

N° d'ordre : 2139

THÈSE

présentée

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : S.E.V.A.B.

Spécialité : Sciences agronomiques

Par

Florence LAMINE

Lactobacillus farciminis une bactérie produisant
du monoxyde d'azote dans le tube digestif :
mise en évidence de potentialités thérapeutiques

Soutenue le 01 octobre 2004 devant le jury composé de :

Pr. P. MONSAN	Président du jury
Dr V. THEODOROU	Directeur de thèse
Dr A. BERNALIER-DONADILLE	Rapporteur
Pr. P. DUCROTTÉ	Rapporteur
Dr J. FIORAMONTI	Membre du jury
Pr. C. ROQUES	Membre du jury
Pr. F. NEPVEU	Membre invité du jury

*À la mémoire de mon père,
qui s'en est allé ...*

*Je dédie ce travail
À Khalid et à Samy*

Remerciements

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés à l'Unité de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Toulouse, sous la direction scientifique du Docteur Vassilia THÈODOROU.

Je tiens à remercier ici toutes les personnes qui ont évalué et jugé l'ensemble de ce travail de thèse, mais aussi celles qui l'ont dirigé, celles qui y ont participé et celles qui l'ont soutenu.

Monsieur Pierre MONSAN, Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Je lui adresse ici le témoignage de ma respectueuse considération et de ma profonde gratitude.

Monsieur Pierre DUCROTTÈ, Gastro-entérologue et Professeur de la faculté de Médecine de Rouen, qui a accepté de juger ce travail et de prendre place dans le jury en tant que rapporteur. Je lui adresse ma respectueuse et ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à l'égard de ce travail, et pour son avis et regard d'expert sur les réelles potentialités thérapeutiques que peuvent offrir les probiotiques en pathologie digestive humaine.

Madame Annick BERNALIER-DONADILLE, Chargée de Recherche à l'INRA de Theix, qui a accepté d'évaluer et de juger ce travail en qualité de rapporteur. Pour ses remarques constructives, ses commentaires avisés mais également pour m'avoir fait partager ses connaissances sur l'écosystème microbien intestinal, je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements et lui témoigner ma gratitude.

Madame Christine ROQUES, Professeur à l'unité des Sciences pharmaceutiques de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse, qui m'a fait l'honneur d'accepter de siéger parmi les membres du jury. Je tiens à lui exprimer tout mon respect et ma considération et lui adresser mes sincères remerciements à la fois pour l'attention qu'elle a portée à la lecture de ce mémoire, mais aussi pour tout ce qu'elle a fait en amont pour la réalisation de ce travail.

Madame Françoise NEPVEU, Professeur à l'unité des Sciences pharmaceutiques de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse, qui m'a fait l'honneur d'accepter de siéger parmi le jury en tant que membre invité. Je tiens également à lui exprimer tout mon respect et ma considération et lui adresser ma totale reconnaissance ainsi que mes plus vifs remerciements pour nous avoir fait partager ses connaissances remarquables entre autres sur les radicaux libres. Sans son aide précieuse ce travail n'aurait pas pu être entièrement validé. Grâce à elle et à son équipe technique, il n'y a plus de doute : *Lactobacillus farciminis* produit du monoxyde d'azote *in vivo*.

J'exprime mon profond respect à Madame Vassilia THÉODOROU, Enseignant-Chercheur à l'Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan de Toulouse, qui a dirigé avec patience, dévouement, enthousiasme et dynamisme ce travail. Sa grande compétence, ses conseils constructifs, pertinents et éclairés, ainsi que ses encouragements permanents ont été déterminants dans l'aboutissement de ce travail. Initiatrice de ce projet qui s'est concrétisé par un brevet, je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour la confiance qu'elle m'a accordée en me confiant ce sujet passionnant, et pour m'avoir fait partager cette expérience inégalable et apprécier les joies de la satisfaction scientifique. Qu'il me soit également permis de souligner les qualités humaines exemplaires d'une grande dame hors pair dont la présence, la disponibilité, le soutien et l'écoute n'ont jamais fait défaut, et auprès de qui j'ai beaucoup appris.

Que Monsieur Jean FIORAMONTI, Directeur de recherche à l'INRA de Toulouse et Directeur de l'Unité de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche. Pour sa disponibilité, son accompagnement, sa confiance et ses conseils témoignant d'une immense compétence, je tiens à lui exprimer tout mon respect et ma considération.

Je tiens également à remercier vivement Monsieur Lionel BUENO, Directeur de recherche à l'INRA de Toulouse, pour m'avoir fait partager son grand savoir notamment sur la "douleur viscérale". Pour ses regards et avis critiques et pour m'avoir permis parallèlement à ce travail de thèse de participer à une collaboration scientifique très formatrice et enrichissante, je lui exprime ici toute mon estime et ma profonde reconnaissance.

Monsieur Raphaël GARCIA-VILLAR, Directeur de recherche à l'INRA de Toulouse, je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et tous mes remerciements pour sa disponibilité, ses conseils et sa gentillesse.

Je ne saurais oublier Madame Hélène EUTAMENE, Enseignant-Chercheur à l'Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan de Toulouse, qui avec toute l'humilité et la modestie qui la caractérisent, fait partager avec enthousiasme et passion tout son savoir, sa compétence et sa rigueur scientifiques. Je lui exprime ici tout mon respect et ma profonde estime parce qu'elle donne avec tant de générosité la quintessence d'elle-même, mais aussi pour sa grandeur d'âme et ses qualités humaines. C'est à une véritable amie que je dis MERCI.

Un grand merci également à Pauline Anton-Gay qui m'a initiée aux joies du gavage et de la chirurgie, à Irina Lobysheva pour avoir doser le NO dans d'innombrables échantillons ainsi qu'à Paquita Rovira et Isabelle Pinson pour leur aide technique. Je remercie également toute l'équipe de la NGN (technique et scientifique) pour son aide ponctuelle ou permanente.

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à mon époux KHALID, pour ton soutien sans relâche, ton aide si précieuse, ta complicité et ton écoute indicibles et pour tout ce que tu me transmets. C'est avec la plus profonde tendresse, doublée d'un infini respect que je te dis encore MERCI.

Et puis un grand merci aussi à mon fils SAMY, ce petit homme tel un véritable petit mage qui détient ce pouvoir fabuleux de donner un sens à toute chose et ce don exceptionnel de tout rendre possible : sources d'inspiration et d'énergie sans égales. Pour toute la compréhension et la patience dont tu as fait preuve SAMY, pour tous les encouragements et le soutien que tu as exprimé avec tes mots à toi, je te remercie encore du fond du cœur.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont donné lieu aux articles originaux et communications suivantes :

Brevet n°020391, déposé le 28 mars 2002 par l'INRA, intitulé "Utilisation de *Lactobacillus farciminis* pour la prévention et le traitement des pathologies digestives".

Inventeurs : Lamine F, Fioramonti J, Bueno L et Théodorou V.

Articles originaux

Lamine F, Fioramonti J, Bueno L, Nepveu F, Cauquil E, Lobysheva I, Eutamène H and Théodorou V. Nitric oxide released by *Lactobacillus farciminis* improves TNBS-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004;39:37-45.

Lamine F, Eutamène H, Fioramonti J, Bueno L and Théodorou V. Colonic responses to *Lactobacillus farciminis* treatment in TNBS-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2004;39:1250-1258.

Participations à des congrès nationaux et internationaux

Lamine F, Theodorou V, Anton P, Roy S, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Protective effect of intraluminal nitric oxide in experimental colitis in rats. Annual Meeting of the American Gastroenterology Association, San Diego USA, mai 2000. (*communication affichée*)

Lamine F, Eutamène H, Bueno L, Fioramonti J, Théodorou V Effet d'un traitement probiotique sur une colite expérimentale chez le rat. Symposium Aliment Santé, Pôle Aliments Santé Midi-Pyrénées, Toulouse, avril 2002 (*communication orale*)

Lamine F, Eutamène H, Bueno L, Fioramonti J, Théodorou V. Effet d'un traitement probiotique sur la viscérosensibilité en conditions basales et inflammatoires chez le rat. Réunion annuelle du Club Français de motricité Digestive, Tours, juin 2002. (*communication orale*)

Lamine F, Eutamène H, Bueno L, Fioramonti J, Théodorou V. Effect of *Lactobacillus farciminis* treatment on visceral pain induced by colorectal distension in rats. XI Symposium on Neurogastroenterology and Motility, Tübingen, Germany, octobre 2002. (*communication orale*)

F.Lamine, E. Cauquil, H.Eutamène, L.Buéo, J.Fioramonti and V.Théodorou. *Lactobacillus farciminis* treatment reduces sensitivity to rectal distension in rats: involvement of nitric oxide. United European Gastroenterology Week, Geneve, Suisse, décembre 2002. (*communication affichée*)

Lamine F, Eutamène H, Bueno L, Fioramonti J, Théodorou V. Effet d'un traitement par *Lactobacillus farciminis* sur une colite expérimentale chez le rat :rôle du monoxyde d'azote. Journées Francophones de Pathologies digestives, Paris, mars 2003. (*communication orale*).

Lamine F, Eutamène H, Bueno L, Fioramonti J, Théodorou V. Nitric oxide released by *Lactobacillus farciminis* protects rat colon against TNBS-induced inflammation. Annual Meeting of the American Gastroenterology Association, Orlando USA, mai 2003. (*communication orale*)

Lamine F, Eutamène H, Bueno L, Fioramonti J, Théodorou V. *Lactobacillus farciminis* treatment reduces sensitivity to rectal distension in rats: involvement of nitric oxide. Annual Meeting of the American Gastroenterology Association, Orlando USA, mai 2003. (*communication affichée*)

Tables des matières

Liste des figures	13
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations	16
Avant propos	17
Partie 1 : Données bibliographiques	22
Chapitre 1 : La microflore intestinale	23
1. La colonisation	24
2. La tolérance	28
Chapitre 2 : La réaction inflammatoire digestive	37
1. Rôle de la microflore intestinale dans l'inflammation digestive	40
1.1. Chez l'homme	40
1.2. Chez l'animal	42
1.3. Translocation bactérienne	45
1.3.1. Les différentes étapes de la translocation bactérienne	46
1.3.2. Les facteurs impliqués dans la translocation bactérienne	48
2. Les cellules et les médiateurs de l'inflammation	50
2.1. Les cellules de l'inflammation	50
2.1.1. Les polymorphonucléaires neutrophiles	52
2.1.2. Les monocytes et macrophages	53
2.1.3. Les mastocytes	53
2.1.4. Les lymphocytes	55
2.2. Les médiateurs de l'inflammation	57
2.2.1. Les médiateurs lipidiques	59
2.2.2. Les cytokines	62
2.2.3. Les dérivés réactifs de l'oxygène	63
2.3. Le monoxyde d'azote	67
2.3.1. Synthèse du NO	67
2.3.2. Expression et régulation des différentes NOS	70
2.3.2.1. Les cNOS	70
2.3.2.2. La iNOS	71
2.3.3. La réactivité du NO	76
2.3.4. NO et inflammation digestive	77

