 a montré une efficacité comparable à la mesalazine dans la survenue de rechute chez les patients atteints de rectocolite hémorragique (Kruis *et al.*, 2004). Tout l'enjeu de la conception des essais sur les probiotiques réside donc dans la sélection de la meilleure souche et de la meilleure fenêtre d'intervention. Le concept de renforcement de la barrière intestinale par l'administration de prébiotiques stimulant la croissance des bactéries productrices d'acides gras à chaînes courtes est aussi attractif. La supplémentation en galacto-oligosaccharides et fructo-oligosaccharides pendant la période néonatale stimule la croissance des bifidobactéries et augmente la concentration fécale en acides gras à chaînes courtes chez le

nourrisson (Knol *et al.*, 2005). Chez le rongeur, l'administration d'oligosaccharides pendant la gestation et/ou la lactation modifie à long terme la composition du microbiote intestinal (Morel *et al.*, 2015) et réduit la susceptibilité aux allergies alimentaires à l'âge adulte (Bouchau *et al.*, 2016). Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour déterminer si l'effet de programmation des prébiotiques sur le microbiote intestinal est bénéfique pour la santé intestinale à long terme.

En conclusion, ce travail souligne l'importance de l'environnement nutritionnel précoce dans la programmation de la santé intestinale. Si ces résultats expérimentaux sont confirmés chez l'Homme, des stratégies d'interventions nutritionnelles, telles qu'une supplémentation en pré- et/ou probiotiques, pourraient être proposées chez les jeunes enfants à risque de maladies intestinales chroniques plus tard au cours de la vie.

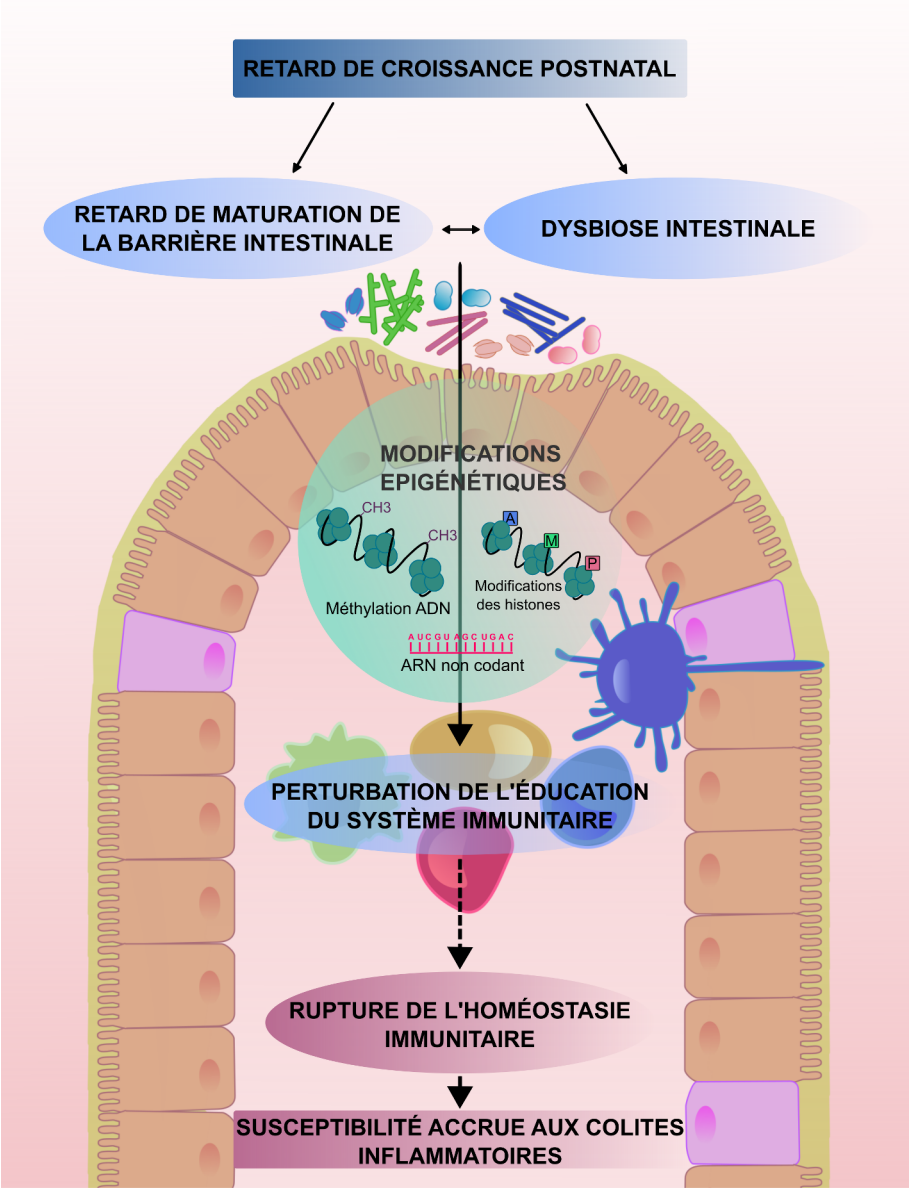


Figure 17. Effet de programmation du retard de croissance postnatal sur la santé intestinale. Le retard de croissance postnatal (RCPN) altère la maturation de la barrière intestinale, ainsi que la colonisation bactérienne. Ces altérations survenant à un moment critique du développement du système immunitaire, pourraient perturber à long terme l'homéostasie immunitaire de l'intestin, conduisant ainsi à une susceptibilité accrue aux colites inflammatoires à l'âge adulte. L'effet de programmation du RCPN pourrait impliqué des modifications épigénétiques dans l'intestin en développement. *A, acétylation des histones; M, méthylation des histones; P, phosphorylation des histones ; CH3, groupement méthyl.*

Références bibliographiques

A

Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. Sci Transl Med. 2014;6:237ra65.

Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. Nat Rev Immunol. 2010;10:131-144.

Adlercreutz EH, Wingren CJ, Vincente RP, Merlo J, Agardh D. Perinatal risk factors increase the risk of being affected by both type 1 diabetes and coeliac disease. Acta Paediatr. 2015;104:178-184.

Ahmad MS, Krishnan S, Ramakrishna BS, Mathan M, Pulimood AB, Murthy SN. Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice. Gut. 2000;46:493-499.

Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. Arch Dis Child. 2006;91:39-43.

Albenberg L, Esipova TV, Judge CP, et al. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. Gastroenterology. 2014;147:1055-1063.

Alenghat T, Artis D. Epigenomic regulation of host-microbiota interactions. Trends Immunol. 2014;35:518-525.

Alex P, Zachos NC, Nguyen T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. Inflamm Bowel Dis. 2009;15:341-352.

Amarri S, Benatti F, Callegari ML, et al. Changes of gut microbiota and immune markers during the complementary feeding period in healthy breast-fed infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2006;42:488-495.

Anderson RC, Dalziel JE, Gopal PK, Bassett S, Ellis A, Roy NC. The role of intestinal barrier function in early life in the development of colitis. In: Colitis. Dr Fukata M, InTech; 2012.

Aoki N, Kawamura M, Matsuda T. Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland. Biochim Biophys Acta. 1999;1427:298-306.

Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. Nature. 2013;504:451-455.

Aspberg S, Dahlquist G, Kahan T, Källén B. Fetal and perinatal risk factors for inflammatory bowel disease. Acta Paediatr. 2006;95:1001-1004.

Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. Nature. 2013;500:232-236.

Aujnarain A, Mack DR, Benchimol EI. The role of the environment in the development of pediatric inflammatory bowel disease. Curr Gastroenterol Rep. 2013;15:326.

Auricchio S, Stellato A, De Vizia B. Development of brush border peptidases in human and rat small intestine during fetal and neonatal life. Pediatr Res. 1981;15:991-995.

Avila CG, Harding R, Rees S, Robinson PM. Small intestinal development in growth-retarded fetal sheep. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1989;8:507-515.

Azad MB, Konya T, Persaud RR, et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. BJOG. 2016;123:983-993.

B

Bábíčková J, Tóthová Ľ, Lengyelová E, et al. Sex differences in experimentally induced colitis in mice: a role for estrogens. inflammation. 2015;38:1996-2006.

Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. Cell Host Microbe. 2015;17:690-703.

Bager P, Simonsen J, Nielsen NM, Frisch M. Cesarean section and offspring's risk of inflammatory bowel disease: a national cohort study. Inflamm Bowel Dis. 2012;18:857-862.

Barclay AR, Russell RK, Wilson ML, Gilmour WH, Satsangi J, Wilson DC. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. J Pediatr. 2009;155:421-426.

Barker DJ. P. The origins of the developmental origins theory. J Intern Med. 2007;261:412-417.

Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. Lancet. 1989;2:577-580.

Baron S, Turck D, Leplat C. Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. Gut. 2005;54:357-363.

Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. Environ Health. 2012;11:42.

Barreau F, Cartier C, Leveque M, et al. Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. J Physiol. 2007;580:347-356.

Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. Gut. 2004;53:501-506.

Barrenetxe J, Villaro AC, Guembe L, et al. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. Gut. 2002;50:797-802.

Baserga M, Bertolotto C, Maclennan NK, et al. Uteroplacental insufficiency decreases small intestine growth and alters apoptotic homeostasis in term intrauterine growth retarded rats. Early Hum Dev. 2004;79:93-105.

Bloomfield FH, Bauer MK, van Zijl PL, Gluckman PD, Harding JE. Amniotic IGF-I supplements improve gut growth but reduce circulating IGF-I in growth-restricted fetal sheep. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;282:259-269.

Bouchaud G, Castan L, Chesné J, et al. Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevents food allergies and promotes tolerance in offspring in mice. Allergy. 2016;71:68-76.

Boudry G, Douard V, Mourot J, Lallès J-P, Le Huërou-Luron I. Linseed oil in the maternal diet during gestation and lactation modifies fatty acid composition, mucosal architecture, and mast cell regulation of the ileal barrier in piglets. J Nutr. 2009;139:1110-1117.

Boudry G, Jamin A, Chatelais L, Gras-Le Guen C, Michel C, Le Huërou-Luron I. Dietary protein excess during neonatal life alters colonic microbiota and mucosal response to inflammatory mediators later in life in female pigs. J Nutr. 2013;143:1225-1232.

Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011;52:238-250.

Buchmiller-Crair TL, Gregg JP, Rivera FA, Choi RS, Diamond JM, Fonkalsrud EW. Delayed disaccharidase development in a rabbit model of intrauterine growth retardation. Pediatr Res. 2001;50:520-524.

Bulfin LJ, Clarke MA, Buller KM, Spencer SJ. Anxiety and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychological stress are attenuated in male rats made lean by large litter rearing. Psychoneuroendocrinology. 2011;36:1080-1091.

Buts JP, De Keyser N, Kolanowski J, Van Hoof F. Hormonal regulation of the rat small intestine: responsiveness of villus and crypt cells to insulin during the suckling period and unresponsiveness after weaning. Pediatr Res. 1990;27:161-164.

Buts JP, De Keyser N, Marandi S, et al. Expression of insulin receptors and of 60-kDa receptor substrate in rat mature and immature enterocytes. Am J Physiol. 1997;273:217-226.

C

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods. 2010;7:335-336.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. ISME J. 2012;6:1621-1624.

Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. Infect Immun. 2000;68:7010-7017.

Carlile AE, Beck F. Maturation of the ileal epithelium in the young rat. J Anat. 1983;137:357-369.

Casabiell X, Piñeiro V, Tomé MA, Peinó R, Diéguez C, Casanueva FF. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82:4270-4273.

Caselli M, Holton J, Boldrini P, Vaira D, Calò G. Morphology of segmented filamentous bacteria and their patterns of contact with the follicle-associated epithelium of the mouse terminal ileum: implications for the relationship with the immune system. Gut Microbes . 2010;1:367-372.

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

Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. Dev Immunol. 1998;6:13-18.

Chango A, Pogribny IP. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. Nutrients. 2015;7:2748-2770.

Chatelais L, Jamin A, Gras-Le Guen C, Lallès J-P, Le Huërou-Luron I, Boudry G. The level of protein in milk formula modifies ileal sensitivity to LPS later in life in a piglet model. PLoS One. 2011;6:e19594.

Clarke M, Cai G, Saleh S, Buller KM, Spencer SJ. Being suckled in a large litter mitigates the effects of early-life stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the male rat. J Neuroendocrinol. 2013;25:792-802.

Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. Sci Rep. 2016;6:23129.

Colony PC. Successive phases of human fetal intestinal development. In: Nutritional adaptation of the gastrointestinal tract of the newborn. New York: N. Kretchmer and A. Minkowski, Nestlé Vevey/Raven Press; 1983.

Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2011;140:1785-1794.