2.3.4.1. le NO endogène	77
2.3.4.2. Le NO exogène	84
2.4. Hypersensibilité viscérale d'origine inflammatoire	87
2.4.1. Les médiateurs	89
2.4.2. NO et hypersensibilité viscérale d'origine inflammatoire	91
Chapitre 3 : Les probiotiques	93
1. Définitions	94
2. Modalités d'utilisation	96
3. Probiotiques et inflammation digestive	98
3.1. Modulation de la flore endogène	98
3.1.1. Les effets anti-bactériens	100
3.1.2. Effets sur l'adhésion et l'invasion des entéropathogènes	101
3.2. Régulation de la barrière intestinale	101
3.3. Effets des probiotiques sur la translocation bactérienne	103
3.4. Immunomodulation	103
3.4.1. Probiotiques et IgA	103
3.4.2. Profils des cytokines	104
4. Probiotiques et douleur viscérale	109
5. <i>Lactobacillus farciminis</i>	110
Partie 2 : Objectifs et résultats	112
Objectifs de l'étude	113
Résultats expérimentaux	115
<u>Résultats 1</u> : Le monoxyde d'azote libéré par <i>Lactobacillus farciminis</i> réduit la sévérité d'une colite induite par le TNBS chez le rat	116
<u>Résultats 2</u> : Réponses coliques au traitement par <i>Lactobacillus farciminis</i> dans la colite induite par le TNBS chez le rat	128
<u>Résultats 3</u> : Influence d'un traitement oral par <i>Lactobacillus farciminis</i> sur l'hypersensibilité colo-rectale induite par une colite au TNBS chez le rat	140
Partie 3 : Discussion générale et perspectives	151
1. Considérations méthodologiques	153
2. NO exogène et colite induite par le TNBS	155
3. Réponses coliques au traitement par <i>Lactobacillus farciminis</i> dans la colite induite par le TNBS	160
4. Influence d'un traitement oral par <i>Lactobacillus farciminis</i> sur l'hypersensibilité colo-rectale à la distension induite par une colite au TNBS	165
5. Conclusion et perspectives	170
Partie 4 : Références bibliographiques	172

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du développement des écosystèmes gastro-intestinaux humain et murin	27
Figure 2 : Relation entre la colonisation bactérienne du tube digestif et le développement du système immunitaire intestinal	29
Figure 3 : Représentation schématique du GALT	29
Figure 4 : Reconnaissance des PAMPs et voies de signalisation des TLRs	31
Figure 5 : Cascade d'activation du TLR-4 induite par le LPS	33
Figure 6 : Schéma des principaux éléments intervenant dans la réaction inflammatoire	38
Figure 7 : Facteurs impliqués dans la translocation bactérienne	47
Figure 8 : Schéma de la différenciation des cellules T naïves	56
Figure 9 : Schéma du métabolisme de l'acide arachidonique.	58
Figure 10 : Sources potentielles de superoxyde et transformation du peroxyde d'hydrogène	64
Figure 11 : Schéma des voies d'action du NO dans la défense de la muqueuse digestive	66
Figure 12 : Formation de monoxyde d'azote à partir de la catalyse de la L-arginine par les NOS	66
Figure 13 : Schéma représentatif de la structure des dimères constituants les NOS.	69
Figure 14 : Schéma de synthèse du contrôle des niveaux de NO	73
Figure 15 : Les effets du NO adapté d'après la littérature	75
Figure 16 : Les kinines et la chaîne des cytokines dans la douleur aiguë inflammatoire	88
Figure 17 : Protocole expérimental relatif à l'étude de l'effet d'un traitement par <i>Lactobacillus farciminis</i> sur l'hypersensibilité colo-rectale à la distension induite par une colite au TNBS.	145

Figure 18 : Effet d'un traitement par <i>Lactobacillus farciminis</i> (10^{12} ufc/j) sur la réponse abdominale liée à la distension colo-rectale et réversion par l'hémoglobine	147
Figure 19 : Effet d'un traitement par <i>Lactobacillus farciminis</i> (10^{12} ufc/j) en présence ou non d'hémoglobine sur le tonus de la paroi colique en réponse à la distension colo-rectale	147
Figure 20 : Effet d'un traitement par <i>Lactobacillus farciminis</i> (10^{12} ufc/j) sur l'hypersensibilité viscérale induite par le TNBS en réponse à la distension colo-rectale et réversion par l'hémoglobine	149
Figure 21 : Effet d'un traitement par <i>Lactobacillus farciminis</i> (10^{12} ufc/j) en présence ou non d'hémoglobine sur le tonus de la paroi colique en réponse à la distension colo-rectale dans la colite induite par le TNBS	149
Figure 22 : Hypothèses d'action du NO exogène dans la réduction de la sévérité de la colite induite par le TNBS	158
Figure 23 : Synthèse des hypothèses d'action de <i>Lactobacillus farciminis</i> dans la réduction de la sévérité de la colite induite par le TNBS	163
Figure 24 : Hypothèses d'action de <i>Lactobacillus farciminis</i> dans la modulation de l'hypersensibilité colo-rectale à la distension induite par le TNBS.	169

Liste des tableaux

Tableau I : Facteurs chimiotactiques des polynucléaires neutrophiles	51
Tableau II : Effets des médiateurs libérés par les mastocyte	54
Tableau III : .Caractéristiques de différentes cyclooxygénases	60
Tableau IV :Effets des probiotiques au cours de différentes situations pathologiques inflammatoires chez l'homme	97
Tableau V :Effets des probiotiques dans différents modèles de colite expérimentale	97
Tableau VI : Effet du TNBS sur la sensibilité viscérale en réponse à la distension colo-rectale et influence d'un traitement par <i>L. farciminis</i> (10^{12} ufc/j) sur la réponse abdominale à la distension en conditions inflammatoires	148

Liste des abréviations

3-NT :	3-nitrotyrosine
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AG :	Amino-Guanidine
CAMPs :	<i>Commensal-Associated Molecular Patterns</i>
CD :	Cellules Dendritiques
CGRP :	peptide lié au gène de la calcitonine
COX :	Cyclooxygénase
DSS :	Dextran Sodium Sulphate
EHEC :	<i>Escherichia coli</i> entéro-hémorragique
EIEC :	<i>Escherichia coli</i> entéro-invasive
EOA :	Espèces Activées de l'Oxygène
EPEC :	<i>Escherichia coli</i> entéro-pathogène
H₂O₂ :	peroxyde d'hydrogène
HOCl :	acide hypochloreux
Ig :	immunoglobuline
IL :	interleukine
INF :	interféron
L-NAME :	N ^G nitro-L-arginine méthyl ester
L-NMMA :	N ^G nitro-monométhyl-L-arginine
LPS :	lipopolysaccharide
LTA :	acide lipoteichoïque
LTs :	leucotriènes
MC :	maladie de Crohn
MCP-1 :	<i>Macrophage chemottractant protein-1</i>
MICI :	maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MPO :	myeloperoxydase
N₂O₃ :	dinitrogène trioxyde
NF-kB :	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGF :	<i>nerve growth factor</i>
NO :	monoxyde d'azote
NOS :	NO Synthase
O₂^{•-} :	anion superoxyde
OH[•] :	radical hydroxyl
ONOO⁻ :	peroxynitrite
PAMPs :	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBMC :	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PG :	peptidoglycane
PGs :	prostaglandines
RCH :	recto-colite hémorragique
RLO :	radicaux libres oxygénés
RNOS :	<i>reactive nitric oxygen species</i>
SNP :	nitroprussiate de sodium
SOD :	superoxyde dismutase
TGF :	<i>transforming growth factor</i>
TLRs :	<i>Toll Like Receptors</i>
TNBS :	acide trinitrobenzène sulfonique
TNF :	<i>tumor necrosis factor</i>
UFC :	unité formant colonie

Avant-propos

La microflore intestinale joue un rôle important dans la physiologie et la physiopathologie du tube digestif. Les interactions entretenues entre la flore, l'épithélium et le système immunitaire maintiennent le tube digestif dans un état "d'inflammation physiologique" contrôlée. Des progrès considérables ont été faits dans le but de faire avancer les connaissances dans le domaine de l'écologie digestive grâce notamment aux nouvelles méthodes moléculaires permettant de caractériser les écosystèmes microbiens. Par ses interactions complexes avec l'hôte, la microflore intestinale stimule les fonctions immunitaires et participe ainsi à l'homéostasie de l'hôte. Or des modifications de l'équilibre bactérien intestinal (stress, agents infectieux et/ou inflammatoire, facteurs alimentaires, médication...) peuvent conduire, à court ou long terme, à une rupture de l'homéostasie et apparition de pathologies digestives (gastro-entérites infectieuses, maladies inflammatoires, allergiques alimentaires). Dans ce contexte, l'administration de probiotiques pourrait être envisagée comme un moyen préventif ou réparateur de la rupture de l'homéostasie intestinale occasionnée par ces modifications de la flore résidente.

Dérivant du mot grec désignant la vie, "bios", le terme de probiotique est né de l'observation de l'influence positive de certains micro-organismes et notamment des bactéries lactiques sur la flore intestinale. Micro-organismes, qui lorsqu'ils sont ingérés vivants et en quantité suffisante exercent un effet positif sur la santé de l'hôte, les probiotiques font l'objet de nombreux travaux avec plus de 1200 articles publiés dans des revues scientifiques ces 15 dernières années, contre une vingtaine avant 1990. Les études conduites

chez l'animal, ainsi que les études cliniques suscitent aujourd'hui un espoir dans le traitement de certaines pathologies par les probiotiques dont le champ thérapeutique potentiel est vaste et ne se limite pas à la sphère digestive.

Toutefois, un effort considérable reste à faire dans "l'approche mécanistique" de l'action des probiotiques. En effet, bien qu'ils représentent une faible portion de la masse microbienne du système gastro-intestinal de l'homme, ils semblent y jouer des rôles biologiques déterminants par des voies qui doivent encore être élucidées. Ainsi les voies d'interaction bactérie-hôte, les mécanismes impliqués ou encore la spécificité souche bactérienne en mono ou pluri-association et pathologie traitée constituent des champs d'explorations scientifiques.

De façon générale, les effets bénéfiques des probiotiques observés chez l'animal et chez l'homme peuvent être associés à un renforcement de la barrière digestive dans sa composante immunitaire et non-immunitaire. Les probiotiques sont en effet considérés comme des "facteurs" protecteurs vis-à-vis des risques d'apparitions de pathologies digestives. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et les troubles fonctionnels intestinaux (TFI) comptent parmi ce type de pathologies. De plus, bien que l'étiologie exacte de ces pathologies digestives demeure mal connue, les données épidémiologiques et physiopathologiques révèlent l'existence d'un lien de causalité entre l'apparition de ces maladies et l'intervention entre autres de facteurs infectieux et/ou immunologiques.

Les MICI sont des maladies graves, de faible prévalence mais très invalidantes évoluant par poussées successives (phases aiguës) entrecoupées de phases de rémission et les traitements sont très variés. Les symptômes associés sont de fortes douleurs abdominales, des diarrhées fréquentes et parfois sanglantes. De nombreux arguments plaident en faveur de l'implication de la flore intestinale dans la survenue des MICI *via* le système immunitaire muqueux intestinal. Schématiquement, les deux mécanismes impliqués concernent d'une part l'action de la flore intestinale sur le système immunitaire (rôle pro-inflammatoire des composants bactériens, augmentation de la perméabilité intestinale, recrutement des cellules

inflammatoires...) et d'autre part la réponse anormale de l'hôte vis-à-vis de la flore intestinale (rupture de tolérance, modulation de la résistance aux bactéries par les cytokines...).

Les TFI sont des pathologies de faible gravité mais de forte prévalence (20% de la population des pays occidentaux) dont les traitements sont décevants. Les TFI et en particulier le syndrome de l'intestin irritable (SII) sont caractérisés par différents symptômes (alternance de diarrhées et de constipation, ballonnement, douleur abdominale ...) avec en dénominateur commun l'hypersensibilité viscérale associée à la distension de la paroi intestinale. Les études cliniques montrent qu'environ 1 patient sur 3 ayant présenté une infection bactérienne développe dans les 3 mois qui suivent la fin de l'infection les symptômes du SII : pathologie que l'on appelle syndrome de l'intestin irritable post-infectieux.