Crnic LS. Models of infantile malnutrition in rats: effects on maternal behavior. Dev Psychobiol. 1980;13:615-628.

Crnic LS, Chase HP. Models of infantile undernutrition in rats: effects on milk. J Nutr. 1978;108:1755-1760.

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

D

Darmoul D, Rouyer-Fessard C, Blais A, et al. Dipeptidyl peptidase IV expression in rat jejunal crypt-villus axis is controlled at mRNA level. Am J Physiol. 1991;261:763-769.

Decker E, Engelmann G, Findeisen A, et al. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. Pediatrics. 2010;125:1433-1440.

Dekaney CM, Bazer FW, Jaeger LA. Mucosal morphogenesis and cytodifferentiation in fetal porcine small intestine. Anat Rec. 1997;249:517-523.

Desseyn J-L, Gouyer V, Gottrand F. Biological modeling of mucus to modulate mucus barriers. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2016;310:G225-227.

Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. Clin Exp Immunol. 1998;114:385-391.

Dimitsantos E, Escorihuela RM, Fuentes S, Armario A, Nadal R. Litter size affects emotionality in adult male rats. Physiol Behav. 2007;92:708-716.

D'Inca R, Kloareg M, Gras-Le Guen C, Le Huërou-Luron I. Intrauterine growth restriction modifies the developmental pattern of intestinal structure, transcriptomic profile, and bacterial colonization in neonatal pigs. J Nutr. 2010;140:925-931.

Dong L, Zhong X, Ahmad H, et al. Intrauterine growth restriction impairs small intestinal mucosal immunity in neonatal piglets. J Histochem Cytochem. 2014;62:510-518.

Dong L, Zhong X, He J, et al. Supplementation of tributyrin improves the growth and intestinal digestive and barrier functions in intrauterine growth-restricted piglets. Clin Nutr. 2016;35:399-407.

Droste JH, Wieringa MH, Weyler JJ, Nelen VJ, Vermeire PA, Van Bever HP. Does the use of antibiotics in early childhood increase the risk of asthma and allergic disease? Clin Exp Allergy. 2000;30:1547-1553.

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

E

Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics. 2010;26:2460-2461.

El-Mohandes AE, Keiser JF, Refat M, Jackson BJ. Prevalence and toxigenicity of Clostridium difficile isolates in fecal microflora of preterm infants in the intensive care nursery. Biol Neonate. 1993;63:225-229.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 1995;109:1344-1367.

Erickson AR, Cantarel BL, Lamendella R, et al. Integrated metagenomics/metaproteomics reveals human host-microbiota signatures of Crohn's disease. PloS One. 2012;7:e49138.

F

Fança-Berthon P, Michel C, Pagniez A, et al. Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. Pediatr Res. 2009;66:47-52.

Fança-Berthon P, Hoebler C, Mouzet E, David A, Michel C. Intrauterine growth restriction not only modifies the cecocolonic microbiota in neonatal rats but also affects its activity in young adult rats. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010;51:402-413.

Fan MZ, Adeola O, Asem EK. Characterization of brush border membrane-bound alkaline phosphatase activity in different segments of the porcine small intestine. J Nutr Biochem. 1999;10:299-305.

Fan MZ, Stoll B, Jiang R, Burrin DG. Enterocyte digestive enzyme activity along the crypt-villus and longitudinal axes in the neonatal pig small intestine. J Anim Sci. 2001;79:371-381.

Faust IM, Johnson PR, Hirsch J. Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. J Nutr. 1980;110:2027-2034.

Fernandez-Jimenez N, Castellanos-Rubio A, Plaza-Izurieta L, et al. Coregulation and modulation of NFκB-related genes in celiac disease: uncovered aspects of gut mucosal inflammation. Hum Mol Genet. 2014;23:1298-1310.

Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. Am J Physiol. 1991;260:R1104-1113.

Firmansyah A, Suwandito L, Penn D, Lebenthal E. Biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats after prenatal and postnatal malnutrition. Am J Clin Nutr. 1989;50:261-268.

Fuentes IM, Walker NK, Pierce AN, Holt BR, Di Silvestro ER, Christianson JA. Neonatal maternal separation increases susceptibility to experimental colitis and acute stress exposure in male mice. IBRO Rep. 2016;1:10-18.

G

Gabory A, Attig L, Junien C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. Mol Cell Endocrinol. 2009;304:8-18.

Galler JR, Turkewitz G. Variability of the effects of rearing in a large litter on the development of the rat. Dev Psychobiol. 1975;8:325-331.

Gareau MG, Jury J, MacQueen G, Sherman PM, Perdue MH. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. Gut. 2007;56:1522-1528.

Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. Cell. 2010;140:859-870.

Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. Cell Host Microbe. 2014;15:382-392.

Ghouri YA, Richards DM, Rahimi EF, Krill JT, Jelinek KA, DuPont AW. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. Clin Exp Gastroenterol. 2014;7:473-487.

Göker M, Gronow S, Zeytun A, et al. Complete genome sequence of Odoribacter splanchnicus type strain (1651/6). Stand Genomic Sci. 2011;4:200-209.

Gomez de Agüero M, Ganal-Vonarburg SC, Fuhrer T, et al. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. Science. 2016;351:1296-1302.

Gordon L, Joo JE, Powell JE, et al. Neonatal DNA methylation profile in human twins is specified by a complex interplay between intrauterine environmental and genetic factors, subject to tissue-specific influence. Genome Res. 2012;22:1395-1406.

Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. Clin Exp Allergy. 2013;43:198-211.

Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. Nutr Rev. 2015;73:32-40.

Gouyer V, Dubuquoy L, Robbe-Masselot C, et al. Delivery of a mucin domain enriched in cysteine residues strengthens the intestinal mucous barrier. Sci Rep. 2015;5:9577.

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

H

Haas BJ, Gevers D, Earl AM, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. Genome Res. 2011;21:494-504.

Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia. 1992;35:595-601.

Hall RA, Widdowson EM. Response of the organs of rabbits to feeding during the first days after birth. Biol Neonate. 1979;35:131-139.

Hall RD. The role of body size in climbing and locomotor behavior of protein-malnourished and well-nourished rats. Dev Psychobiol. 1984;17;91-106.

Hamm CA, Costa FF. Epigenomes as therapeutic targets. Pharmacol Ther. 2015;151:72-86.

Hanson MA, Gluckman PD. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? Physiol Rev. 2014;94:1027-1076.

Han W, Mercenier A, Ait-Belgnaoui A, et al. Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. Inflamm Bowel Dis. 2006;12:1044-1052.

Hatch TF, Lebenthal E, Branski D, Krasner J. The effect of early postnatal acquired malnutrition on intestinal growth, disaccharidases and enterokinase. J Nutr. 1979;109:1874-1879.

Hausberger FX, Volz JE. Feeding in infancy, adipose tissue cellularity and obesity. Physiol Behav. 1984;33:81-87.

Heindel JJ, Vandenberg LN. Developmental origins of health and disease: a paradigm for understanding disease cause and prevention. Curr Opin Pediatr. 2015;27:248-253.

Henning SJ. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. Am J Physiol. 1978;235:E451-456.

Hildebrand H, Malmborg P, Askling J, Ekbom A, Montgomery SM. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. Scand J Gastroenterol. 2008;43:961-966.

Hodin RA, Chamberlain SM, Meng S. Pattern of rat intestinal brush-border enzyme gene expression changes with epithelial growth state. Am J Physiol. 1995;269:C385-391.

Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, Anderson JM. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. Gene Expr Patterns. 2006;6:581-588.

Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science. 2001;291:881-884.

Hooper LV. Bacterial contributions to mammalian gut development. Trends Microbiol. 2004; 12:129–134.

Houghteling PD, Walker WA. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2015;60:294-307.

Hutfless S, Li D-K, Heyman MB, Bayless TM, Abramson O, Herrinton LJ. Prenatal and perinatal characteristics associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 2012;57:2149-2156.

Hviid A, Svanström H, Frisch M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. Gut. 201;60:49-54.

I

Iiboshi Y, Nezu R, Khan J, et al. Developmental changes in distribution of the mucous gel layer and intestinal permeability in rat small intestine. JPEN. 1996;20:406-411.

Innis SM, Dai C, Wu X, Buchan AMJ, Jacobson K. Perinatal lipid nutrition alters early intestinal development and programs the response to experimental colitis in young adult rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010;299:G1376-1385.

Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell. 2009;139:485-498.

Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA. Breast-feeding protects against celiac disease. Am J Clin Nutr. 2002;75:914-921.

J

Jacobson K, Mundra H, Innis SM. Intestinal responsiveness to experimental colitis in young rats is altered by maternal diet. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005;289:G13-20.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet. 2003;33;245-254.

Jakobsen C, Paerregaard A, Munkholm P, Wewer V. Environmental factors and risk of developing paediatric inflammatory bowel disease - a population based study 2007-2009. J Crohns Colitis. 2013;7:79-88.

Jangi S, Lamont JT. Asymptomatic colonization by Clostridium difficile in infants: implications for disease in later life. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010;51:2-7.

Jiménez E, Marín ML, Martín R, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? Res Microbiol. 2008;159:187-193.

K

Kavanaugh D, O'Callaghan J, Kilcoyne M, Kane M, Joshi L, Hickey RM. The intestinal glycome and its modulation by diet and nutrition. Nutr Rev. 2015;73;359-375.

Khalili H, Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT. Early life factors and risk of inflammatory bowel disease in adulthood. Inflamm Bowel Dis. 2013;19:542-547.

Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2015;1:154-170.

Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. Am J Clin Nutr. 2004;80:1342-1352.

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 2013;41:e1.

Knol J, Scholtens P, Kafka C, et al. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2005;40:36-42.

Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. Gastroenterology. 2014;146:1489-1499.

Kozyrskyj AL, Ernst P, Becker AB. Increased risk of childhood asthma from antibiotic use in early life. Chest. 2007;131:1753-1759.

Kraiczy J, Nayak K, Ross A, et al. Assessing DNA methylation in the developing human intestinal epithelium: potential link to inflammatory bowel disease. Mucosal Immunol. 2016;9:647-658.

Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut. 2004;53:1617-1623.

Kumar M, Kissoon-Singh V, Coria AL, Moreau F, Chadee K. Probiotic mixture VSL#3 reduces colonic inflammation and improves intestinal barrier function in Muc2 mucin-deficient mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2017;312:G34-G45.

L

Lackeyram D, Yang C, Archbold T, Swanson KC, Fan MZ. Early weaning reduces small intestinal alkaline phosphatase expression in pigs. J Nutr. 2010;140:461-468.

Lambert EV, Koeslag JH. No persistent effect of preweaning nutrition on postweaning food intake, feeding efficiency, or body energy stores in Long-Evans rats. Physiol Behav. 1992;52:363-372.

Ledford H. Epigenetics: The genome unwrapped. Nature. 2015;528:S12-13.

Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 2011;108:4615-4622.

Lennon EM, Maharshak N, Elloumi H, Borst L, Plevy SE, Moeser AJ. Early life stress triggers persistent colonic barrier dysfunction and exacerbates colitis in adult IL-10-/- mice. Inflamm Bowel Dis. 2013;19:712-719.

Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, et al. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. N Engl J Med. 2014;371:1295-1303.

Littman DR, Pamer EG. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. Cell Host Microbe. 2011;10:311-323.

López P, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. Distinct Bifidobacterium strains drive different immune responses in vitro. Int J Food Microbiol. 2010;138:157-165.

Lozupone C, Hamady M, Knight R. UniFrac--an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. BMC Bioinformatics. 2006;7:371.

Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2005;71:8228-8235.

Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. Cell Host Microbe. 2007;2:204.

M

Madan JC, Hoen AG, Lundgren SN, et al. Association of cesarean delivery and formula supplementation with the intestinal microbiome of 6-week-old infants. JAMA Pediatr. 2016;170:212-219.

Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. Gut. 2016; 65:330-339.

Mårild K, Stephansson O, Montgomery S, Murray JA, Ludvigsson JF. Pregnancy outcome and risk of celiac disease in offspring: a nationwide case-control study. Gastroenterology. 2012;142:39-45.

Maukonen J, Kolho K-L, Paasela M, et al. Altered fecal microbiota in paediatric inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis. 2015;9:1088-1095.

Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. Cell. 2005;122:107-118.

McDermott E, Ryan EJ, Tosetto M, et al. DNA methylation profiling in inflammatory bowel disease provides new insights into disease pathogenesis. J Crohns Colitis 2016;10:77-86.

Melgar S, Bjursell M, Gerdin A-K, Svensson L, Michaëlsson E, Bohlooly-Y M. Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007;292:G165-172.

Ménard D, Malo C, Calvert R. Insulin accelerates the development of intestinal brush border hydrolytic activities of suckling mice. Dev Biol. 1981;85:150-155.

Michiels J, De Vos M, Missotten J, Ovyn A, De Smet S, Van Ginneken C. Maturation of digestive function is retarded and plasma antioxidant capacity lowered in fully weaned low birth weight piglets. Br J Nutr. 2013;109:65-75.

Mickiewicz M, Zabielski R, Grenier B, et al. Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy. J Physiol Pharmacol. 2012;63:225-239.

Mischke M, Plosch T. The gut microbiota and their metabolites: potential implications for the host epigenome. In: Schwiertz A, ed. Microbiota of the Human Body. Springer; 2016.

Mishra A, Prakash S, Sreenivas V, et al. Structural and functional changes in the tight junctions of asymptomatic and serology-negative first-degree relatives of patients with celiac disease. J Clin Gastroenterol. 2016;50:551-560.

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

Moog F. Endocrine influences on the functional differentiation of the small intestine. J Anim Sci. 1979;49:239-249.

Morel FB, Oozeer R, Piloquet H, et al. Preweaning modulation of intestinal microbiota by oligosaccharides or amoxicillin can contribute to programming of adult microbiota in rats. Nutrition. 2015;31:515-522.

Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. Genome Biol. 2012;13:R79.

Moussaoui N, Braniste V, Ait-Belgnaoui A, et al. Changes in intestinal glucocorticoid sensitivity in early life shape the risk of epithelial barrier defect in maternal-deprived rats. PloS One. 2014;9:e88382.

Moussaoui N, Jacobs JP, Larauche M, et al. Chronic early-life stress in rat pups alters basal corticosterone, intestinal permeability, and fecal microbiota at weaning: influence of sex. J Neurogastroenterol Motil. 2017;23:135-143.

Mozes S, Bujňáková D, Šefčíková Z, Kmet V. Developmental changes of gut microflora and enzyme activity in rat pups exposed to fat-rich diet. Obesity. 2008;16:2610-2615.

Mozes S, Šefčíková Z, Lenhardt L. Functional changes of the small intestine in over- and undernourished suckling rats support the development of obesity risk on a high-energy diet in later life. Physiol Res. 2007;56:183-192.

Munyaka PM, Eissa N, Bernstein CN, Khafipour E, Ghia J-E. Antepartum antibiotic treatment increases offspring susceptibility to experimental colitis: a role of the gut microbiota. PloS One. 2015;10:e0142536.

N

Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol. 2014;14:329-342.

Nisticò L, Fagnani C, Coto I, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. Gut. 2006;55:803-808.

O

Oines E, Murison R, Mrdalj J, Grønli J, Milde AM. Neonatal maternal separation in male rats increases intestinal permeability and affects behavior after chronic social stress. Physiol Behav. 2012;105:1058-1066.

Olszak T, An D, Zeissig S, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. Science. 2012;336:489-493.

Ottewell PD, Duckworth CA, Varro A, et al. Gastrin increases murine intestinal crypt regeneration following injury. Gastroenterology. 2006;130:1169-1180.

P

Pácha J, Vagnerová R, Bryndová J. Carbenoxolone accelerates maturation of rat intestine. Pediatr Res. 2003;53:808-813.

Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. Immunology. 2004;113:153-162.

Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, Maheshwari A, Nusrat A, Lin PW. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. Am J Pathol. 2012;180:626-635.

Patterson CM, Bouret SG, Park S, Irani BG, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Large litter rearing enhances leptin sensitivity and protects selectively bred diet-induced obese rats from becoming obese. Endocrinology. 2010;151:4270-4279.

Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics. 2006;118:511-521.

Perez PF, Doré J, Leclerc M, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? Pediatrics. 2007;119:e724-732.

Plagemann A, Harder T, Rake A, et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. J Neuroendocrinol. 1999;11:541-546.

Pot B, Foligné B, Daniel C, Grangette C. Understanding immunomodulatory effects of probiotics. Nestle Nutr Inst Workshop Ser. 2013;77:75-90.
Preidis GA, Ajami NJ, Wong MC, Bessard BC, Conner ME, Petrosino JF. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. J Nutr Biochem. 2015;26:1050-1057.

Pruesse E, Quast C, Knittel K, et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Res. 2007;35:7188-7196.

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

R

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell. 2004;118:229-241.

Rautava S, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Neonatology. 2012;102:178-184.

Rautava S, Walker WA. Commensal bacteria and epithelial cross talk in the developing intestine. Curr Gastroenterol Rep. 2007;9:385-392.

Reddy KVK, Naidu KA. Maternal and neonatal dietary intake of balanced n-6/n-3 fatty acids modulates experimental colitis in young adult rats. Eur J Nutr. 2016;55:1875-1890.

Roberts SE, Wotton CJ, Williams JG, Griffith M, Goldacre MJ. Perinatal and early life risk factors for inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2011;17:743-749.

Rödel HG, Meyer S, Prager G, Stefanski V, Hudson R. Litter size is negatively correlated with corticosterone levels in weanling and juvenile laboratory rats. Physiol Behav. 2010;99:644-650.

Rodrigues-Sousa T, Ladeirinha AF, Santiago AR, et al. Deficient production of reactive oxygen species leads to severe chronic DSS-induced colitis in Ncf1/p47phox-mutant mice. PloS One. 2014;9:e97532.

Rothman D, Udall JN, Pang KY, Kirkham SE, Walker WA. The effect of short-term starvation on mucosal barrier function in the newborn rabbit. Pediatr Res. 1985;19:727-731.

Russell JA. Milk yield, suckling behaviour and milk ejection in the lactating rat nursing litters of different sizes. J Physiol. 1980;303:403-415.

S

Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. Am J Clin Nutr. 2004;79:261-267.

Schaible TD, Harris RA, Dowd SE, Smith CW, Kellermayer R. Maternal methyl-donor supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. Hum Mol Genet. 2011;20:1687-1696.

Scholtens PAMJ, Oozeer R, Martin R, Amor KB, Knol J. The early settlers: intestinal microbiology in early life. Annu Rev Food Sci Technol. 2012;3:425-447.

Šefčíková Z, Bujňáková D, Raček Ľ, Kmet V, Mozeš Š. Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests. Physiol Res. 2011;60:337-346.

Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2010;105:2687-2692.

Shehadeh N, Gelertner L, Blazer S, Perlman R, Solovachik L, Etzioni A. Importance of insulin content in infant diet: suggestion for a new infant formula. Acta Paediatr. 2001;90:93-95.

Shulman RJ. Effect of enteral administration of insulin on intestinal development and feeding tolerance in preterm infants: a pilot study. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2002;86:F131–133.

Simeoni U, Bocquet A, Briend A, et al. Early origins of adult disease. Arch Pediatr. 2016;23:443-446.

Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. Science 2013;341:569-573.

Soh S-E, Chong Y-S, Kwek K, et al. Insights from the growing up in singapore towards healthy outcomes (gusto) cohort study. Ann Nutr Metab. 2014;64:218-225.

Sonntag B, Stolze B, Heinecke A, et al. Preterm birth but not mode of delivery is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease later in life. Inflamm Bowel Dis. 2007;13:1385-1390.

Stoddart RW, Widdowson EM. Changes in the organs of pigs in response to feeding for the first 24 h after birth. III. Fluorescence histochemistry of the carbohydrates of the intestine. Biol Neonate. 1976;29:18-27.

Stokholm J, Thorsen J, Chawes BL, et al. Cesarean section changes neonatal gut colonization. J Allergy Clin Immunol. 2016;138:881-889.

Storey JD. A direct approach to false discovery rates. J R Stat Soc B. 2002;64:479-498.

Stout MJ, Conlon B, Landeau M, et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. Am J Obstet Gynecol. 2013;208:226.e1-7.

Szajewska H, Shamir R, Chmielewska A, et al. Systematic review with meta-analysis: early infant feeding and coeliac disease-update 2015. Aliment Pharmacol Ther. 2015;41:1038-1054.

T

Tahara T, Shibata T, Nakamura M, et al. Promoter methylation of protease-activated receptor (PAR2) is associated with severe clinical phenotypes of ulcerative colitis (UC). Clin Exp Med. 2009;9:125-130.
Tanabe S, Kinuta Y, Saito Y. Bifidobacterium infantis suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. Int J Mol Med. 2008;22:181-185.

Tanaka S, Kobayashi T, Songjinda P, et al. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009;56:80-87.

Trahair JF. Remodeling of the rat small intestinal mucosa during the suckling period. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1989;9:232-237.

Trahair JF, Wilson JM, Neutra MR. Identification of a marker antigen for the endocytic stage of intestinal development in rat, sheep, and human. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1995;21:277-287.

Tsuboi KK, Castillo RO. Development of jejunoileal differences in rat intestine. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1989;9:140-143.

Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, et al. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:7503-7508.

U

Uçar B, Kirel B, Bör O, et al. Breast milk leptin concentrations in initial and terminal milk samples: relationships to maternal and infant plasma leptin concentrations, adiposity, serum glucose, insulin, lipid and lipoprotein levels. J Pediatr Endocrinol Metab. 2000;13:149-156.

Ungaro R, Bernstein CN, Gearry R, et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2014;109:1728-1738.

V

Valatas V, Bamias G, Kolios G. Experimental colitis models: Insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease and translational issues. Eur J Pharmacol. 2015;759:253-264.

Van Dongen J, Ehli EA, Slieker RC, et al. Epigenetic variation in monozygotic twins: a genome-wide analysis of DNA methylation in buccal cells. Genes. 2014;5:347-365.

Vanhaecke T, Aubert P, Grohard P-A, et al. L. fermentum CECT 5716 prevents stress-induced intestinal barrier dysfunction in newborn rats. Neurogastroenterol Motil. 2017;doi:10.1111/nmo.13069.

Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. Gastroenterology. 2013;145:293-308.

Vickers MH. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. Nutrients. 2014;6:2165-2178.

Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, et al. Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. N Engl J Med. 2014;371:1304-1315.

Vukavić T. Timing of the gut closure. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1984;3:700-703.

W

Wagner CL, Taylor SN, Johnson D. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. Clin Rev Allergy Immunol. 2008;34:191-204.

Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. Pediatrics. 2005;115:5-9.

West CE, Renz H, Jenmalm MC, et al. The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: associations and potentials for gut microbiota therapies. J Allergy Clin Immunol. 2015;135:3-13.

Wilson JM, Whitney JA, Neutra MR. Biogenesis of the apical endosome-lysosome complex during differentiation of absorptive epithelial cells in rat ileum. J Cell Sci. 1991;100:133-143.

Wirtz S, Popp V, Kindermann M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. Nat Protoc. 2017;12:1295-1309.

Woliński J, Biernat M, Guilloteau P, Weström BR, Zabielski R. Exogenous leptin controls the development of the small intestine in neonatal piglets. J Endocrinol. 2003;177:215-222.

Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. Pediatr Allergy Immunol. 2014;25:428-438.

Wu H-J, Ivanov II, Darce J, et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. Immunity. 2010;32:815-827.

Wyatt J, Vogelsang H, Hübl W, Waldhöer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. Lancet. 1993;341:1437-1439.

X

Xu RJ, Mellor DJ, Birtles MJ, Reynolds GW, Simpson HV. Impact of intrauterine growth retardation on the gastrointestinal tract and the pancreas in newborn pigs. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1994;18:231-240.

Y

Yajima M, Nakayama M, Hatano S, et al. Bacterial translocation in neonatal rats: the relation between intestinal flora, translocated bacteria, and influence of milk. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2001;33:592-601.

Yan F, Liu L, Cao H, et al. Neonatal colonization of mice with LGG promotes intestinal development and decreases susceptibility to colitis in adulthood. Mucosal Immunol. 2016; 10:117-127.

Yan Y, Laroui H, Ingersoll SA, et al. Overexpression of Ste20-related proline/alanine-rich kinase exacerbates experimental colitis in mice. J Immunol. 2011;187:1496-1505.

Yu DH, Gadkari M, Zhou Q, et al. Postnatal epigenetic regulation of intestinal stem cells requires DNA methylation and is guided by the microbiome. Genome Biol. 2015;16:211.

Z

Zhang M, Liao Y, Lönnerdal B. Milk growth factors and expression of small intestinal growth factor receptors during the perinatal period in mice. Pediatr Res. 2016;80:759-765.

Zilbauer M. Epigenetics - a novel concept with exciting prospects for paediatric research. Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2014;99:67-69.