Une application thérapeutique des probiotiques pourrait être envisagée dans le traitement de ces pathologies où un déséquilibre de la flore et des réponses immunitaires est impliqué. Dans ce contexte d'applications thérapeutiques possibles, un effort considérable reste à faire dans la compréhension et dans la détermination des mécanismes d'action impliqués dans les effets exercés par les probiotiques. Aussi, une approche plus rationnelle dans la sélection de ces agents microbiens pourrait être proposée afin de préjuger de leurs potentialités thérapeutiques. Par exemple, dans l'objectif d'une application thérapeutique dans les pathologies d'origine inflammatoire, cette approche pourrait être basée sur le choix préalable d'une bactérie dont un ou plusieurs métabolites seraient susceptibles d'exercer un pouvoir anti-inflammatoire. Evaluer les mécanismes d'action des probiotiques à l'aide d'études *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux est indispensable même si la transposition des résultats à l'homme reste difficile. Il est clair que compte tenu de la spécificité de l'écologie microbienne de chaque espèce, la recherche des effets des probiotiques sur l'hôte humain en amont de leur utilisation thérapeutique paraît indispensable.

Concernant l'exploration des mécanismes d'action dans l'inflammation colique chez l'animal, le modèle de colite induite par le TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique) est largement utilisé. Ceci réside dans la similarité

entre cette colite induite et les MICI au niveau non seulement des signes cliniques et des conséquences histopathologiques, mais également des médiateurs impliqués. Parmi ces médiateurs figure le monoxyde d'azote (NO).

Le NO est un gaz radicalaire, lipophile qui a été décrit comme étant un médiateur jouant un rôle prépondérant dans la régulation de nombreux systèmes biologiques (cardiovasculaire, nerveux, génito-urinaire, digestif, immunitaire). Le NO est synthétisé à partir de deux principaux types de NO synthétases (NOS). Un type exprimé de manière constitutive (cNOS), produisant en conditions physiologiques de faibles quantités de NO et un type inductible (iNOS), qui à l'inverse s'exprime après stimulation (lipopolysaccharides bactériens (LPS), endotoxines, cytokines pro-inflammatoires ...) et libère d'importantes quantités de NO.

Au niveau du tube digestif, le NO est produit par plusieurs types de cellules (cellules endothéliales, neurones myentériques, cellules inflammatoires, entérocytes...) et participe à la régulation de différentes fonctions. Les rôles du NO sont régis par le lieu, la durée et l'importance de sa synthèse, faisant de cette molécule ubiquitaire l'objet de nombreuses controverses. Issu des cNOS, le NO est impliqué à travers plusieurs mécanismes dans le maintien de la fonction de la barrière intestinale. A l'inverse, des effets délétères relatifs à la production de NO via la voie de la iNOS et de ses métabolites toxiques (tels que le peroxy-nitrite) ont été observés au cours des processus inflammatoires au niveau intestinal tant chez l'animal que chez l'homme.

D'un autre côté, les effets protecteurs du NO apporté de manière exogène sont mis en évidence dans le cadre de l'inflammation des parties hautes du tube digestif chez l'animal. Dans le cadre de ce travail nous nous sommes intéressés à l'effet d'un apport exogène de NO dans les parties basses du tube digestif au cours d'une colite induite par le TNBS. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps utilisé un donneur chimique du NO, le nitroprussiate de sodium et mis en évidence son rôle protecteur vis-à-vis de la colite expérimentale. L'objectif de notre démarche était d'apporter du NO par une bactérie, d'évaluer ses propriétés anti-inflammatoires, d'identifier un mécanisme d'action et de valider son statut en tant qu'agent probiotique.

Pour ce faire, nous avons choisi une bactérie lactique, *Lactobacillus farciminis* connue pour produire du NO *in vitro*, et montré tout d'abord la capacité de cette souche bactérienne administrée par voie orale à produire du NO dans la lumière colique *in vivo*. Puis nous avons montré que *Lactobacillus farciminis* réduit une inflammation au niveau du côlon chez le rat et module la douleur viscérale induite par une distension recto-colique à travers un mécanisme impliquant le NO. Ces résultats obtenus chez l'animal permettent d'envisager que *Lactobacillus farciminis* pourrait également être efficace chez l'homme. A ce titre, un brevet a été déposé par l'INRA en vue de l'utilisation de cette souche pour la prévention ou le traitement de pathologies digestives.

Partie **1**

Données bibliographiques

Chapitre **1**

*La microflore
intestinale*

SOMMAIRE

La colonisation
La tolérance

1

La microflore intestinale

1. La colonisation

Stérile *in utero*, le tube digestif est rapidement colonisé dès la naissance par une grande variété de micro-organismes provenant de la mère et de l'environnement. Toutefois, ce n'est qu'après le sevrage qu'on assiste à une diversification et une stabilisation de la flore avec l'installation d'un profil de la flore dominante en relation avec l'alimentation et l'environnement (Cooperstock & Zeed, 1983 ; Moreau *et al*, 1986 ; Zetterström *et al*, 1994 ; Mackie *et al*, 1999). Chez l'homme, la composition quasi-définitive de la microflore intestinale, correspondant à celle de l'adulte, est atteinte vers l'âge de deux ans (Ellis-Pegler *et al*, 1975).

A travers les descriptions de la composition des différentes communautés bactériennes présentes au niveau de l'estomac, de l'intestin grêle, du gros intestin et des matières fécales, il apparaît que (i) pendant la colonisation, les micro-organismes s'organisent sous forme de populations stables occupant des niches tout au long du tractus digestif. Ces niches varient quantitativement et qualitativement d'un biotope à l'autre, (ii) la composition des populations varie selon les disponibilités en nutriments et en oxygène (Savage, 1977 ; Ducluzeau & Raibaud, 1979 ; Savage, 1987 ; Ducluzeau, 1994 ; Tannock, 1995 ; Berg, 1996 ; Holzapfel *et al*, 1998).

L'estomac contient très peu de bactéries résidentes (<10³ unité formant colonie (ufc) / ml de contenu) en raison de son pH acide et du transit rapide (Lambert & Hull, 1996). Seuls des microorganismes acidotolérants sont

capables d'y survivre comme les streptocoques ou les lactobacilles (chez l'homme et chez le rat) (Savage, 1977 ; Holzapfel *et al.*, 1998). Cependant chez l'homme, on peut y trouver des bactéries anaérobies strictes résistant dans ces conditions extrêmes tel qu'*Helicobacter pylori* responsable de gastrites (Lambert & Hull, 1996 ; Berg, 1996). L'intestin grêle supérieur constitue également un environnement hostile à la colonisation bactérienne, lié au transit relativement rapide et à la présence des sécrétions pancréatiques et biliaires (Ducluzeau, 1994 ; Salminen *et al.* 1998) et contient environ 10^5 ufc par ml de contenu (Salminen *et al.*, 1995). Au niveau de l'iléon, parallèlement à une forte diminution de la vitesse de transit du contenu digestif, on constate une augmentation notable de la flore en nombre (10^{7-8} ufc / ml) et en variété (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* et *Enterobacteriaceae*) (Neilsen *et al.*, 1994). A partir du gros intestin, on assiste à un changement brutal de la population bactérienne (Ducluzeau & Raibaud, 1979) associé à des mouvements de brassage du contenu et à une grande disponibilité en nutriments utilisables par les micro-organismes (Mackie *et al.*, 1999). Le nombre devient considérable puisqu'il atteint 10^{8-10} ufc/g de contenu et la masse bactérienne constitue 40 à 55 % du contenu luminal (Cumming & Macfarlane, 1991 ; Naidu, 1999). Les bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*) prédominent très largement et sont 100 à 1000 fois plus abondantes que les bactéries anaérobies facultatives (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*) (Ducluzeau & Raibaud, 1979). La flore fécale contenant près de 10^{11} ufc/g est extrêmement diversifiée puisqu'elle se compose de quelques 400 espèces bactériennes appartenant à environ 50 genres (Savage, 1977 ; Tannock, 1995 ; Berg, 1996) et représente 75 % du poids frais des matières fécales. L'utilisation d'approches moléculaires afin de caractériser la biodiversité des espèces et la composition de la microflore digestive a révélé que chez l'homme la flore fécale diffère quantitativement et qualitativement de la flore cœcale (Marteau *et al.*, 2001). En effet, bien que le nombre de bactéries anaérobies facultatives soit comparable, la flore anaérobie stricte est 100 fois plus élevée dans les fèces que dans le contenu cœcal. En outre, l'analyse des bactéries anaérobies strictes en utilisant des

sondes spécifiques du groupe des Bacteroïdes et celui des Clostridi révèle que ces derniers représentent 44% de l'ARN bactérien fécal contre seulement 13% de l'ARN bactérien cæcal (Marteau *et al.*, 2001).

Au concept de colonisation est associé celui d'adhésion qui recouvre en réalité deux propriétés totalement distinctes : l'attachement aux cellules épithéliales et l'adhésion au mucus. Certaines souches bactériennes possèdent sur leur paroi des structures moléculaires telles que les adhésines capables de reconnaître des récepteurs spécifiques (taxines) de la membrane des cellules de la muqueuse et de s'y attacher (Christensen *et al.*, 1985). D'autres bactéries possèdent un chimiotropisme pour le mucus digestif dont les sucres constituent leur source préférentielle d'énergie. Ces souches se développent donc là où la quantité de mucus est maximale, c'est-à-dire au contact de la muqueuse. La plupart des bactéries de la flore dominante autochtone ne sont pas attachées à la muqueuse mais vivent associées au mucus (Savage, 1987).

Par ailleurs, les bactéries de la microflore intestinale sont classées en bactéries autochtones, allochtones et xénochtones (Dubos *et al.*, 1965 ; Savage, 1977). Les bactéries autochtones sont attachées à la surface de l'épithélium intestinal ou adhérent au mucus. Ces bactéries sont les premières colonisatrices du tractus gastro-intestinal. Les bactéries allochtones sont localisées dans la lumière digestive, elles apparaissent plus tard, mais trouvant des biotopes déjà occupés, elles sont pour la plupart des micro-organismes en transit. Les bactéries xénochtones sont des bactéries exogènes qui transitent dans l'intestin.

La flore autochtone va agir comme une barrière à l'égard de toutes bactéries potentiellement pathogènes en transit (allochtones et xénochtones) (i) par compétition pour les substrats et par exclusion compétitive pour l'attachement à la muqueuse (encombrement stérique ou blocage spécifique des récepteurs) (Holzalfel *et al.*, 1998), (ii) en générant un environnement physiologique restrictif (abaissement du pH intraluminal à travers la production d'acides gras volatils) (Rasic & Kurmman, 1983), (iii) par production de substances anti-bactériennes. Cependant, certains micro-