Annexe

Nutrition Reviews 2017;75:175-187

Article type: Special article - Narrative review

Title: Early life origin of intestinal inflammatory disorders

Delphine Ley[1], Jean-Luc Desseyn[1], Mona Mischke[2], Jan Knol[2,3], Dominique Turck[1], Frédéric Gottrand[1]

1. LIRIC UMR 995; Univ. Lille; Inserm; CHU Lille, F-59000 Lille, France

2. Nutricia Research, Utrecht, the Netherlands

3. Laboratory of Microbiology, Wageningen University, the Netherlands

Corresponding author:

Delphine Ley

Unité de Gastro-entérologie, Hépatologie et Nutrition - Pôle enfant - Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, Avenue Eugène Avinée, 59037 Lille Cedex, France

Tel: +33 3 20 44 61 26

Fax: +33 3 20 44 61 34

E-mail: delphine.ley@inserm.fr

ABSTRACT

A growing body of evidence supports the concept of perinatal programming through which the perinatal environment affects the development of the fetus and infant, thereby modifying the risk profile for disease later in life. Increasing attention is focusing on the role of the early environment in the development of chronic intestinal disorders. Epidemiological studies have highlighted the link between perinatal factors, such as breastfeeding, caesarean section, and antibiotic use, and an increased risk for inflammatory bowel disease and/or celiac disease. These links are consistent with the concept of perinatal programming of intestinal inflammatory disorders. Animal models have shown that the early life environment affects the development of the gastrointestinal tract. However, further experimental studies are needed to confirm the long-term effects of the perinatal environment on the susceptibility to chronic intestinal disorders later in life. Changes in the development and composition of the intestinal microbiota and epigenetics are emerging as key mechanisms through which the perinatal environment determines susceptibility to intestinal inflammatory disorders.

Keywords: perinatal programming, inflammatory bowel disease, celiac disease, intestinal microbiota, epigenetics

INTRODUCTION

The perinatal and early childhood periods, from conception until two years of age, — the so-called “first thousand days of life” — are critical in the development of the fetus and infant, and can modify the risk profile for disease later in life.[1] Over the last 25 years, the developmental origin of chronic noncommunicable diseases, referred to as the concept of perinatal programming, has emerged as an important aspect of the pathogenesis of these diseases. The concept of perinatal programming was first emphasized by Barker *et al.* in 1989, who reported a correlation between weight in infancy and death from ischemic heart disease in later life.[2] Epidemiological studies and experimental models in animals have since confirmed the association between the perinatal environment — especially the nutritional status of the mother, fetus, and infant — and the subsequent risk for diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and the metabolic syndrome in adulthood.[3,4] A growing number of studies have highlighted the role of epigenetic modifications, such as DNA methylation or histone modifications, in perinatal programming. Epigenetic modifications induced by the early life environment can affect gene expression in pathways associated with metabolic homeostasis and thus program phenotypic responses to later environmental challenges such as a high-fat diet.[4]

The gastrointestinal tract undergoes significant maturation during the perinatal period, that leads to the establishment of the intestinal barrier and immune homeostasis.[5–7] Dysfunction of the intestinal barrier is implicated as a critical component of chronic inflammatory disorders, including inflammatory bowel disease (IBD) and celiac disease.[7,8] IBD, including Crohn’s disease and ulcerative colitis, are incurable disorders, characterized by a chronic inflammation of the gastrointestinal tract, affecting mainly young adult. While the disease prognosis has changed with the discovery of biologics, IBD reduces the quality of life and functional status of patients. Dysfunction of the intestinal barrier and inappropriate immune response to the intestinal microbiota seem to be implicated in genetically susceptible individuals. Recent epidemiological data showed that the incidence of IBD is continually rising, indicating that not only the genetic predisposition is part of the pathogenesis, but that

also the environment may play a role.[9] Celiac disease is an immune-mediated disorder characterized by an enteropathy caused by the consumption of gluten in genetically susceptible individuals. The life-long gluten free diet suppresses symptoms and prevents the long-term complications of the disease, but primary prevention strategy would be beneficial given the dietary requirements. The prevalence of celiac disease is 1 to 3% in the general population while HLA-DQ2 and HLA-DQ8 risk haplotypes are present in 25% of the general population,[10] suggesting that environmental factors may trigger the development of the disease. Increasing evidence suggests that the perinatal environment can affect the developing gastrointestinal tract, including the intestinal microbiota, and modify the risk profile for intestinal inflammatory disorders later in life, including IBD and celiac disease.

In this review, we first provide an overview of the perinatal maturation of the intestinal barrier and the role of the intestinal microbiota in shaping its function. We then describe the existing evidence from clinical and experimental studies of the perinatal programming of intestinal inflammatory disorders, with a focus on IBD and celiac disease. Finally, we discuss the role of epigenetic mechanisms in the developmental origin of intestinal inflammatory disorders.

PERINATAL MATURATION OF THE INTESTINAL BARRIER

During the perinatal period, the gastrointestinal tract undergoes significant maturation to cope with the changes in nutritional supply and high nutritional needs of the young infant and to provide an effective barrier against potentially harmful agents (food antigens, microorganisms and their toxins).[5–7] The intestinal barrier is a complex structure comprising four components: (i) the intestinal microbiota, which produces antibacterial agents that prevent pathogen colonization, stimulates mucus production, and plays a critical role in the maturation of the immune system; (ii) the mucus layer, which protects the intestinal epithelium and contains antimicrobial peptides that prevent bacterial invasion; (iii) the intestinal epithelium and its intercellular junctions, which act as a physical barrier between the intestinal lumen and the inner milieu; and (iv) the immunological barrier made up of secretory immunoglobulin A (SIgA), antimicrobial peptides secreted by Paneth cells, and the mucosal immune system (Fig. 1).[7]

Maturation of the intestinal epithelial barrier in humans starts at the end of the first trimester of pregnancy and continues after birth.[5,7] Although the fetal intestinal epithelium is morphologically similar to the adult epithelium by 22 weeks of gestation, its functional maturation continues in the newborn. The “closure” of the leaky fetal intestinal epithelium to the external environment occurs during the first week after birth in humans with the maturation of the intercellular junctions, and thus prevents the passage of macromolecules such as food antigens and microorganisms and their toxins. [7,11,12] Goblet cells are present by 10 weeks of gestation and MUC2, the main gelling mucin in the intestinal mucus layer, is detected in the small intestine and the colon by 12 weeks of gestation.[5,6] All of the components of the immunological barrier are present before birth. Immune cells are first observed as early as 8 weeks of gestation. Production of antimicrobial peptides by Paneth cells — in particular the defensins and lysozyme — starts by week 13 and week 20 of gestation, respectively.[5] However, the immune system remains immature in the newborn and must learn to tolerate benign antigens and to activate defenses against pathogens in the luminal contents. The bacterial colonization of the gastrointestinal tract and the exposure to

food antigens contribute to the education of the immune system and the acquisition of immune tolerance to commensal bacteria and dietary antigens from birth through infancy and childhood.[13,14]

ROLE OF THE MICROBIOTA IN THE MATURATION AND MAINTENANCE OF THE INTESTINAL BARRIER

The intestinal microbiota and the host coexist in a mutually beneficial relationship. The host provides a niche that contains the nutrients necessary for the microbiota to persist. In turn, the intestinal microbiota is critical in the maturation of the intestinal barrier. Colonization of the gastrointestinal tract by bacteria induces changes in the expression of host genes involved in epithelial barrier function. Colonization of germ-free mice with the commensal bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* was associated with increased expression of genes involved in the transport of SIgA across the intestinal epithelium, inhibition of complement-mediated mucosal damage, and mucus layer component. Other commensal bacteria such as *Bifidobacterium infantis* and *Escherichia coli* modulated as well the expression of the host genes but to varying degrees depending on the bacterial species, which suggests that the composition of the microbiota may affect the maturation of the intestinal barrier.[15] Additionally, commensal bacteria play a critical role in the development of the mucosal immune system. Colonization of germ-free mice with commensal bacteria induced the expansion of the gut-associated lymphoid tissue, secretion of SIgA, and T-cell differentiation.[16] Moreover, the intestinal microbiota modulates the Th1/Th2 balance by determining the development of effector T-cells, and thus impact the direction of immune responses.[17] The microbiota is also critical for the maintenance of a functional intestinal barrier. The activation of the Toll-like receptors (TLRs) by the signals provided by bacteria (*i.e.* pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as bacterial lipopolysaccharide and peptidoglycan) induces epithelial cell proliferation, maintenance of tight junctions, and production of antimicrobial peptides and SIgA.[18] Moreover, the short-chain fatty acids (SCFA) produced by bacterial fermentation contribute to the maintenance of the intestinal epithelium

and protection against pathogen colonization. The SCFA butyrate is an important energy source for the intestinal epithelium and induces the differentiation of regulatory T-cells. Lactate and acetate from bacterial production form a chemical barrier against potential pathogens.[19,20]

Appropriate microbiota diversity and an effective intestinal barrier are essential for immune homeostasis. Disruption in intestinal microbiota diversity (dysbiosis) and/or compromised intestinal barrier function are linked to many disease states[21] including chronic inflammatory diseases such as obesity, food allergy, IBD, and celiac disease.[7,8,22,23] IBD is associated with an increased permeability of the intestinal epithelium.[24] Although the pathogenesis of IBD is unclear, it has been suggested that dysfunction of the intestinal barrier may be the primary defect in genetically susceptible individuals, and results in the translocation of commensal bacteria and continuous stimulation of the intestinal immune system. Increased intestinal permeability along with underexpression of the tight junction proteins ZO-1 and occludin have been observed in asymptomatic individuals with increased risk for celiac disease. This suggests that the onset of the disease may be preceded by an altered intestinal barrier, which leads to the translocation of gluten proteins and a T-cell-mediated chronic immune response.[25]

EVIDENCE OF PERINATAL PROGRAMMING OF INTESTINAL INFLAMMATORY DISORDERS

Influence of the perinatal environment on the intestinal microbiota

Increasing evidence suggests that the bacterial colonization of the gastrointestinal tract may be initiated *in utero*. The concept that the foetoplacental unit is sterile during normal term pregnancy has been challenged by the demonstration of commensal bacteria in the healthy human placenta,[26–28] amniotic fluid,[26] and meconium.[26,29,30] Similarities in microbiota composition have been demonstrated between meconium, placenta and amniotic fluid. In the study of Collado *et al.*, 41 of the 75 bacterial family level phylotypes detected in meconium samples from neonates born by elective caesarean section at full term were also detected in

amniotic fluid and placenta samples.[26] This result suggests that placenta and amniotic fluid microbiota may contribute to the prenatally bacterial colonization of the gastrointestinal tract. Moreover, the maternal microbiota during pregnancy might drive the development of the neonatal immune system. Colonization of germ-free pregnant mice shapes the early intestinal innate immune development in pups with a postnatal increase in innate lymphoid and mononuclear cells in the small intestine and expression of genes involved in epithelial defense (epithelial cell division and differentiation, mucins expression, polymeric immunoglobulin receptor and mononuclear recruitment).[31] In human, placenta and amniotic microbiota are associated with changes in innate immune gene expression — in particular TLR-related genes — in the fetal intestine.[32] After birth the gastrointestinal tract is colonized with species from the maternal microbiota (fecal, vaginal, and skin microbiota) and the birth environment. Facultative anaerobic bacteria, such as *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, and *Enterobacter* spp., are the first species that colonize newborns. These bacteria generate an anaerobic environment favorable to the growth of obligate anaerobes. *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium,* and *Eubacterium* spp. become predominant after one week of life.[19,33] Thereafter, microbiota diversity increases rapidly during infancy shaped by the infant's environment and the introduction of solid foods. The composition and diversity of the microbiota stabilize by three years of age, when the microbiota at that age becomes similar to that of an adult.[19]

Monozygotic twins share only 50% of the species in their gut microbiota, which confirms the importance of environmental factors in determining the bacterial composition of the gastrointestinal tract.[34] Perinatal environmental factors, including gestational age, mode of delivery, early life nutrition, and antibiotic use, play critical roles in the composition of the colonizing microbiota. Infants born vaginally exhibit a microbiota composition closer to that of the vaginal and intestinal microbiota of their mother, whereas infants delivered by caesarean section exhibit a microbiota composition that is more similar to that of maternal skin and the hospital environment.[35] This is shown by the reduced diversity of the microbiota, lower abundance of *Bacteroides*, and higher proportion of *Enterobacter*, *Clostridium*, *Haemophilus*,