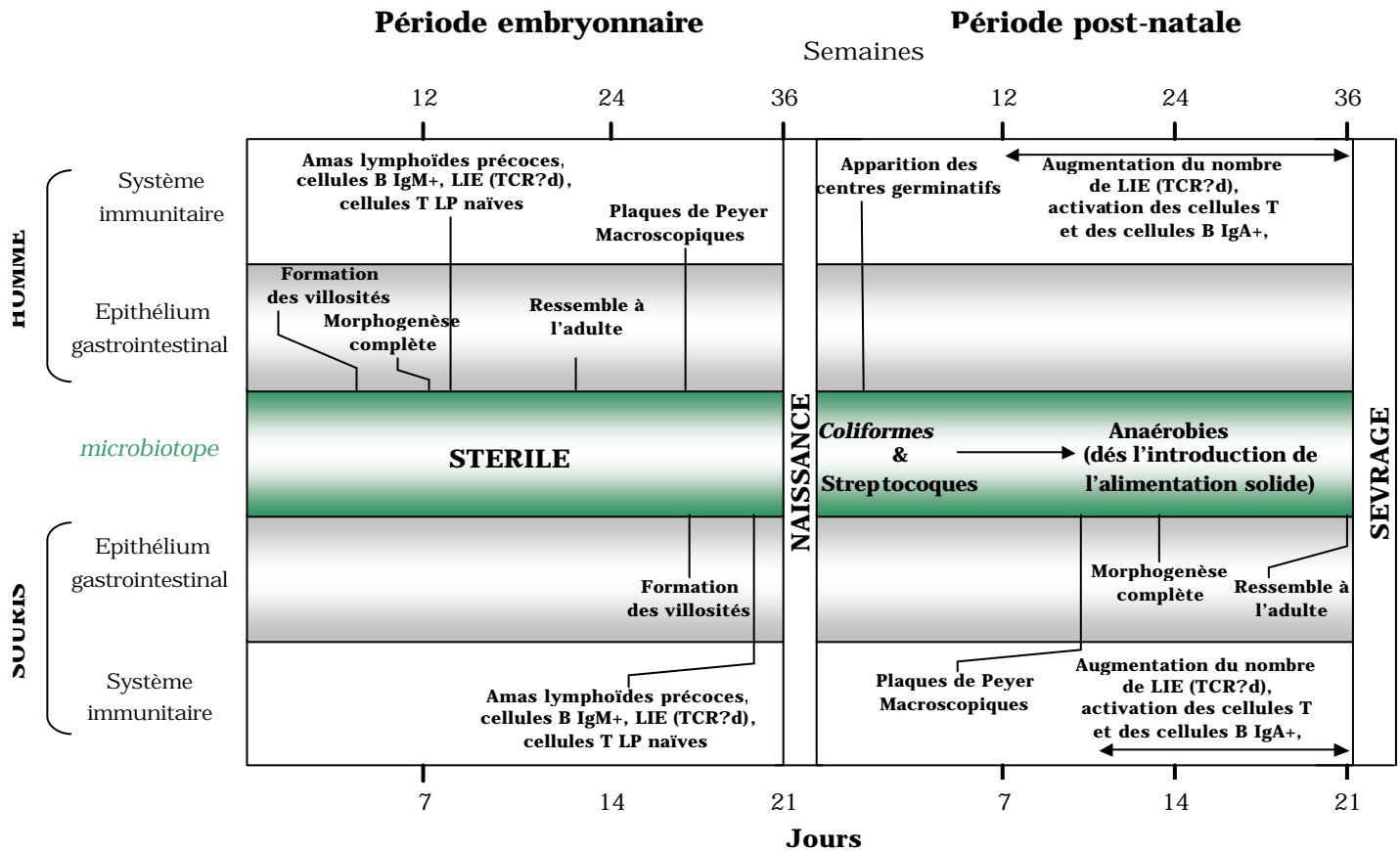


Figure 1 : Représentation schématique du développement des écosystèmes gastro-intestinaux humain et murin (d'après McCracken & Lorenz, 2001).

IgM, immunoglobuline M ; *TCR*, récepteur des cellules T ; *LIE*, lymphocytes intra-épithéliaux ; *LP*, lamina propria ; *IgA*, immunoglobuline A.

organismes potentiellement nuisibles font partie de la flore normale mais n'exprimeront leur pathogénicité que lors de changements anormaux de l'écosystème intestinal (Wingate, 1990 ; Deitch, 1994 ; Duncan & Edberg, 1995). Notons également que certaines bactéries peuvent être autochtones pour une région spécifique du tube digestif mais allochtones pour une autre (Dubos *et al.*, 1965).

2. La tolérance

Le tube digestif développe une tolérance vis-à-vis de la population bactérienne qu'il héberge. Ainsi, les études gnotobiologiques montrent que certaines bactéries de la flore intestinale sont impliquées dans le développement de l'épithélium intestinal et du système immunitaire (humoral et cellulaire) de la muqueuse intestinale (pour revue voir Falk *et al.*, 1998 ; Cebra, 1999 ; McCracken & Lorenz, 2001) (Figures 1-3). En outre, c'est l'interaction entre le système immunitaire muqueux et la microflore intestinale qui maintient la muqueuse intestinale dans un état "d'inflammation physiologique" contrôlée (Berg & Savage, 1975 ; Shroff *et al.*, 1995 ; Helgeland *et al.*, 1996 ; Cebra *et al.*, 1998). En effet, il apparaît à travers la littérature que les bactéries de la microflore intestinale modèleraient l'activité du système immunitaire de façon à établir la tolérance de l'hôte à leur égard et éviter une réponse immunitaire contraire à leur implantation. Ces effets s'exerceraient à plusieurs niveaux.

L'un de ces mécanismes serait relatif à l'activation des lymphocytes T capables d'inhiber les réponses inflammatoires intestinales. A l'état basal, le micro-environnement intestinal est caractérisé par la présence de cytokines à fonction immunosuppressive telles que l'IL-10 et le TGF- β produites par les cellules Th3 (Strober *et al.*, 1998), les Tr1 (Groux *et al.*, 1997 ; Groux & Powrie, 1999), mais aussi par les cellules épithéliales, les cellules dendritiques et les cellules mésenchymateuses (Fagarasan *et al.*, 2001 ; de Jong *et al.*, 2002). De ce fait, l'intestin semble manifester naturellement (i) une réponse en faveur des cellules T régulatrices (Th3/Tr1) traduisant une

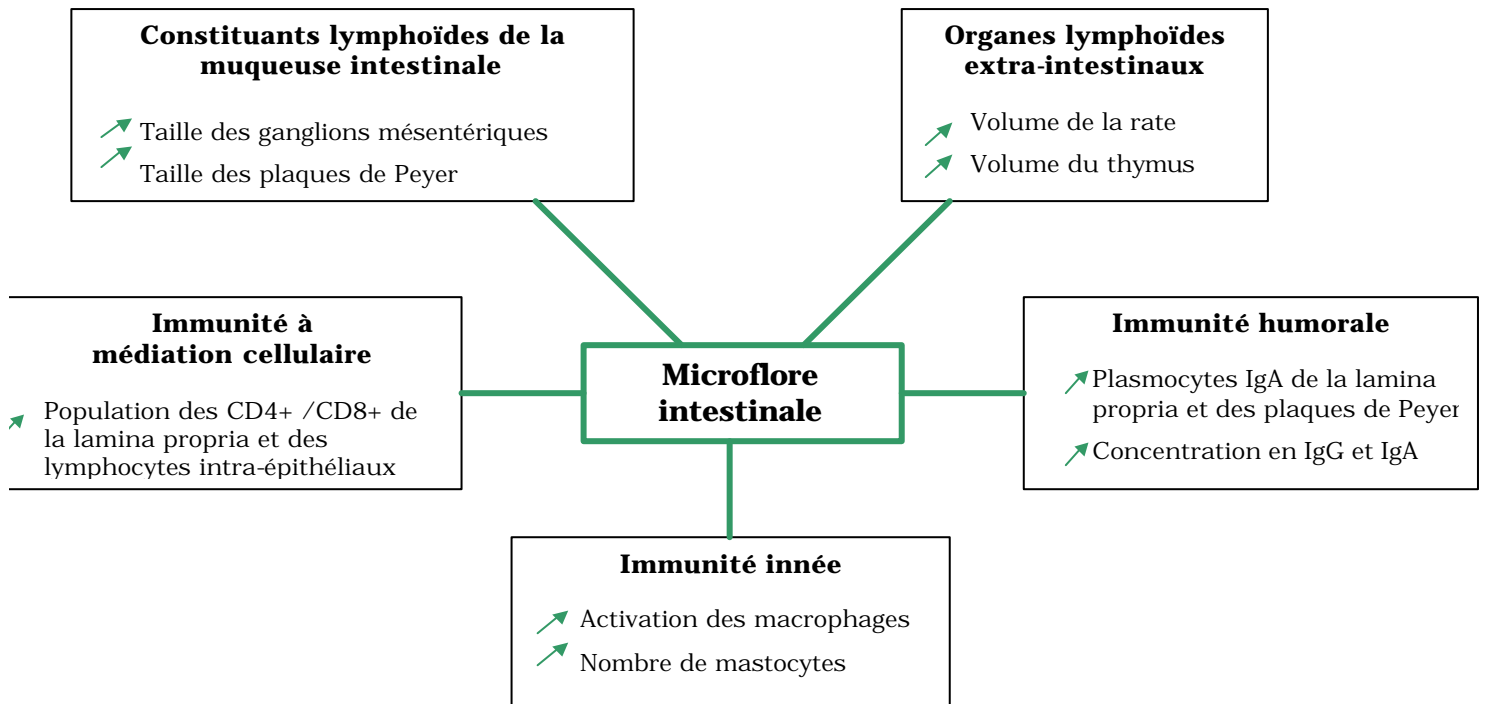


Figure 2 : Relation entre la colonisation bactérienne du tube digestif et le développement du système immunitaire intestinal (synthèse d'après Falk *et al.*, 1998 ; Cebra, 1999 et McCracken & Lorenz, 2001).

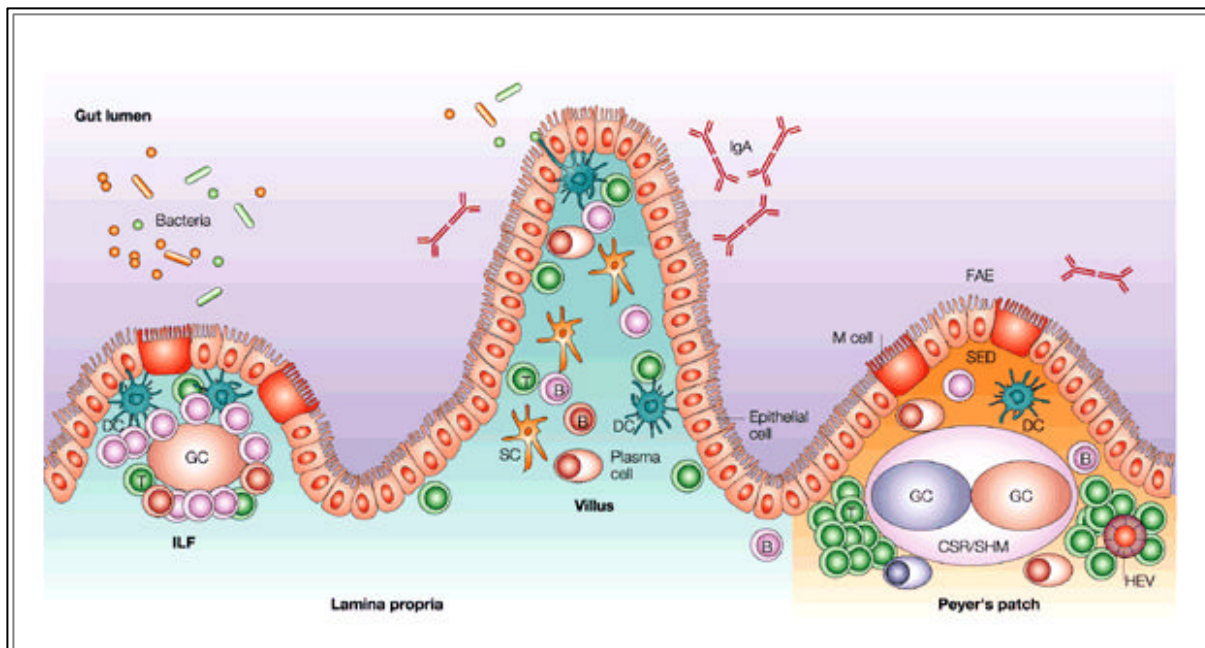


Figure 3 : Représentation schématique du GALT (d'après Fagarasan & Honjo, 2003). ILF, follicules lymphoïdes isolés ; FAE : épithélium associé au follicule ; SED dôme sub-épithélial DC, cellules dendritiques ; HEVs hautes veinules endothéliales ; GCs, centres germinatifs ; SCs cellules du stroma

prédisposition à l'induction de la tolérance locale vis-à-vis d'antigènes de l'environnement, en particulier ceux d'origine bactérienne (Powrie *et al.*, 1994 ; Groux *et al.*, 1997), (ii) une tendance vers des réponses protectrices qui sont dominées par la production d'immunoglobuline de classe A (IgA) (Khoo *et al.*, 1997).