Staphylococcus, and *Streptococcus* spp. observed in infants born by caesarean section compared with those born vaginally.[19,35–39] The differences in microbiota composition between modes of delivery are still observed months after birth. Bäckhed *et al*. showed that, while the difference between infants born by caesarean section and those born vaginally decreased during the first year of life, infants born by caesarean section exhibited more heterogeneous intestinal microbiota at 12 months of life.[35] Confounding factors — in particular breastfeeding, peripartum antibiotic exposure and prolonged hospitalization — may explained at least in part, the differences in the composition of the colonizing microbiota between modes of delivery. Mothers who undergo caesarean section are more likely to receive intrapartum antibiotic prophylaxis. In the studies evaluating difference in microbiota according to modes of delivery, antibiotic prophylaxis was systematic during caesarean section, while intrapartum antibiotic was reported in 13 to 21% of vaginal deliveries.[38,40] A reduced microbiota richness and depletion of Bacteroidetes at three months of age were reported after intrapartum antibiotic administration, regardless the mode of delivery. However, the antibiotic effect was more pronounced in the caesarean delivery group; the relative abundance of Bacteroidetes was 46% among infants unexposed to intrapartum antibiotic, compared with 24% following intrapartum antibiotic during vaginal delivery, and <1% following intrapartum antibiotic with caesarean delivery.[40] In the study of Stokholm *et al.*, the association between caesarean delivery and *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* one week after birth was still significant after stratification for intrapartum antibiotic. However, an increased proportion of *Klebsiella oxytoca* was found in both cesarean and vaginal delivery with intrapartum antibiotics, suggesting that antibiotics may explained in part the observed differences between modes of delivery.[38] The early life nutrition is a major contributor to the composition of the colonizing microbiota (see below), and thus can be a confounding factor in the differences observed between modes of delivery. Only one recent study has investigated the influence of mode of delivery and breastfeeding on microbiota composition following adjustment for the other. The authors reported a strong independent association between mode of delivery and composition of the intestinal microbiota at six

weeks of age.[39] Differences in the colonizing microbiota have been also observed between elective vs. emergency caesarean delivery.[38,40] These differences may be explained by the absence of rupture of the membranes — i.e. absence of colonization with the vaginal microbiota of the mother — in elective caesarean delivery. Moreover, a higher proportion of maternal post-partum and newborn antibiotics for suspected sepsis have been reported in emergency caesarean delivery,[40] as well as prolonged hospitalization[38] which is known to affect microbiota composition.[37]

Compared with formula-fed infants, breastfed infants acquire a more diverse microbiota that is dominated by lactobacilli and bifidobacteria, which are known to stimulate the developing immune system and improve intestinal barrier function.[19,20,35–37] This difference between types of feeding can be explained by the presence in human milk of immune-modulatory factors such as non-digestible oligosaccharides, SIgA, antimicrobial peptides, cytokines, and immune cells. Human milk oligosaccharides are non-digestible carbohydrates that act as prebiotics by promoting the development of a bifido-dominant microbiota. The fermentation of human milk oligosaccharides in the colon stimulates the growth of bifidobacteria and results in the production of specific SCFA. The SCFA profile of breastfed infants is characterized by high proportions of acetate and lactate and lower proportion of propionate compared to formula-fed infants.[33] Additionally, human milk contains viable bacteria, including *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, and *Staphylococcus* spp., and bacterial DNA sequences, such as bifidobacterial DNA, which may program the neonatal immune system to recognize colonizing microbes.[41] Studies in lactating mice suggest that bacteria from the maternal gut can reach the mammary gland via mesenteric lymph nodes.[41] The introduction of solid weaning foods correlates with enrichment in bacterial species of the intestinal microbiota. Non-digestible carbohydrates from solid foods, such as fruits, vegetables and cereals, introduce new substrates for colonic fermentation and induce profound changes in intestinal microbiota composition.[33] Amarri *et al*. showed stable counts of fecal bifidobacteria but increases in enterobacteria and enterococci five months after the introduction of complementary feeding to four-month-old breastfed infants.[42] Dietary

intervention, such as the administration of prebiotics or live microorganisms (probiotics), can modulate the composition of the intestinal microbiota in infants. Supplementation with prebiotics oligosaccharides can bring the microbiota of formula-fed infants closer to that of breastfed infants. Specific mixtures of galacto-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides have been shown to stimulate the growth of bifidobacteria in formula-fed infants, and induce SCFA profile closer to that observed in breastfed infants.[43] Morel *et al.* showed that pre-weaning supplementation with galacto-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides in suckling rats was associated with long-term changes in adult microbiota composition, suggesting that these prebiotics may have a programming effect on adult intestinal microbiota.[44] Further studies are however required to determine if the long-term effects of neonatal prebiotics supplementation on adult intestinal microbiota are associated with health benefits. Clinical studies with infant or follow-on formulas supplemented with probiotics (alone or in combination) suggest that probiotics may be associated with health benefits, such as a reduction in the number and duration of diarrhea episodes[45] and a lower frequency of colic or irritability.[46] However, the clinical effects of probiotics are highly dependent on the probiotic strain, the duration and the dose used, and the methodological quality of the studies.[47] Moreover, there is insufficient data on the adverse effects and long-term safety of probiotics. Therefore, the committee on nutrition of the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition does not recommend the administration of probiotic-supplemented formula.[47] Further well-conducted randomized controlled trials are required to determine the health benefits of probiotics and define the optimal dose and intake duration.

Preterm birth is associated with a reduced microbial diversity and a higher proportion of *Clostridium difficile*, probably because of delayed enteral feeding, use of sterile formula, the neonatal intensive care unit ecology, and frequent antibiotic administration.[36,37] However, the high carriage rate of *Clostridium difficile* in preterm neonates is not associated with a higher incidence of diarrhea or necrotizing enterocolitis because of the absence of surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin in the immature intestine.[48,49]

Antibiotic use in early life seems to be intimately linked to reduced microbiota diversity and delayed bifidobacteria colonization, depending on the antibiotic spectrum, dosage, and length of the antibiotic course.[37,50] In a cohort of 1032 infants, antibiotic exposure (mainly amoxicillin) during the first month after birth was associated with decreased numbers of bifidobacteria and *Bacteroides*.[37] Even if the dysbiosis induced by antibiotic use appears to be transient, this modification occurring during the key period of maturation of the intestinal barrier and immune system may have long-term effects on intestinal immune homeostasis. The impact of antibiotic exposure in early life on susceptibility to immune disorders such as asthma and other allergic diseases supports the hypothesis that the dysbiosis induced by antibiotic use may have long-term impact on the developing immune system.[51,52]

Clinical evidence of the developmental origin of intestinal inflammatory disorders

The incomplete penetrance, with a concordance rate among monozygotic twins of 75% in celiac disease[53] and 10–30% in IBD[54], strongly suggests the role of environmental risk factors in the pathogenesis of these diseases. The associations between chronic intestinal inflammatory diseases and perinatal environmental factors have been assessed by epidemiological studies (Tables 1 and 2)[55–73]; the two most frequently studied factors are breastfeeding and mode of birth delivery.

In a retrospective observational study in 2002, Ivarsson *et al.* suggested that breastfeeding at the time of gluten introduction is protective against celiac disease.[69] The protective effect of breastfeeding at the time of gluten introduction on the risk of celiac disease was explored in a meta-analysis of observational studies four years later.[70] However, a recent meta-analysis of 21 studies from 1983 to 2014 did not confirm any significant association between breastfeeding and risk for celiac disease.[71] This discrepancy probably reflects that the later meta-analysis included two recent randomized controlled trials that reported that neither the duration of breastfeeding nor continuation of breastfeeding at the time of gluten introduction influenced the development of celiac disease in children with an increased risk of developing celiac disease (the HLA DQ2/DQ8 genotype and/or having a

first-degree relative with celiac disease and/or type 1 diabetes).[10,74] As far as IBD is concerned, two meta-analyses concluded that there is a protective effect of breastfeeding.[55,56] Decker *et al.*, and later Jakobsen *et al.*, observed that breastfeeding is protective against ulcerative colitis.[57,60] However, two other studies from the UK and USA did not find any significant association between breastfeeding and risk for IBD.[58,59] There was considerable heterogeneity between these studies, because of the different definitions of breastfeeding (exclusive or non-exclusive and duration), which may explain these conflicting results. However, a randomized controlled trial of breastfeeding is not ethically acceptable because of the known health benefits of human milk. Well-designed studies of prospective cohorts would help to further assess the association between breastfeeding and the risk of intestinal inflammatory disorders later in life.

Caesarean section has been shown to be associated with an increased risk for celiac disease.[57] The results of a Swedish cohort study showed a positive association between caesarean section and being affected by celiac disease and type 1 diabetes. However, potential confounders, such as pregnancy outcomes, having a first-degree relative with celiac disease and/or type 1 diabetes, and gluten consumption, were not considered in the analysis.[72] An association between caesarean section and celiac disease was also observed by Mårild *et al*., who reported a higher risk for celiac disease in children born by elective (*i.e.* no exposure to the birth canal) but not by emergency caesarean delivery. This suggests that the intestinal microbiota in the perinatal period may play a role in the pathogenesis of celiac disease.[73] Among the studies that investigated the association between caesarean delivery and IBD,[57,58,63–65] only Bager *et al*. reported that caesarean delivery was a risk factor for IBD.[65]

Antibiotic exposure in early life is associated with an increased risk for both pediatric and adult IBD.[66–68,75] In a case–control study, subjects who received one or more antibiotic courses in their first year of life were 2.9 times more likely to be diagnosed with IBD compared with those who received no antibiotics.[67] The association between exposure to antibiotics and risk for developing IBD has been explored further in a recent meta-analysis of

11 observational studies. Antibiotic exposure increased the risk of new-onset Crohn's disease (OR 1.74, 95% CI: 1.35–2.23) but not ulcerative colitis (OR 1.08, 95% CI: 0.91–1.27). Children exposed to antibiotics had a higher risk for developing Crohn's disease compared with adults (OR 2.75, 95% CI: 1.72–4.38 vs. OR 1.57, 95% CI: 1.18–2.08).[75] Among other perinatal factors, a small weight for gestational age is associated with an increased risk for celiac disease.[72,73] No significant association has been demonstrated for IBD.[59,62,63]

To summarize, feeding pattern, mode of delivery, and exposure to antibiotics in early life probably affect microbiota colonization which is linked to the development of immune tolerance, and thus may influence susceptibility to intestinal inflammatory disorders later in life. Clinical studies suffer from potential recall bias because of the common questionnaire approach and long recall interval, different diagnostic criteria, and possible confounding factors. Further well-designed prospective epidemiological studies are needed to confirm the role of perinatal programming in the development of chronic intestinal inflammatory diseases.

Evidence from the bench

Experimental models in animals have attempted to demonstrate the effects of the perinatal nutritional environment on the development of the gastrointestinal tract (Table 3)[76–99]. The results of these studies vary considerably probably because of the diverse nutritional interventions and intervention windows. The models included postnatal undernutrition induced by either increasing litter size[88] or daily maternal separation[89] in rodents; intrauterine growth restriction induced by uteroplacental insufficiency in sheep[76,79] or rats,[84] gestational protein restriction in rats[78,86] or pigs,[81] or spontaneous intrauterine growth restriction in pigs[77,80,82,83,87] or rabbits[85]; pre- and postnatal undernutrition induced by maternal and postweaning caloric restriction in rats[90]; postnatal overnutrition induced by either reducing the litter size[91,93] or maternal and postweaning high-fat diet in rats[92]; a maternal diet enriched in long-chain polyunsaturated fatty acids during gestation and lactation using different n-3/n-6 fatty acid doses and ratios in pigs[94] or rats[95–97]; and postnatal high-protein diet in pigs.[98,99]

Although diverse, all of these studies have shown consistently that an adverse perinatal nutritional environment alters intestinal morphological development, barrier development, and microbiota composition. For example, intrauterine growth restriction is associated with a thinner intestinal mucosa,[79,83] reduced number of goblet cells and mucin expression,[78] decrease in SIgA level and number of intraepithelial lymphocytes,[83] and lower total bacterial count and proportion of bifidobacteria.[86]

Only a few studies have reported the long-term consequences of the perinatal environment on the gastrointestinal tract in adulthood. Maternal intake of long-chain polyunsaturated fatty acids during gestation and lactation modulated the severity of experimental colitis in young adults rats.[96,97] Early life stress induced by maternal deprivation increased colitis susceptibility in adult wild-type rats[100] and exacerbated colitis in IL-10$^{-/-}$ mice.[101] However, further studies are required to understand better the influence of the perinatal environment on the susceptibility to intestinal inflammatory disorders and to identify the mechanisms involved.