La reconnaissance de la flore endogène par le système immunitaire de l'hôte se traduit en effet par une production d'anticorps locaux et systémiques (Apperloo-Renkema *et al.*, 1993). En atteignant la lumière intestinale (Undergown & Schiff, 1986), les IgA de la lamina propria exercent une action protectrice contre les antigènes microbiens (Matsunaga & Rahman, 1998 ; Mestecky *et al.*, 1999) en contrôlant l'adhésion et la croissance bactérienne (Brandtzaeg *et al.*, 1989), et en neutralisant les toxines et les virus (Mestecky *et al.*, 1999). Ce processus qualifié de "*immune exclusion*" s'opère en l'absence d'un complément d'activation immunitaire et constitue un processus non-inflammatoire (pour revue voir Fagarasan & Honjo, 2003). Néanmoins à ce jour, on ne connaît pas quelle est l'influence exacte de la réponse immunitaire sécrétoire sur la composition de la microflore intestinale. A travers la littérature, il apparaît que seule une partie des cellules bactériennes de la microflore résidente est recouverte par des IgA (Van der Waaij *et al.*, 1996), et que cette réponse d'anticorps ne semblerait pas conduire à l'élimination de la flore endogène de l'intestin (Apperloo-Renkema *et al.*, 1993). Par ailleurs, la production des IgA dirigées contre les bactéries de la flore est indépendante de la participation des cellules T ou des centres germinatifs, mais dérive des lymphocytes B1 (Bos *et al.*, 1996 ; Macpherson *et al.*, 2000). Ces cellules provenant de la cavité péritonéale (Kroese *et al.*, 1989) se sont développées dans le compartiment sub-épithélial et sont répandues tout au long de la lamina propria (Herzenberg, 2000). En revanche, lors d'une invasion bactérienne, ce sont les anticorps (IgG spécifiques et IgA) produits localement par les lymphocytes B2, dépendant de la voie T-cellulaire, qui prennent le relais (pour revue voir Fagarasan & Honjo, 2003 ; Macpherson *et al.*, 2000).

Ainsi, la production des IgA dans la lamina propria est régulée (i) par la colonisation bactérienne (Kett *et al.*, 1995 ; Macpherson *et al.*, 2000), (ii) par

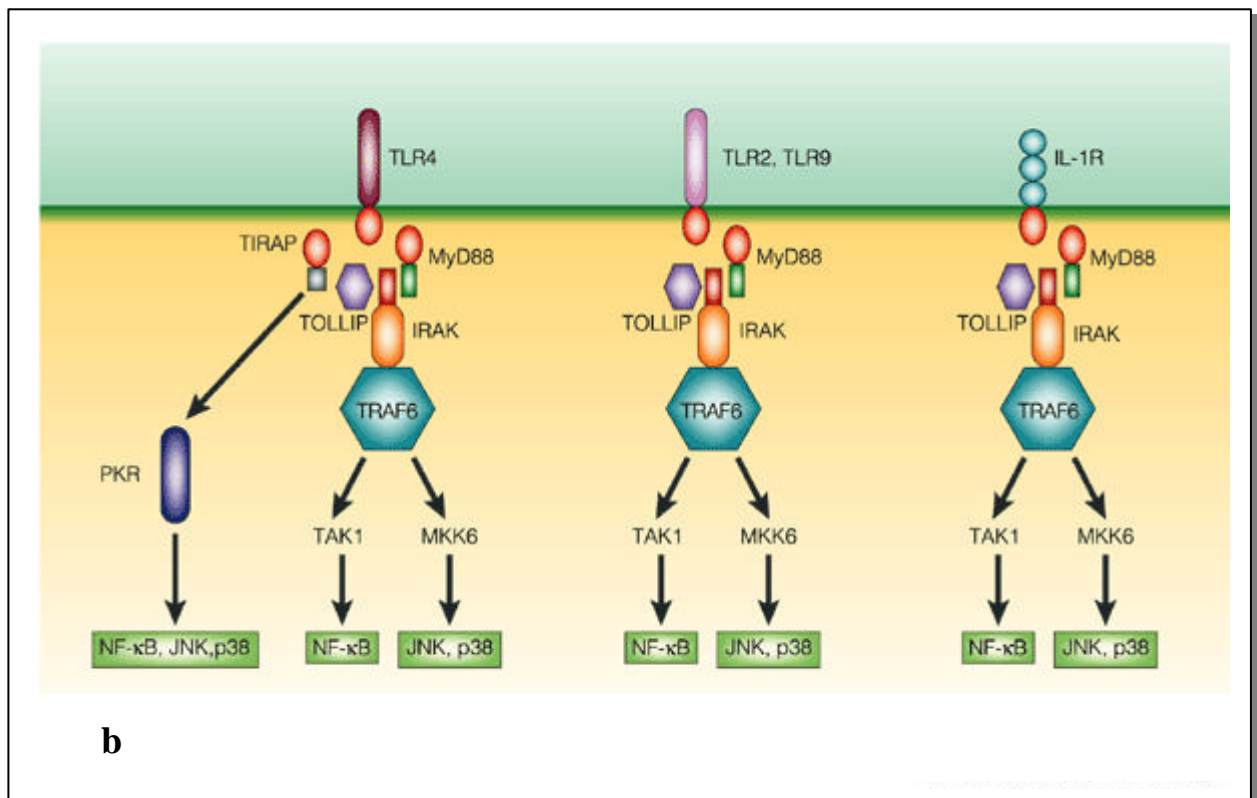
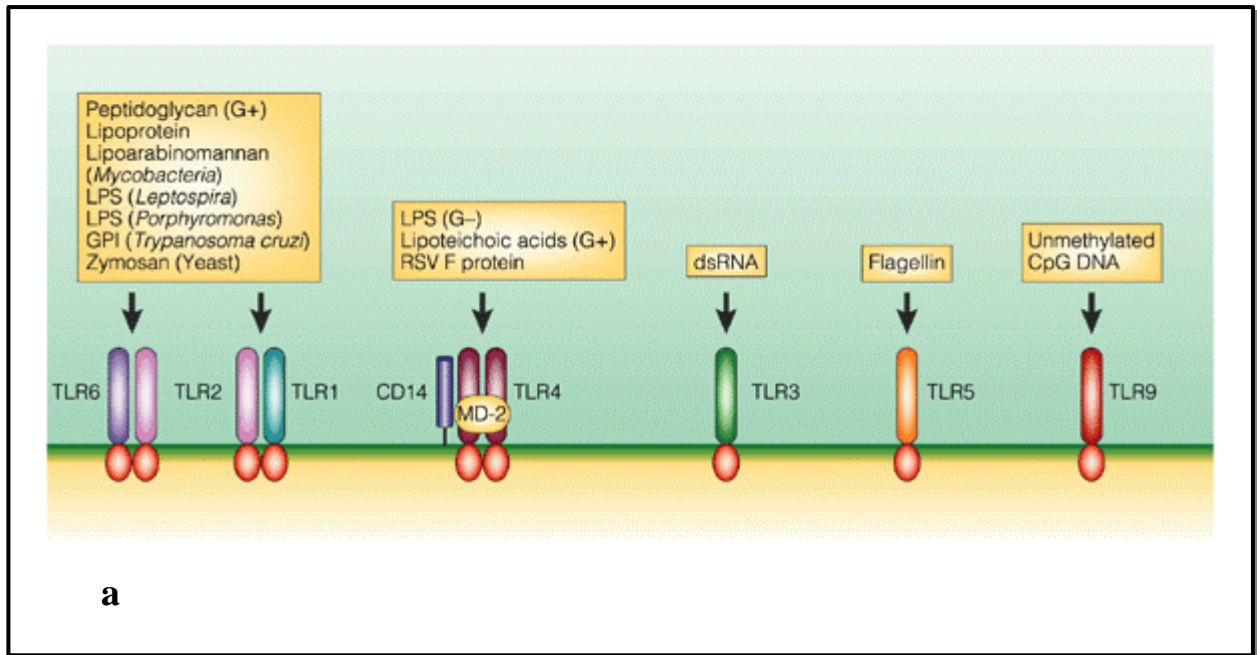


Figure 4 : Reconnaissance des PAMPs (a) et voies de signalisation (b) des TLRs (d'après Medzhitov, 2001)

des médiateurs endogènes tels que TGF- β , IL-10, IL-5, principalement produits par les Th3/Tr1 (Khoo *et al.*, 1997; Lebman & Edmiston 1999).

Par ailleurs en contact direct avec les bactéries, les cellules épithéliales apparaissent comme de véritables cellules de l'immunité. En effet, les cellules épithéliales possèdent comme les cellules immunitaires, des récepteurs spécifiques aux motifs bactériens tels que les TLRs (*Toll Like Receptors*) (pour revue voir Medzhitov, 2001 ; Beutler *et al.*, 2003). Ces motifs bactériens appelés PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Medzhitov *et al.*, 1997) ou CAMPs (*Commensal-Associated Molecular Patterns*) (Cario *et al.*, 2002) sont conservés au sein d'une même classe de micro-organismes, ils sont spécifiques et sont exprimés par tous les micro-organismes, qu'ils soient pathogènes ou non (Medzhitov & Janeway, 1997). Ils incluent les composants de la paroi cellulaire bactérienne tels que les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes (PG), l'acide lipoteichoïque (LTA), mais aussi les nucléotides bactériens tels que les motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien, l'ARN double brin de certains virus ou encore des mannoses spécifiques de la paroi des levures (Medzhitov & Janeway, 1997). Les PAMPs sont reconnus par des récepteurs spécifiques et notamment les TLRs qui appartiennent à la classe des PRRs (*Pattern-Recognition Receptors*) (Koop & Medzhitov, 1999) (Figure 4a). Les TLRs sont impliqués à la fois dans la phagocytose et dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. L'interaction entre les PAMPs et les TLRs déclenche, une cascade de signalisation intracellulaire qui aboutit à l'activation du NF- κ B (pour revue voir Medzhitov & Janeway, 2000) (Figure 4b). Ce facteur nucléaire régule la transcription de nombreux gènes codant pour la synthèse de médiateurs de l'inflammation (Baeurle & Henkel, 1994 ; May & Ghosh, 1998 ; Schmid & Adler, 2000). Actuellement 10 récepteurs de type Toll (TLR1 à TLR10) ont été clonés chez l'homme (Aderem & Ulevitch, 2000). Les TLRs sont exprimés à la surface de différents types cellulaires comprenant les lymphocytes B et T, les macrophages, les polynucléaires, les mastocytes et les cellules épithéliales intestinales. Chez l'homme, les récepteurs de type Toll sont des récepteurs transmembranaires dont la partie intracellulaire appelée domaine TIR (*Toll Interleukine-1 Receptor*) (Medzhitov & Janeway, 1997 ; Rock *et al.*, 1998) est homologue à celle du récepteur à

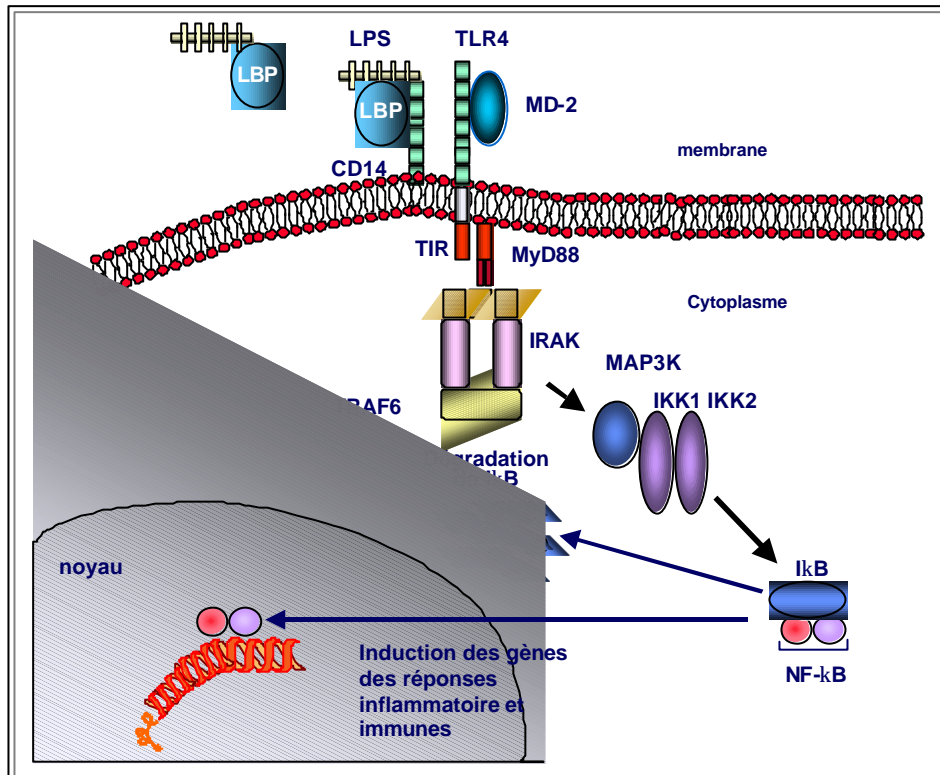


Figure 5 : Cascade d'activation du TLR-4 induite par le LPS.

l'interleukine-1. La différence entre les différents TLRs humains se situe essentiellement au niveau de leur partie extracellulaire. Cette partie du récepteur est impliquée dans la reconnaissance spécifique des PAMPs.