EPIGENETICS: A POSSIBLE LINK BETWEEN EARLY LIFE AND INTESTINAL INFLAMMATORY DISORDERS

Epigenetics is defined as heritable changes in gene expression that are not due to changes in the DNA sequence. Epigenetic gene regulation is mediated through DNA methylation, histone modification, and noncoding RNA. These marks can vary between cells and depend on the age and the environment.[102,103] Epigenetic changes have been reported during the murine and human intestinal development.[104,105] In human, differences in methylation have been reported between fetal and pediatric intestinal epithelium within CpG islands in promoter regions. These epigenetic changes are related to genes involved in intestinal immune defense, including the gelling mucin MUC2, trefoil factor 3 (TFF3), pattern recognition receptors (TLR3 and TLR4), and genes involved in antigen presentation, such as HLA class II genes.[105] Epigenetic mechanisms are influenced by genetic, stochastic, and environmental factors. Studies of twins and non-twin siblings in neonates estimate the

genetic component of DNA methylation as a minor factor (5–12% and ~25%, respectively), whereas the major component related to variation is linked to the environment.[106–108] The metabolic pathways involved in DNA methylation and histone modifications are dependent on the supply of substrates, including methyl donors such as folate, methionine, and choline. The latter two are the major sources of methyl groups in human foods.[109] In mice, maternal supplementation with methyl donors during gestation and lactation induced long-term changes in DNA methylation in the colonic mucosa of the offspring.[110] Thus, it is conceivable that the early life nutritional environment can affect the epigenetic mechanisms involved in intestinal maturation. The intestinal microbiota produces a wide range of metabolites that may have epigenetic functions either as a regulator or as a substrate[111] and thus may induce epigenetic modifications in the intestinal mucosa. Among the bacterial metabolites, SCFA produced by bacterial fermentation and folate influence histone acetylation and DNA methylation, respectively.[112]

Several clinical studies have shown that epigenetics may be involved in the pathogenesis of chronic intestinal inflammatory diseases. DNA methylation changes in genes regulating the NF-κB pathway, associated with dysregulation of the inflammatory response, have been reported in the intestinal mucosa of celiac disease patients. Four NF-κB-related genes are differentially methylated between active celiac disease and control samples. MALT1, MAP3K7 and TRADD show higher promoter methylation levels than controls, while a lower methylation level is observed for RELA. Changes in DNA methylation in celiac disease seem to be partially reversible, since the differences in methylation levels decrease after two years on gluten-free diet.[113] Changes in DNA methylation have been identified in the colonic mucosa and peripheral blood samples of IBD patients, specifically in genes involved in immune system activation and regulation pathways.[105,114–116] McDermott *et al*. reported 3196 differentially methylated CpG sites between Crohn's disease peripheral blood samples and controls, and 1481 between ulcerative colitis cases and controls. Forty-five percent of these differentially methylated CpG sites were present in both Crohn's disease and ulcerative colitis. Changes in DNA methylation were related to genes involved in immune

response, regulation of T-cell activation and cellular response to bacterial molecules. The top-ranked differentially methylated CpG site in both Crohn's disease and ulcerative colitis was located in the 5'-UTR of the protein-coding gene TIFAB (TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain). This protein inhibits the TIFA-mediated activation of TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) which transduces signals leading to the activation of NF-κB.[116] Interestingly, an overlap between differentially methylated regions during intestinal development and those observed in pediatric IBD patients has been reported. Up to 40% of differentially methylated regions observed in the intestinal epithelium of children newly diagnosed with IBD were also found to undergo significant DNA methylation during the first trimester of pregnancy and childhood.[105]

To summarize, the perinatal environment *per se* and dysbiosis induced by inappropriate modifications of the perinatal environment may lead to epigenetic changes in the developing gastrointestinal tract. By affecting genes involved in the maintenance of the intestinal barrier and immune homeostasis, epigenetic mechanisms may play a role in the development of intestinal inflammatory disorders later in life, especially in genetically susceptible individuals (Fig. 2).

CONCLUSION

An increasing body of evidence shows that the perinatal environment may program the developing gastrointestinal tract, possibly through epigenetic mechanisms in combination with changes in the microbiota. This may influence susceptibility to intestinal inflammatory diseases later in life. Understanding of the role of the early environment is critical to comprehend the pathogenesis of intestinal inflammatory disorders. Further studies are needed urgently to identify more comprehensively the environmental risk factors and the critical windows of development during which these environmental factors can be deleterious. Studies are also required to gain more insight into the underlying epigenetic mechanisms and whether these mechanisms are reversible. Identification of the epigenetic marks could lead to the development of biomarkers to identify those at increased risk of

intestinal inflammatory disease. A myriad of chemical modifications decorate both DNA and histones, and new histone modifications are still being discovered.[117] One of the biggest challenges is to identify which epigenetic marks alter gene expression related to inflammatory diseases.[118] Such knowledge may increase the understanding of the pathogenesis and, importantly, may lead to the development of preventive strategies to forestall or prevent intestinal inflammatory disease caused by deleterious environmental exposure.

Acknowledgements

The authors wish to thank the DigestScience Foundation for its technical support.

Declaration of Interest

All the authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

1. Hanson MA, Gluckman PD. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? Physiol Rev. 2014;94:1027-1076.

2. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. Lancet. 1989;2:577-580.

3. Barker DJ. P. The origins of the developmental origins theory. J Intern Med. 2007;261:412-417.

4. Vickers MH. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. Nutrients. 2014;6:2165-2178.

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

6. Colony PC. Successive phases of human fetal intestinal development. In: Nutritional adaptation of the gastrointestinal tract of the newborn. New York: N. Kretchmer and A. Minkowski, Nestlé Vevey/Raven Press; 1983.

7. Anderson RC, Dalziel JE, Gopal PK, Bassett S, Ellis A, Roy NC. The role of intestinal barrier function in early life in the development of colitis. In: Colitis. Dr Fukata M, InTech; 2012.

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

9. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2011;140:1785-1794.

10. Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, et al. Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. N Engl J Med. 2014;371:1304-1315.

11. Vukavić T. Timing of the gut closure. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1984;3:700-703.

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

13. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine.

Cell. 2010;140:859-870.

14. Littman DR, Pamer EG. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. Cell Host Microbe. 2011;10:311-323.

15. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science. 2001;291:881-884.

16. Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. Dev Immunol. 1998;6:13-18.

17. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. Cell. 2005;122:107-118.

18. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. Nat Rev Immunol. 2010;10:131-144.

19. Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. Pediatr Allergy Immunol. 2014;25:428-438.

20. Houghteling PD, Walker WA. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2015;60:294-307.

21. Desseyn J-L, Gouyer V, Gottrand F. Biological modeling of mucus to modulate mucus barriers. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2016;310:G225-227.

22. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. Gut. 2016; 65:330-339.

23. West CE, Renz H, Jenmalm MC, et al. The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: associations and potentials for gut microbiota therapies. J Allergy Clin Immunol. 2015;135:3-13.

24. Wyatt J, Vogelsang H, Hübl W, Waldhöer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. Lancet. 1993;341:1437-1439.

25. Mishra A, Prakash S, Sreenivas V, et al. Structural and functional changes in the tight junctions of asymptomatic and serology-negative first-degree relatives of patients with celiac

disease. J Clin Gastroenterol. 2016;50:551-560.

26. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. Sci Rep. 2016;6:23129.

27. Stout MJ, Conlon B, Landeau M, et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. Am J Obstet Gynecol. 2013;208:226.e1-7.

28. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. Sci Transl Med. 2014;6:237ra65.

29. Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. Clin Exp Allergy. 2013;43:198-211.

30. Jiménez E, Marín ML, Martín R, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? Res Microbiol. 2008;159:187-193.

31. Gomez de Agüero M, Ganal-Vonarburg SC, Fuhrer T, et al. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. Science. 2016;351:1296-1302.

32. Rautava S, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Neonatology. 2012;102:178-184.

33. Scholtens PAMJ, Oozeer R, Martin R, Amor KB, Knol J. The early settlers: intestinal microbiology in early life. Annu Rev Food Sci Technol. 2012;3:425-447.

34. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, et al. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:7503-7508.

35. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. Cell Host Microbe. 2015;17:690-703.

36. Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. Nutr Rev. 2015;73:32-40.

37. Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics. 2006;118:511-521.

38. Stokholm J, Thorsen J, Chawes BL, et al. Cesarean section changes neonatal gut colonization. J Allergy Clin Immunol. 2016;138:881-889.

39. Madan JC, Hoen AG, Lundgren SN, et al. Association of Cesarean Delivery and Formula Supplementation With the Intestinal Microbiome of 6-Week-Old Infants. JAMA Pediatr. 2016;170:212-219.

40. Azad MB, Konya T, Persaud RR, et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. BJOG. 2016;123:983-993.

41. Perez PF, Doré J, Leclerc M, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? Pediatrics. 2007;119:e724-732.

42. Amarri S, Benatti F, Callegari ML, et al. Changes of gut microbiota and immune markers during the complementary feeding period in healthy breast-fed infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2006;42:488-495.

43. Knol J, Scholtens P, Kafka C, et al. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2005;40:36-42.

44. Morel FB, Oozeer R, Piloquet H, et al. Preweaning modulation of intestinal microbiota by oligosaccharides or amoxicillin can contribute to programming of adult microbiota in rats. Nutrition. 2015;31:515-522.

45. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. Pediatrics. 2005;115:5-9.

46. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. Am J Clin Nutr. 2004;79: 261-267.

47. Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee

on nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011;52:238-250.

48. Jangi S, Lamont JT. Asymptomatic colonization by Clostridium difficile in infants: implications for disease in later life. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010;51:2-7.

49. El-Mohandes AE, Keiser JF, Refat M, Jackson BJ. Prevalence and toxigenicity of Clostridium difficile isolates in fecal microflora of preterm infants in the intensive care nursery. Biol Neonate. 1993;63:225-229.

50. Tanaka S, Kobayashi T, Songjinda P, et al. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009;56:80-87.

51. Droste JH, Wieringa MH, Weyler JJ, Nelen VJ, Vermeire PA, Van Bever HP. Does the use of antibiotics in early childhood increase the risk of asthma and allergic disease? Clin Exp Allergy. 2000;30:1547-1553.

52. Kozyrskyj AL, Ernst P, Becker AB. Increased risk of childhood asthma from antibiotic use in early life. Chest. 2007;131:1753-1759.

53. Nisticò L, Fagnani C, Coto I, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. Gut. 2006;55:803-808.

54. Aujnarain A, Mack DR, Benchimol EI. The role of the environment in the development of pediatric inflammatory bowel disease. Curr Gastroenterol Rep. 2013;15:326.

55. Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. Am J Clin Nutr. 2004;80:1342-1352.

56. Barclay AR, Russell RK, Wilson ML, Gilmour WH, Satsangi J, Wilson DC. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. J Pediatr. 2009;155:421-426.

57. Decker E, Engelmann G, Findeisen A, et al. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. Pediatrics. 2010;125:1433-1440.

58. Roberts SE, Wotton CJ, Williams JG, Griffith M, Goldacre MJ. Perinatal and early life

risk factors for inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2011;17:743-749.

59. Khalili H, Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT. Early life factors and risk of inflammatory bowel disease in adulthood. Inflamm Bowel Dis. 2013;19:542-547.

60. Jakobsen C, Paerregaard A, Munkholm P, Wewer V. Environmental factors and risk of developing paediatric inflammatory bowel disease - a population based study 2007-2009. J Crohns Colitis. 2013;7:79-88.

61. Baron S, Turck D, Leplat C. Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. Gut. 2005;54:357-363.

62. Aspberg S, Dahlquist G, Kahan T, Källén B. Fetal and perinatal risk factors for inflammatory bowel disease. Acta Paediatr. 2006;95:1001-1004.

63. Hutfless S, Li D-K, Heyman MB, Bayless TM, Abramson O, Herrinton LJ. Prenatal and perinatal characteristics associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 2012;57:2149-2156.

64. Sonntag B, Stolze B, Heinecke A, et al. Preterm birth but not mode of delivery is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease later in life. Inflamm Bowel Dis. 2007;13:1385-1390.

65. Bager P, Simonsen J, Nielsen NM, Frisch M. Cesarean section and offspring's risk of inflammatory bowel disease: a national cohort study. Inflamm Bowel Dis. 2012;18:857-862.

66. Hildebrand H, Malmborg P, Askling J, Ekbom A, Montgomery SM. M. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. Scand J Gastroenterol. 2008;43:961-966.

67. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2010;105:2687-2692.

68. Hviid A, Svanström H, Frisch M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. Gut. 2011;60:49-54.

69. Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA. Breast-feeding protects against celiac

disease. Am J Clin Nutr. 2002;75:914-921.

70. Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. Arch Dis Child. 2006;91:39-43.

71. Szajewska H, Shamir R, Chmielewska A, et al. Systematic review with meta-analysis: early infant feeding and coeliac disease-update 2015. Aliment Pharmacol Ther. 2015;41:1038-1054.

72. Adlercreutz EH, Wingren CJ, Vincente RP, Merlo J, Agardh D. Perinatal risk factors increase the risk of being affected by both type 1 diabetes and coeliac disease. Acta Paediatr. 2015;104:178-184.