Parmi les TLRs impliqués dans la reconnaissance des PAMPs bactériens figurent le TLR2, le TLR4, le TLR5 et le TLR9. Le TLR2 est impliqué dans la reconnaissance de nombreux motifs microbiens parmi lesquels figurent les composants de la paroi des bactéries à Gram positif tels que les PG (Takeuchi *et al.*, 1999), le LTA et les lipoprotéines bactériennes (Aliprentis *et al.*, 1999 ; Brightbill *et al.*, 1999 ; Takeuchi *et al.*, 2000). Toutefois, le large spectre de ligands reconnus par le TLR2 est expliqué en partie par la coopération entre TLR2 et au moins deux autres TLRs : TLR1 et TLR6. Ainsi, la formation d'hétérodimères entre TLR2 et TLR1 ou TLR6 permet d'augmenter considérablement le spectre de reconnaissance de ce récepteur tout en conservant une certaine sélectivité (Ozinsky *et al.*, 2000 ; Takeuchi *et al.*, 2001).

Le TLR4 a été identifié comme étant le récepteur majeur pour la reconnaissance du LPS des bactéries à Gram négatif (Poltorak *et al.*, 1998 ; Qureshi *et al.*, 1999 ; Hoshino *et al.*, 1999). La reconnaissance du LPS par le TLR4 (Figure 5) est complexe et nécessite (i) un co-récepteur, le CD14 (Wright *et al.*, 1990 ; Funda *et al.*, 2001) également décrit comme PRRs (Koop & Medzhitov, 1999) et impliqué dans la reconnaissance d'autres motifs bactériens tels que le PG (Diarski *et al.*, 1998), (ii) plusieurs molécules accessoires tels que la LBP (*LPS Binding Protein*), une protéine de transport (Tobias *et al.*, 1986 ; Wright *et al.*, 1989), et des molécules de signalisation du LPS associées au domaine extracellulaire du TLR4 telles que la MD-2 (exprimée à la surface des macrophages) (da Silva Correia *et al.*, 2001) et la RP105 (exprimée à la surface des cellules B) (Miyake *et al.*, 1995).

Le TLR5 est impliqué dans la reconnaissance de la flagelline, une protéine conservée qui forme les flagelles bactériens (Hayashi *et al.*, 2001).

Le TLR9 reconnaît les motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien (Hemmi *et al.*, 2000 ; Bauer *et al.*, 2001).

Ainsi, il apparaît que tout agent bactérien peut activer un TLR et enclencher une réponse immunitaire. Les TLRs situés au niveau du pôle apical des cellules épithéliales semblent contrôler la balance entre les différentes communautés bactériennes. Toutefois, il semblerait que les TLR2 et TLR4 soient normalement faiblement présents sur les cellules épithéliales, minimisant de ce fait la reconnaissance des CAMPs (Cario *et al.*, 2002). Ainsi, un contact permanent entre les composés bactériens et les cellules épithéliales se traduit chez ces dernières par un état d'*hyporesponsiveness* à l'égard de ces bactéries (Otte & Podolsky, 2004). Cette faible réponse des cellules épithéliales résulterait non pas d'une altération dans l'expression des TLRs ou des molécules signalisatrices, mais relèverait d'une diminution de l'expression des TLRs à la surface de ces cellules associée à une diminution de l'activité IRAK (protéines de signalisation) (Otte & Podolsky, 2004). Par ailleurs, une augmentation de l'expression des Tollip (protéines de régulation) dans les cellules épithéliales est observée en parallèle et se traduit par une diminution de la réponse pro-inflammatoire par ces dernières (Otte & Podolsky, 2004).

Il a également été rapporté *in vitro* que dans des co-cultures cellules épithéliales-PBMC, certaines bactéries de la flore commensale humaine (i.e. *E. coli* non pathogène et lactobacilles) induisent deux types de réponse (i) la production de TGF- β par les cellules Caco-2 ou HT29, (ii) l'induction d'IL-10 par les PBMC (Haller *et al.*, 2000, 2002). Ainsi, certains lactobacilles (*L. johnsonii* La1 et *L. gasseri*) induisent en l'absence de tout événement pro-inflammatoire, la production de TGF- β par les cellules épithéliales. D'autres lactobacilles et *E. coli* non pathogène déclenchent quant à eux une réponse inflammatoire, après activation du NF- κ B, se traduisant par la production de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-8 et de MCP-1. Toutefois, cette réponse initiale pro-inflammatoire des cellules épithéliales est seulement transitoire et est "switchée" lors de la présence dans le compartiment basolatéral de PBMC (Haller *et al.*, 2000). Ainsi, la flore endogène active les cellules épithéliales et les macrophages ayant acquis un phénotype immunosuppresseur sont alors capables de contrôler l'expression des cytokines inflammatoires des cellules épithéliales en sécrétant de l'IL-10. A l'inverse, lors de la stimulation des

co-cultures Caco-2/PBMC par des EPEC, l'induction des cytokines pro-inflammatoires n'est pas transitoire et se traduit par une inflammation (Haller *et al.*, 2002).

Le rôle de l'épithélium intestinal dans la reconnaissance et la réponse de l'hôte à l'égard des bactéries luminales dépend également d'autres éléments (pour revue voir Blum & Schiffrin, 2003) tels que l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité MHC classe II pouvant activer les cellules T CD4⁺ (Mayer, 1998 ; Hershberg *et al.*, 1998), l'expression de facteurs du complément (Andoh *et al.*, 1993), l'expression de récepteurs des cytokines (Bocker *et al.*, 1998) et la capacité de sécréter des cytokines et chémokines en réponse aux bactéries pathogènes (Eckmann *et al.*, 1993 ; Jung *et al.*, 1995). Enfin, des récepteurs intracellulaires au LPS ont également été décrits comme étant impliqués dans l'activation du NF- κ B et induisant la libération de cytokines pro-inflammatoires (Bertin *et al.*, 1999; Beatty *et al.*, 1999).

Ainsi à l'état physiologique, la muqueuse intestinale manifeste une tolérance à l'égard de sa microflore. Cependant, l'initiation et le maintien de certaines pathologies digestives, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), ont été attribués à certaines bactéries de la flore autochtone (Peppercorn , 1993 ; Duchmann *et al.*, 1995 ; Sartor, 1995).

Chapitre 2

La réaction inflammatoire digestive

SOMMAIRE

Le rôle de la microflore intestinale dans
l'inflammation intestinale

Les cellules et médiateurs de l'inflammation

Hypersensibilité viscérale d'origine inflammatoire

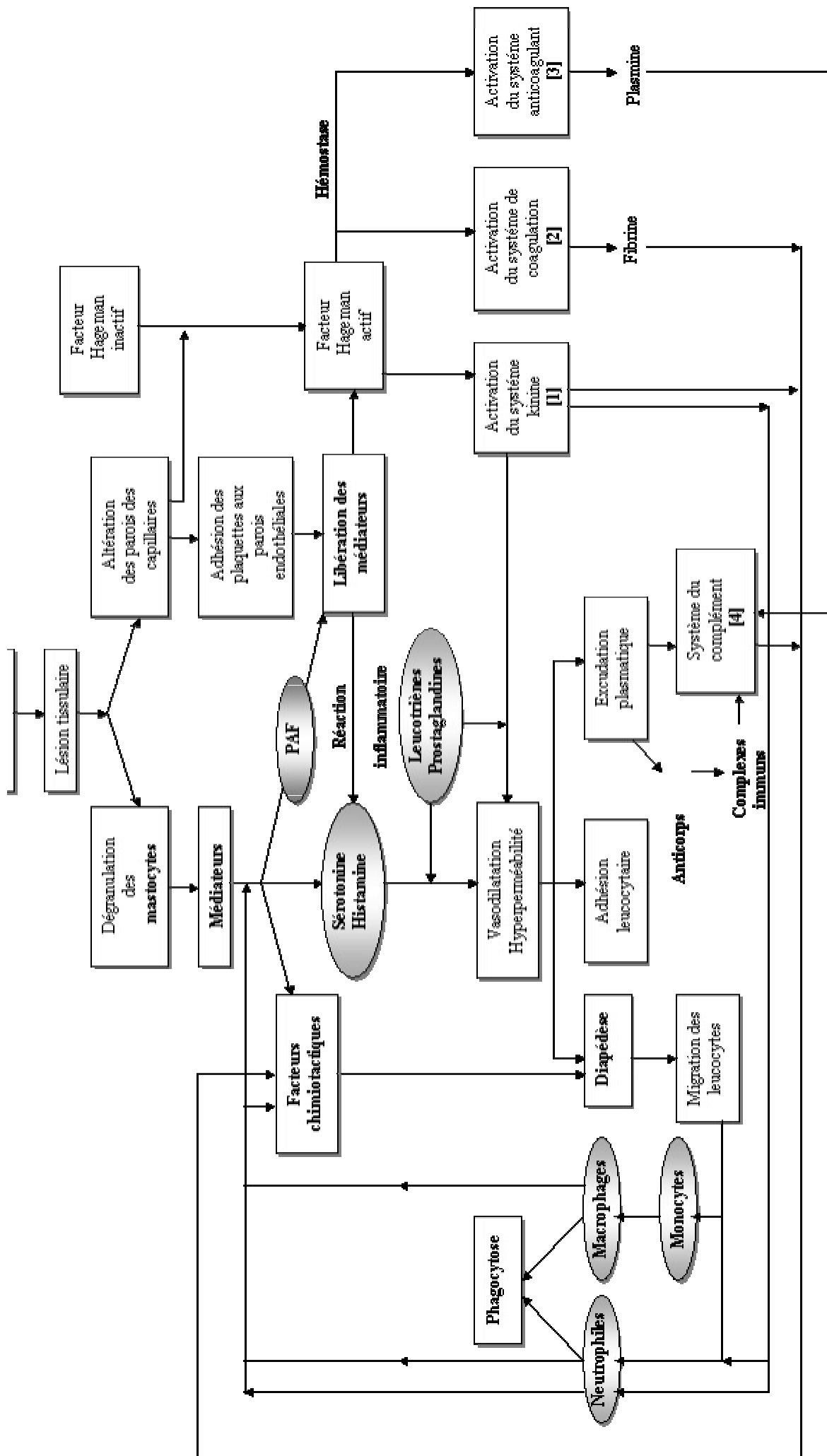


Figure 6 : Schéma des principaux éléments intervenant dans la réaction inflammatoire [d'après Regnault, 1988]. L'agression engendre une cascade d'événements qui conduisent à l'activation des différents éléments de la réponse immunitaire non spécifique dont la réaction inflammatoire constitue l'élément fondamental. Les différents systèmes protéolytiques activés au cours de la réaction inflammatoire sont [1] le système de contact ; [2] le système de coagulation ; [3] le système anticoagulant ; [4] le système du complément.

2

La réaction inflammatoire digestive

L'inflammation est une réaction normale, immédiate et transitoire de défense et d'adaptation de l'organisme vis-à-vis de toute agression compromettant son intégrité (Figure 6) (pour revue voir Regnault, 1988). Au cours d'une agression inflammatoire du tube digestif par exemple, les neutrophiles et monocytes circulants sont attirés sur le lieu de l'inflammation par des facteurs chimiotactiques sécrétés par les cellules immunitaires résidentes. Toutefois lorsque la réaction inflammatoire se perpétue, l'infiltrat inflammatoire est en permanence riche en neutrophiles, monocytes-macrophages et lymphocytes activés. Les médiateurs pro-inflammatoires alors libérés par ces cellules, en particulier les radicaux libres oxygénés et nitrogénés, contribuent à la destruction de l'épithélium et favorisent l'activation de nombreux gènes codant pour les protéines impliquées dans la réponse inflammatoire (pour revue voir Fiocchi, 1998). De telles conditions peuvent être à l'origine de la rupture de la tolérance à l'égard notamment de la microflore endogène qui en retour entretient la stimulation de la réponse immunitaire (Duchmann *et al.*, 1995).

1. Rôle de la microflore intestinale dans l'inflammation digestive

1.1. Chez l'homme

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), comprenant la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH), sont des affections du tube digestif caractérisées par une inflammation chronique et récidivante (pour revues voir Fiocchi, 1998 ; Shanahan, 2001). De nombreux travaux relatent du rôle pro-inflammatoire de certains micro-organismes de la microflore intestinale au cours des MICI (pour revue voir Marteau *et al.*, 2003) et soulignent qu'une activation continue du système immunitaire intestinal contre ces bactéries semble être responsable des rechutes caractéristiques de ce type de pathologie (pour revue voir Caradonna *et al.*, 2000 ; Linskens *et al.*, 2001).

Le rôle de la microflore intestinale dans la réactivité inflammatoire a été souligné à travers des mécanismes tels qu'une réponse immunitaire anormale de l'hôte vis-à-vis de sa microflore et/ou une action de la microflore sur le système immunitaire.

Ainsi, il a été rapporté que les cellules mononuclées isolées de zones coliques lésées, provenant de patients souffrant de MC, s'activent en contact d'une flore autochtone (Duchmann *et al.*, 1995). Cette activation résulterait d'une réactivité immunitaire anormale à la microflore intestinale traduisant une rupture de la tolérance vis-à-vis de cette dernière (Pirzer *et al.*, 1991 ; Duchmann *et al.*, 1995). De plus, une hyperactivation des lymphocytes T intestinaux impliqués dans les lésions inflammatoires a été montrée dans les MICI (Shanahan, 2002).

L'augmentation de l'expression de CD14 sur les macrophages extraits de la lamina propria de côlon lésé, mais aussi de zones coliques saines, provenant de patients atteints de MICI, pourrait également expliquer en partie le rôle de la flore intestinale dans l'initiation et la chronicité des lésions (Grimm *et al.*, 1995). De façon similaire, l'augmentation de l'expression de TLR2 et TLR4 sur les macrophages et les cellules épithéliales intestinales de patients atteints de MC pourrait favoriser la susceptibilité à l'inflammation

induite par les bactéries (Means *et al.*, 2000 ; Cario & Podolsky, 2000 ; Bogunovic *et al.*, 2000).

De plus, les neutrophiles circulants de patients atteints de MC expriment plus de récepteurs de surface aux fMLP (*formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*) que ceux de sujets sains (Anton *et al.*, 1989).

Par ailleurs, on constate à travers la littérature l'existence de modifications de la microflore intestinale en faveur d'une augmentation des bactéries potentiellement pathogènes chez des sujets atteints de MICI par rapport aux sujets sains.

Par exemple, chez les patients atteints de MC on observe (i) une augmentation de la population des entérobactéries (et plus particulièrement des *E. coli*) et des bactéroïdes (et plus particulièrement de *Bacteroides fragilis* et de *Bacteroides vulgatus*) dans la muqueuse iléale, la lumière iléale et colique, ainsi que dans les prélèvements fécaux (Keighley *et al.*, 1978; Peach *et al.*, 1978 ; Van de Merwe *et al.*, 1988 ; Giaffer *et al.*, 1991; Lederman *et al.*, 1997 ; Swidsinski *et al.*, 2002), une augmentation des concentrations fécales de certains cocci Gram positif (*Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Coprococcus*) (Ruseler-Van Embden *et al.*, 1983), (ii) une diminution des lactobacilles et des bifidobactéries au niveau muqueux (Giaffer *et al.*, 1991 ; Favier *et al.*, 1997).

Le rôle initiateur de la flore intestinale dans la MC a toutefois surtout été illustré par les travaux portant sur le modèle de récurrence endoscopique post-opératoire (Harper *et al.*, 1985 ; Rutgeerts *et al.*, 1991).

Les patients atteints de la recto-colite hémorragique (RCH) présentent lors de la phase active (i) une diminution des genres *Bifidobacterium*, *Bacteroidaceae*, *Peptococcaceae*, *Eubacterium* et *Lactobacillus* au niveau de la muqueuse colique (Fabia *et al.*, 1993), (ii) une augmentation des *E. coli* (Hartley, 1992) qui en outre sont capables *in vitro* d'adhérer et d'envahir différents types de cellules intestinales (Giaffer *et al.*, 1992 ; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998 ; Lobo *et al.*, 1993 ; Boudeau *et al.*, 1999).

Enfin, certains antibiotiques sont efficaces dans le traitement de MICI (Sutherland *et al.*, 1991 ; Peppercorn, 1993 ; Spirt *et al.*, 1994 ; Bulois *et al.*, 1999).

1.2. Chez l'animal

La majorité des colites inflammatoires spontanées ou induites chez l'animal, est influencée par la présence d'une flore bactérienne dans la lumière intestinale (Okayasu *et al.*, 1990 ; Yamada *et al.*, 1993 ; Kühn *et al.*, 1993 ; Videla *et al.*, 1994 ; Taurog *et al.*, 1994 ; Sellon *et al.*, 1998).

Dans différents modèles de colite spontanée (rongeurs génétiquement susceptibles), le rôle de la flore entérique dans l'inflammation intestinale a été mis en évidence à travers le fait que l'élevage des animaux dans un environnement stérile les protège de l'inflammation. Par exemple, élevés dans des conditions axéniques, des rats transgéniques HLA-B27 (Taurog *et al.*, 1994), des souris IL-2 déficientes (IL-2^{-/-}) (Sadlack *et al.*, 1993) et des souris IL-10 déficientes (IL-10^{-/-}) (Kühn *et al.*, 1993 ; Sellon *et al.*, 1998) ne développent pas de colite. En revanche, en présence de bactéries, l'activation des macrophages et des cellules Th1 mène à une inflammation chronique dont le degré est directement corrélé avec la "charge" bactérienne. De plus, il semblerait que les bactéries aérobies et anaérobies soient incriminées, mais à des degrés divers. En effet, toutes les bactéries n'ont pas la même capacité à induire une inflammation. De plus, certaines vont agir dans des régions spécifiques ou dans des modèles spécifiques. Ainsi, les rats transgéniques HLA-B27 colonisés par une flore conventionnelle vont rapidement développer une colite sévère, colonisés par *Bacteroides vulgatus* la colite est modérée et *E. coli* n'induit pas de colite (Rath *et al.*, 1999). Des souris IL-10^{-/-} élevées dans un environnement conventionnel développent une inflammation sur l'ensemble de l'intestin qui est létale. En revanche, lorsqu'elles sont élevées dans un environnement SPF (*specific pathogen free*) l'inflammation n'est pas létale et se restreint au côlon. Enfin, la colonisation par *B. vulgatus* n'induit dans ce modèle qu'une légère inflammation (Sellon *et al.*, 1998).

Un pré-traitement par des antibiotiques s'est avéré efficace dans la réduction de l'inflammation intestinale dans plusieurs modèles expérimentaux tels que la colite induite par l'indométhacine (Yamada *et al.*, 1993), la colite induite par le DSS (*dextran sulfate sodium*) (Okayasu *et al.*,

1990) et la colite induite par le TNBS (*trinitrobenzene sulfonic acid*) (Videla *et al.*, 1994).

Dans le modèle de colite induite par le DSS, un traitement antibiotique réduisant les populations de bactéries anaérobies et des entérobactéries a des effets bénéfiques sur la phase aiguë de la colite (Hans *et al.*, 2000). Dans ce modèle, des modifications dans la composition de la microflore intestinale ont en effet été décrites et se traduisent par (i) une augmentation des entérobactéries, *Bacteroides* et *Clostridium* et une diminution des *Eubacterium* et *Enterococcus* chez la souris (Okayasu *et al.*, 1990), (ii) une diminution de la flore totale des anaérobies, des eubactéries et des bifidobactéries et une augmentation des lactobacilles chez le rat (Araki *et al.*, 2001). Cependant, un traitement par voie orale d'antigènes bactériens issus de la flore intestinale anaérobie (*Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium*) prévient la colite aiguë induite par le DSS, alors que l'intensité de la colite n'est pas modifiée après l'administration d'extraits de bactéries aérobies tels que *E. coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* (Verdu *et al.*, 2000). Ces résultats montrent que toutes les bactéries de la flore endogène ne jouent pas le même rôle, et que certaines d'entre elles ont la capacité de limiter l'inflammation induite par le DSS. Ceci est corroboré par une autre étude montrant que le DSS induit une colite de même intensité chez des souris conventionnelles et axéniques, mais que ces dernières manifestent une plus grande sensibilité à la toxicité du DSS et présentent des taux de mortalité très élevés (Bylund-Fellenius *et al.*, 1994).

Dans le modèle de colite induite par le TNBS, il a été montré que plusieurs espèces bactériennes appartenant à la microflore intestinale, incluant les anaérobies, pénètrent dans la paroi colique (Garcia-Lafuente *et al.*, 1997 ; Videla *et al.*, 1994). Chez le rat, cette invasion bactérienne de la muqueuse et de la sous-muqueuse a été observée dès les 24 heures qui ont suivi l'administration du TNBS. L'équipe de Garcia-Lafuente (1997) a développé chez le rat conventionnel un modèle permettant de contrôler la colonisation bactérienne dans un segment colique exclu du transit intestinal.