73. Mårild K, Stephansson O, Montgomery S, Murray JA, Ludvigsson JF. Pregnancy outcome and risk of celiac disease in offspring: a nationwide case-control study. Gastroenterology. 2012;142:39-45.

74. Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, et al. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. N Engl J Med. 2014;371:1295-1303.

75. Ungaro R, Bernstein CN, Gearry R, et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2014;109:1728-1738.

76. Avila CG, Harding R, Rees S, Robinson PM. Small intestinal development in growth-retarded fetal sheep. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1989;8:507-515.

77. Xu RJ, Mellor DJ, Birtles MJ, Reynolds GW, Simpson HV. Impact of intrauterine growth retardation on the gastrointestinal tract and the pancreas in newborn pigs. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1994;18:231-240.

78. Fança-Berthon P, Michel C, Pagniez A, et al. Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. Pediatr Res. 2009;66:47-52.

79. Bloomfield FH, Bauer MK, van Zijl PL, Gluckman PD, Harding JE. Amniotic IGF-I supplements improve gut growth but reduce circulating IGF-I in growth-restricted fetal sheep. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;282:259-269.

80. D'Inca R, Kloareg M, Gras-Le Guen C, Le Huërou-Luron I. Intrauterine growth restriction modifies the developmental pattern of intestinal structure, transcriptomic profile, and bacterial colonization in neonatal pigs. J Nutr. 2010;140:925-931.

81. Mickiewicz M, Zabielski R, Grenier B, et al. Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy. J Physiol Pharmacol. 2012;63:225-239.

82. Dong L, Zhong X, Ahmad H, et al. Intrauterine growth restriction impairs small intestinal mucosal immunity in neonatal piglets. J Histochem Cytochem. 2014;62:510-518.

83. Dong L, Zhong X, He J, et al. Supplementation of tributyrin improves the growth and intestinal digestive and barrier functions in intrauterine growth-restricted piglets. Clin Nutr. 2016;35:399-407.

84. Baserga M, Bertolotto C, Maclennan NK, et al. Uteroplacental insufficiency decreases small intestine growth and alters apoptotic homeostasis in term intrauterine growth retarded rats. Early Hum Dev. 2004;79:93-105.

85. Buchmiller-Crair TL, Gregg JP, Rivera FA, Choi RS, Diamond JM, Fonkalsrud EW. Delayed disaccharidase development in a rabbit model of intrauterine growth retardation. Pediatr Res. 2001;50:520-524.

86. Fança-Berthon P, Hoebler C, Mouzet E, David A, Michel C. Intrauterine growth restriction not only modifies the cecocolonic microbiota in neonatal rats but also affects its activity in young adult rats. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010;51:402-413.

87. Michiels J, De Vos M, Missotten J, Ovyn A, De Smet S, Van Ginneken C. Maturation of digestive function is retarded and plasma antioxidant capacity lowered in fully weaned low birth weight piglets. Br J Nutr. 2013;109:65-75.

88. Hatch TF, Lebenthal E, Branski D, Krasner J. The effect of early postnatal acquired malnutrition on intestinal growth, disaccharidases and enterokinase. J Nutr. 1979;109:1874-1879.

89. Preidis GA, Ajami NJ, Wong MC, Bessard BC, Conner ME, Petrosino JF. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. J

Nutr Biochem. 2015;26:1050-1057.

90. Firmansyah A, Suwandito L, Penn D, Lebenthal E. Biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats after prenatal and postnatal malnutrition. Am J Clin Nutr. 1989;50:261-268.

91. Mozes S, Šefčíková Z, Lenhardt L. Functional changes of the small intestine in over- and undernourished suckling rats support the development of obesity risk on a high-energy diet in later life. Physiol Res. 2007;56:183-192.

92. Mozes S, Bujňáková D, Šefčíková Z, Kmet V. Developmental changes of gut microflora and enzyme activity in rat pups exposed to fat-rich diet. Obesity. 2008;16:2610-2615.

93. Šefčíková Z, Bujňáková D, Raček Ľ, Kmet V, Mozeš Š. Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests. Physiol Res. 2011;60:337-346.

94. Boudry G, Douard V, Mourot J, Lallès J-P, Le Huërou-Luron I. Linseed oil in the maternal diet during gestation and lactation modifies fatty acid composition, mucosal architecture, and mast cell regulation of the ileal barrier in piglets. J Nutr. 2009;139:1110-1117.

95. Jacobson K, Mundra H, Innis SM. Intestinal responsiveness to experimental colitis in young rats is altered by maternal diet. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005;289:13-20.

96. Innis SM, Dai C, Wu X, Buchan AMJ, Jacobson K. Perinatal lipid nutrition alters early intestinal development and programs the response to experimental colitis in young adult rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010;299:1376-1385.

97. Reddy KVK, Naidu KA. Maternal and neonatal dietary intake of balanced n-6/n-3 fatty acids modulates experimental colitis in young adult rats. Eur J Nutr. 2016;55:1875-1890.

98. Boudry G, Jamin A, Chatelais L, Gras-Le Guen C, Michel C, Le Huërou-Luron I. Dietary protein excess during neonatal life alters colonic microbiota and mucosal response to inflammatory mediators later in life in female pigs. J Nutr. 2013;143:1225-1232.

99. Chatelais L, Jamin A, Gras-Le Guen C, Lallès J-P, Le Huërou-Luron I, Boudry G. The level of protein in milk formula modifies ileal sensitivity to LPS later in life in a piglet model. PLoS One. 2011;6:e19594.

100. Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. Gut. 2004;53:501-506.

101. Lennon EM, Maharshak N, Elloumi H, Borst L, Plevy SE, Moeser AJ. Early life stress triggers persistent colonic barrier dysfunction and exacerbates colitis in adult IL-10-/- mice. Inflamm Bowel Dis. 2013;19:712-719.

102. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet. 2003;33:245-254.

103. Zilbauer M. Epigenetics - a novel concept with exciting prospects for paediatric research. Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2014;99:67-69.

104. Yu DH, Gadkari M, Zhou Q, et al. Postnatal epigenetic regulation of intestinal stem cells requires DNA methylation and is guided by the microbiome. Genome Biol. 2015;16:211.

105. Kraiczy J, Nayak K, Ross A, et al. Assessing DNA methylation in the developing human intestinal epithelium: potential link to inflammatory bowel disease. Mucosal Immunol. 2016;9:647-658.

106. Van Dongen J, Ehli EA, Slieker RC, et al. Epigenetic variation in monozygotic twins: a genome-wide analysis of DNA methylation in buccal cells. Genes. 2014;5:347-365.

107. Gordon L, Joo JE, Powell JE, et al. Neonatal DNA methylation profile in human twins is specified by a complex interplay between intrauterine environmental and genetic factors, subject to tissue-specific influence. Genome Res. 2012;22:1395-1406.

108. Soh S-E, Chong Y-S, Kwek K, et al. Insights from the growing up in Singapore towards healthy outcomes (GUSTO) cohort study. Ann Nutr Metab. 2014;64:218-225.

109. Chango A, Pogribny IP. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. Nutrients. 2015;7:2748-2770.

110. Schaible TD, Harris RA, Dowd SE, Smith CW, Kellermayer R. Maternal methyl-donor

supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. Hum Mol Genet. 2011;20:1687-1696.

111. Mischke M, Plosch T. The gut microbiota and their metabolites: potential implications for the host epigenome. In: Schwiertz A, ed. Microbiota of the Human Body. Springer; 2016.

112. Alenghat T, Artis D. Epigenomic regulation of host-microbiota interactions. Trends Immunol. 2014;35:518-525.

113. Fernandez-Jimenez N, Castellanos-Rubio A, Plaza-Izurieta L, et al. Coregulation and modulation of NFκB-related genes in celiac disease: uncovered aspects of gut mucosal inflammation. Hum Mol Genet. 2014;23:1298-1310.

114. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, et al. Promoter methylation of protease-activated receptor (PAR2) is associated with severe clinical phenotypes of ulcerative colitis (UC). Clin Exp Med. 2009;9:125-130.

115. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. Gastroenterology. 2013;145:293-308.

116. McDermott E, Ryan EJ, Tosetto M, et al. DNA methylation profiling in inflammatory bowel disease provides new insights into disease pathogenesis. J Crohns Colitis 2016;10:77-86.

117. Hamm CA, Costa FF. Epigenomes as therapeutic targets. Pharmacol Ther. 2015;151:72-86.

118. Ledford H. Epigenetics: The genome unwrapped. Nature. 2015;528:S12-13.

Table 1. Summary of the evidence linking perinatal risk factors with inflammatory bowel disease

Perinatal factor	Reference	Definition of perinatal factor	Method to assess perinatal factor information	Diagnosis	Effect size
Breastfeeding	Klement et al. (2004)[55]	Any exposure to breast milk	Meta-analysis including 17 studies	CD UC	OR 0.67 (0.52–0.86) OR 0.77 (0.61–0.96)
Breastfeeding	Barclay et al. (2009)[56]	Any exposure to breast milk	Meta-analysis including 8 studies	UC	OR 0.61 (0.44–0.8)
Breastfeeding	Decker et al. (2010)[57]	Breastfeeding (partial or exclusive)	Questionnaire	UC	OR 0.93 (0.89–0.98)
Breastfeeding	Roberts et al. (2011)[58]	Breastfeeding at the time of discharge from hospital	Maternity records	CD or UC	NS
Breastfeeding	Khalili et al. (2013)[59]	Breastfeeding duration	Questionnaire	CD or UC	NS
Breastfeeding	Jakobsen et al. (2013)[60]	Breastfeeding duration >3 months	Questionnaire	UC	OR 0.5 (0.2–1.0)
Disease during pregnancy	Baron et al. (2005)[61]	Risk of premature delivery Hormonal treatment Gestational hypertension Rubella vaccine Other	Questionnaire	UC	OR 8.9 (1.5–52)
Disease during pregnancy	Aspberg et al. (2006)[62]	Preeclampsia	Medical birth register	CD or UC	NS
Disease during pregnancy	Hutfless et al. (2012)[63]	Gestational hypertension Placental or amniotic abnormalities	Hospital medical records	CD or UC	NS
Prematurity	Sonntag et al. (2007)[64]	Gestational age ≤37 weeks	Questionnaire	CD	OR 1.52 (1.12–2.06)
Prematurity	Roberts et al. (2011)[58]	Gestational age ≤37 weeks	Maternity records	CD or UC	NS
Prematurity	Hutfless et al. (2012)[63]	Gestational age ≤36 weeks	Hospital medical records	CD or UC	NS

Table 1 *(continued)*

Perinatal factor	Reference	Definition of perinatal factor	Method to assess perinatal factor information	Diagnosis	Effect size
Prematurity	Khalili et al. (2013)[59]	Born ≥2 weeks before normal term	Questionnaire	CD or UC	NS
Intrauterine growth restriction	Aspberg et al. (2006)[62]	Birth weight <2500 g	Medical birth register	CD or UC	NS
Intrauterine growth restriction	Hutfless et al. (2012)[63]	Birth weight <2500 g	Hospital medical records	CD or UC	NS
Intrauterine growth restriction	Khalili et al. (2013)[59]	Birth weight <2260 g	Questionnaire	CD or UC	NS
Caesarean delivery	Sonntag et al. (2007)[64]	Caesarean delivery	Questionnaire	CD or UC	NS
Caesarean delivery	Decker et al. (2010)[57]	Caesarean delivery	Questionnaire	CD or UC	NS
Caesarean delivery	Roberts et al. (2011)[58]	Caesarean delivery	Maternity records	CD or UC	NS
Caesarean delivery	Hutfless et al. (2012)[63]	Caesarean delivery	Hospital medical records	CD or UC	NS
Caesarean delivery	Bager et al. (2012)[65]	Caesarean delivery	Medical birth registry	IBD	IRR 1.29 (1.11–1.49)
Early life exposure to antibiotics	Hildebrand et al. (2008)[66]	Infections treated with antibiotic during the first five years of life	Hospital medical records	CD	Pneumonia OR 2.74 (1.04–7.21)
Early life exposure to antibiotics	Shaw et al. (2010)[67]	≥1 antibiotic course in the first year of life	Antibiotic use population-based database	IBD	OR 2.90 (1.21–6.96)
Early life exposure to antibiotics	Hviid et al. (2011)[68]	≥1 antibiotic course during childhood	Nationwide drug prescription registry	CD	OR 3.41 (1.45–8.02)

CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis; IBD, inflammatory bowel disease; NS, non-significant effect; OR, odds ratio; IRR, incidence rate ratio.

Table 2. Summary of evidence of perinatal risk factors for celiac disease

Perinatal factor	Reference	Definition of perinatal factor	Method to assess perinatal factor information	Effect size
Breastfeeding	Ivarsson et al. (2002)[69]	Breastfeeding (partially or exclusively) at the time of gluten introduction	Questionnaire	OR 0.59 (0.42–0.83)
Breastfeeding	Akobeng et al. (2006)[70]	Breastfeeding (partially or exclusively) at the time of gluten introduction	Meta-analysis of 4 studies (questionnaire for all the studies)	OR 0.48 (0.40–0.59)
Breastfeeding	Szajewska et al. (2015)[71]	Exclusive or any breastfeeding or breastfeeding at the time of gluten introduction	Meta-analysis of 21 studies including 2 RCTs	NS
Prematurity	Adlercreutz et al. (2015)[72]	None	Birth register	NS
Small for gestational age	Mårild et al. (2012)[73]	Weight for sex and gestational age less than –2 standard deviations	Birth register	OR 1.21 (1.09–1.35)
Small for gestational age	Adlercreutz et al. (2015)[72]	Birth weight for gestational age less than –2 standard deviations	Birth register	OR 1.78 (1.52–2.08)
Caesarean delivery	Decker et al. (2010)[57]	Caesarean delivery	Questionnaire	OR 1.80 (1.13–2.88)
Caesarean delivery	Mårild et al. (2012)[73]	Elective caesarean delivery	Birth register	OR 1.15 (1.04–1.26)
Caesarean delivery	Adlercreutz et al. (2015)[72]	Caesarean delivery	Birth register	Celiac disease and type 1 diabetes OR 1.60 (1.07–2.39)

OR, odds ratio; NS, non-significant effect; RCT, randomized controlled trial.

Table 3. Summary of experimental evidence of the effects of perinatal nutrition on the intestinal development

Nutritional intervention	Consequences on the intestine	References
Intrauterine growth restriction	• Alterations in morphological development: ↓ wall thickness, ↓ mucosa thickness, ↓ villus height, ↓ crypt depth	Avila et al. (1989)[76] Xu et al. (1994)[77] Fança-Berthon et al. (2009)[78] Bloomfield et al. (2002)[79] D'Inca et al. (2010)[80] Mickiewicz et al. (2012)[81] Dong et al. (2014)[82] Dong et al. (2015)[83]
	• Altered expression of apoptosis-related proteins and caspase 3 activity	Baserga et al. (2004)[84] Mickiewicz et al. (2012)[81]
	• Alterations in barrier development: ↓ number of goblet cells, ↓ mucins and Tff3 expression, ↓ mesenteric lymph node weight, ↓ number of intraepithelial lymphocytes, altered cytokine expression, ↓ IgA and IgG levels	Fança-Berthon et al. (2009)[78] Dong et al. (2014)[82] Dong et al. (2015)[83]
	• Alterations in digestive and absorptive capacities: ↓ disaccharidase activity, ↓ lactase activity and late age-induced reduction in lactase activity, persistence of vacuolated enterocytes, ↓ number and height of microvilli	Buchmiller-Crair et al. (2001)[85] Fança-Berthon et al. (2010)[86] Bloomfield et al. (2002)[79] Mickiewicz et al. (2012)[81] Dong et al. (2014)[82] Dong et al. (2015)[83]
	• Changes in microbiota composition and metabolic activity	Fança-Berthon et al. (2010)[86] Michiels et al. (2013)[87]
Postnatal undernutrition	• Alterations in digestive and absorptive capacities: late age-induced reduction in lactase activity, ↓ sucrase and maltase activities, ↑ intestinal alkaline phosphatase and enterokinase activities	Hatch et al. (1979)[88]
	• Changes in microbiota composition and metabolic activity	Preidis et al. (2015)[89]

Table 3 *(continued)*

Nutritional intervention	Consequences on the intestine	References
Pre- and postnatal undernutrition	• Alterations in morphological development: ↓ mucosa thickness, ↓ villus height, ↓ crypt depth	Firmansyah et al. (1989)[90]
	• Alterations in digestive and absorptive capacities: ↓ lactase, sucrase, and maltase activities and contents	Firmansyah et al. (1989)[90]
Postnatal overnutrition	• Increased digestive capacity: ↑ intestinal alkaline phosphatase activity	Mozes et al. (2007)[91] Mozes et al. (2008)[92] Šefčíková et al. (2011)[93]
	• Changes in microbiota composition	Mozes et al. (2008)[92] Šefčíková et al. (2011)[93]
Pre- and postnatal LC-PUFA supplementation	• Alterations in morphological development: changes in mucosa fatty acid composition, ↓ villus height and crypt depth, ↓ cell proliferation	Boudry et al. (2009)[94] Jacobson et al. (2005)[95] Innis et al. (2010)[96] Reddy et al. (2015)[97]
	• Alterations in barrier development: abnormal regulation of intestinal permeability	Boudry et al. (2009)[94] Innis et al. (2010)[96]
	• Modulation of susceptibility to experimental colitis: exaggerated intestinal inflammatory response in unbalanced n-6/n-3 LC-PUFA diet	Jacobson et al. (2005)[95] Innis et al. (2010)[96] Reddy et al. (2015)[97]
Postnatal high-protein diet	• Alterations in barrier development: modification of early colonic immune cell recruitment, long-term ↑ intestinal permeability after oxidative stress	Boudry et al. (2013)[98] Chatelais et al. (2011)[99]
	• Changes in microbiota composition and metabolic activity	Boudry et al. (2013)[98] Chatelais et al. (2011)[99]

Tff3, trefoil factor 3; IgA, immunoglobulin A; IgG, immunoglobulin G; LC-PUFA: long-chain polyunsaturated fatty acid.

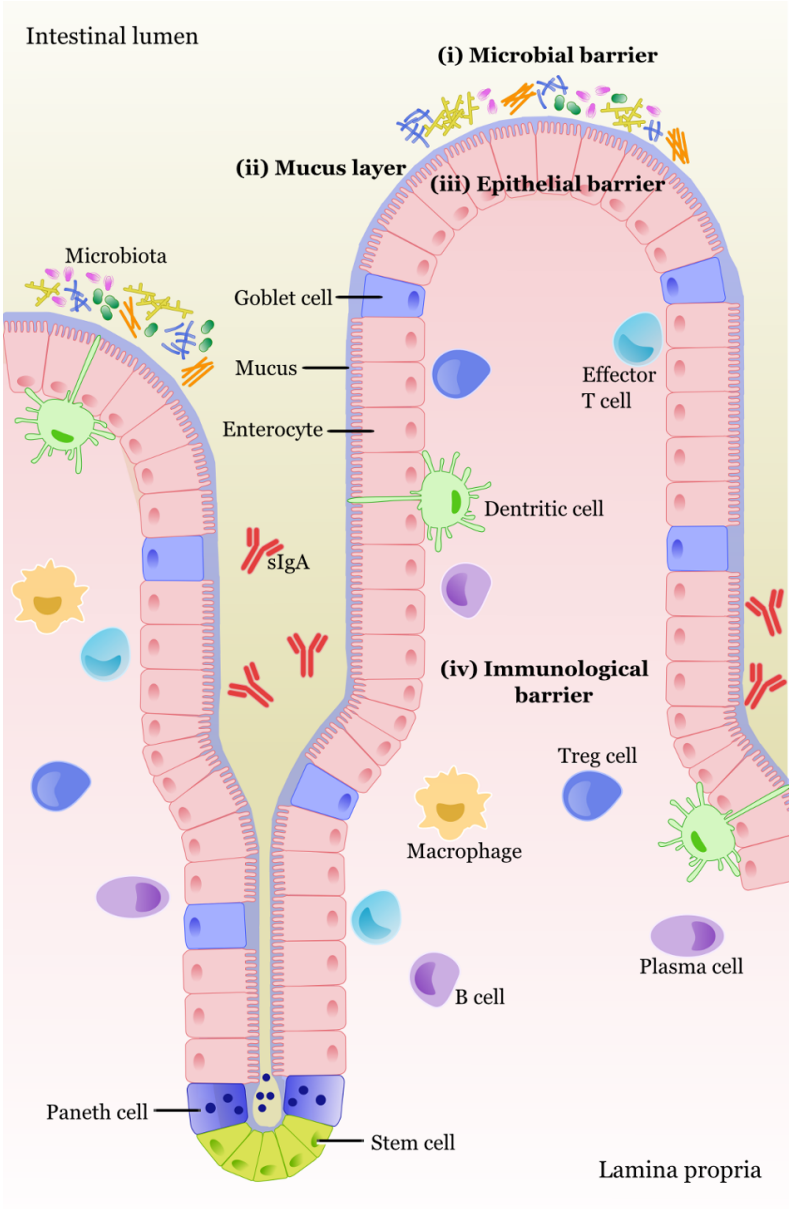


Fig. 1. The intestinal barrier.
SIgA, secretory immunoglobulin A; Treg cell, regulatory T cell.

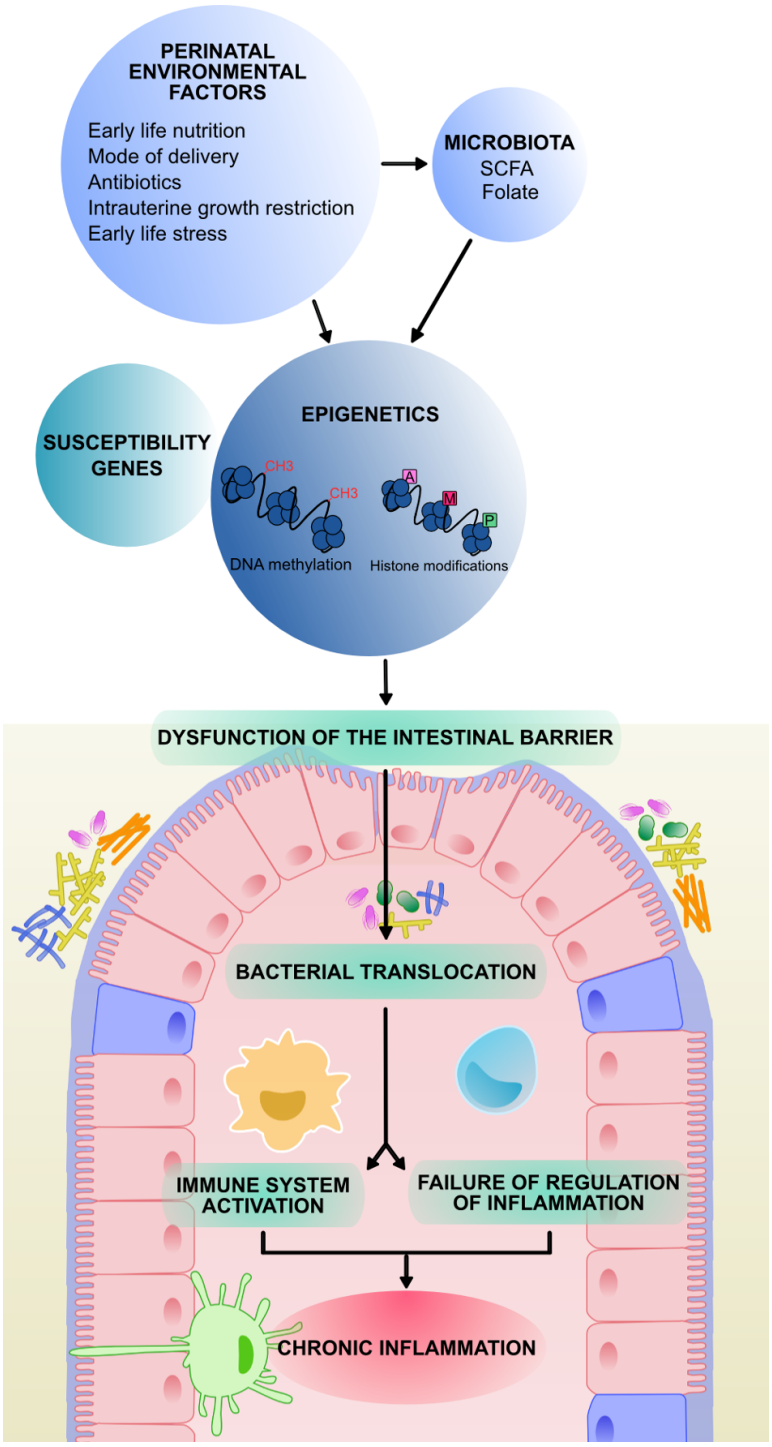


Fig. 2. Conceptual model of the perinatal programming of intestinal inflammatory disorders.
A, histone acetylation; M, histone methylation; P, histone phosphorylation; SCFA, short-chain fatty acids.