Après chirurgie, l'anse colique ayant subi une élimination totale de la flore endogène (lavage par antibiotiques), a été recolonisée avec des espèces bactériennes pré-sélectionnées de la flore normale. Les résultats obtenus ont montré que (i) l'anse colique dépourvue de flore ne présente pas de lésions inflammatoires après l'administration du TNBS, ni de changements significatifs dans la libération de médiateurs inflammatoires ou d'accumulation de neutrophiles dans la paroi, (ii) lorsque que l'anse est colonisée (en mono-association) par trois souches de bactéries aérobies de la flore endogène (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* et *Streptococcus viridans*), on assiste alors à une augmentation de la libération de médiateurs inflammatoires et des lésions de la muqueuse, (iii) toutefois, lorsque la colonisation concerne uniquement des souches de bactéries anaérobies de la flore endogène (*Clostridium ramosum*, *Bacteroides fragilis* et *B. uniformis*) les lésions observées sont beaucoup plus profondes (atteignant la sous-muqueuse) que celles observées avec les bactéries aérobies et la libération de médiateurs inflammatoires est beaucoup plus importante. En revanche chez les rats ne recevant pas le TNBS, ces mêmes bactéries anaérobies n'induisent aucun changement histologique ou inflammatoire. Cette étude démontre que les bactéries anaérobies de la flore endogène peuvent induire des lésions profondes associées à une réponse inflammatoire sévère quand la barrière de la muqueuse est rompue par l'instillation du TNBS, et suggère que l'inflammation transmurale soit une conséquence de l'invasion de la muqueuse par les bactéries anaérobies de la flore dominante.

L'inoculation dans la paroi colique de rats (en absence de colite) de différentes souches bactériennes appartenant à la flore dominante de ce dernier a montré que (i) les lactobacilles n'induisent pas d'inflammation, (ii) la plupart des bactéries aérobies provoquent une réaction inflammatoire aiguë sévère et localisée dans les aires d'abcès, (iii) les bactéries anaérobies strictes induisent une réaction inflammatoire aiguë légère mais une infiltration de cellules mononuclées largement diffuse (Mourelle *et al.*, 1998).

Ainsi, la rupture de la barrière intestinale au cours de l'inflammation peut faciliter l'invasion bactérienne du tissu en tant qu'événement secondaire.

Dans ce contexte, une lésion initiale pourrait être perpétuée par une infection bactérienne de la muqueuse endommagée. Par ailleurs, une corrélation positive entre l'augmentation de la perméabilité colique et la sévérité de colites expérimentales induites par l'acide acétique et le TNBS chez le rat a été montrée (Gardiner *et al.*, 1993). Dans le cas de ces colites, une augmentation de bacilles aérobies Gram négatif a également été rapportée (Gardiner *et al.*, 1993). Par ailleurs, l'adhésion d'*E. coli* entéropathogène (EPEC) à des lignées cellulaires épithéliales intestinales est associée à une rupture des jonctions serrées (Spitz *et al.*, 1995).

Le rôle de l'invasion bactérienne dans la paroi colique en tant qu'événement primaire initiant l'inflammation n'est pas élucidé. Toutefois, le rôle de certaines souches bactériennes issues de la flore colique du rat sur la perméabilité colique a été étudié en utilisant le modèle d'anse colique exclu du transit (Garcia-Lafuente *et al.*, 2001). Les résultats de cette étude ont montré que toutes les souches bactériennes testées (en mono-association) n'ont induit aucun changement dans la perméabilité colique aux macromolécules. En revanche, la perméabilité au mannitol a été significativement augmentée après colonisation par *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Streptococcus viridans*. A l'inverse, lorsque que le segment colique est colonisé par *L. brevis*, une réduction de la perméabilité au mannitol est observée. Une mono-association avec *B. fragilis* n'induit quant à elle aucun changement.

1. 3. Translocation bactérienne

La translocation bactérienne depuis le tube digestif est définie comme étant le passage de bactéries viables de la flore gastro-intestinale à travers la lamina propria vers les ganglions mésentériques locaux et de là, vers le foie, la rate et autres organes. Ce processus implique différentes étapes : l'adhérence du micro-organisme à la muqueuse, son passage à travers l'épithélium, le transfert vers les ganglions mésentériques puis la dissémination systémique (pour revue voir Berg, 1995).

1.3.1. Les différentes étapes de la translocation bactérienne

La translocation bactérienne est généralement mise en évidence par la culture à partir des ganglions mésentériques de germes provenant de la lumière intestinale. Les cultures de prélèvements hépatiques, spléniques, de sang portal ou systémique ainsi que pulmonaire sont également pris en compte (Redan *et al.*, 1990 ; Alexander *et al.*, 1991).

La translocation bactérienne survient sur toute la longueur du tractus digestif postpylorique et serait plus importante dans sa partie supérieure (Fukushima *et al.*, 1994). De plus, il apparaît qu'après une agression de la muqueuse, la translocation bactérienne est précoce et survient dans les 30 minutes à 5 heures qui suivent, et que les bactéries vivantes passent plus facilement dans la circulation sanguine que les bactéries mortes (Redan *et al.*, 1990). Toutefois, la majorité d'entre elles est détruite dans les ganglions mésentériques (Alexander *et al.*, 1991).

Le système immunitaire participe également aux mécanismes de la translocation bactérienne. Les cellules M sont capables en effet d'internaliser des agents bactériens (Neutra, 1998) et le relargage des bactéries au pôle basal des cellules épithéliales a plusieurs conséquences : (i) les entérocytes sécrètent des cytokines et des chémokines pro-inflammatoires permettant l'afflux de cellules inflammatoires du sang circulant (Perdue, 1999), (ii) les bactéries en contact avec les cellules présentatrices de l'antigène et les lymphocytes induisent une activation du système immunitaire digestif (pour revue voir Mowat, 2003).

Après leur passage à travers la lamina propria, les bactéries sont transférées vers les sites distaux (ganglions mésentériques, foie, rate). Deux voies de transport vers ces organes sont possibles : la voie lymphatique *via* le canal thoracique ou la voie sanguine portale. La voie lymphatique semble toutefois être la plus importante comme le suggère la plus grande fréquence des cultures positives dans les ganglions mésentériques par rapport au sang portal (Wang *et al.*, 1994).

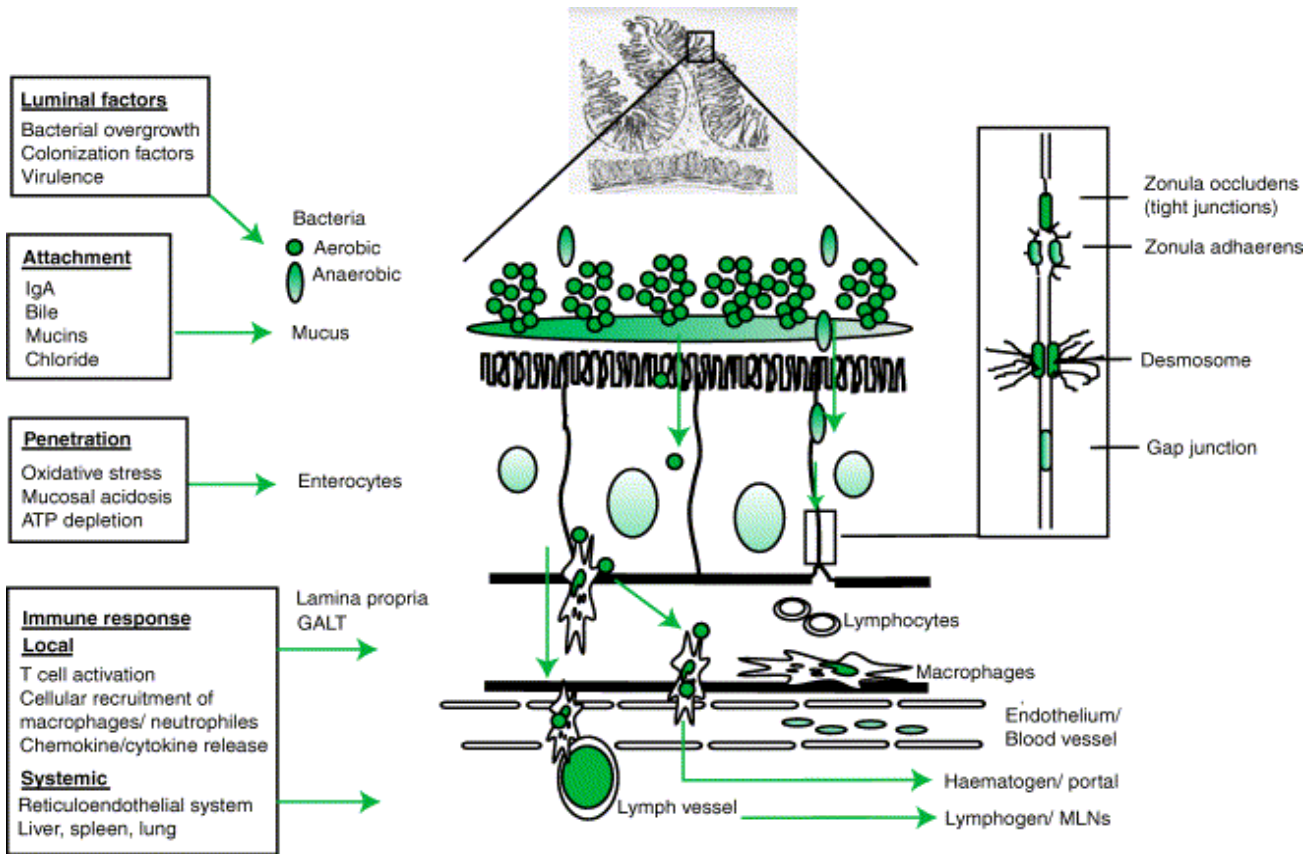


Figure 7 : Facteurs impliqués dans la translocation bactérienne (d'après Wiest & Rath, 2003).

1.3.2. Les facteurs impliqués dans la translocation bactérienne

Les altérations de la barrière muqueuse, de la microflore et de la réponse immunitaire sont les principaux facteurs impliqués dans le phénomène de translocation bactérienne (pour revue voir Berg, 1995 ; Weist & Rath, 2003) (Figure7).

Dans un grand nombre de situations expérimentales la translocation bactérienne est associée à des altérations de la muqueuse intestinale. Toutefois, la relation directe entre translocation bactérienne et lésions de la muqueuse n'est pas parfaitement élucidée. En effet, les bactéries en cours de translocation sont principalement observées dans des entérocytes morphologiquement intacts et sous un aspect histologique normal de la muqueuse (Deitch *et al.*, 1987 ; Fazal *et al.*, 2000). En revanche, des altérations de la sécrétion ou de la composition du mucus facilitent la translocation bactérienne (Katayama *et al.*, 1997).

L'altération de la perméabilité intestinale a également été rapportée dans de nombreuses pathologies digestives chez l'homme tels que les infections intestinales, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou encore les entéropathies induites par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (pour revue voir Bjarnason *et al.*, 1995). Une corrélation positive a été observée entre la perméabilité intestinale et le degré de la pathologie chez les patients atteints de MC (Casellas *et al.*, 1986 ; Wyatt *et al.*, 1993) ou de RCH (Jenkins *et al.*, 1986 ; Gitter *et al.*, 2001). Par ailleurs, chez les patients atteints de MICI une altération des jonctions serrées a été observée (Marin *et al.*, 1983 ; Hollander, 1988 ; Wyatt *et al.*, 1993). Enfin, une translocation des bactéries entériques vers les sites extra-intestinaux a été rapportée chez les patients atteints de RCH (Eade & Brooke 1969) et chez ceux atteints de MC (Ambrose *et al.*, 1984 ; Laffineur *et al.*, 1992).

L'altération de la flore intestinale normale et la pullulation secondaire de certaines bactéries (spécialement des entérobactéries) est un facteur important de la translocation bactérienne (Wiest & Rath, 2003). Les bactéries

qui semblent transloquer le plus rapidement sont celles généralement classifiées en tant que *facultative intracellular pathogen* (Duffy, 2000) c'est-à-dire celles qui sont capables de survivre en dehors des leucocytes sanguins mais qui sont également capables de résister à la phagocytose (telles que les salmonelles). Toutefois, les espèces bactériennes entériques normales sont facilement détruites par phagocytose, survivant seulement dans des circonstances où les défenses de l'hôte sont défectueuses. En outre, seules quelques bactéries entériques sont capables de transloquer dans les ganglions mésentériques telles que : *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* et autres entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, les entérocoques et quelques streptocoques (Wells, 1990). Par ailleurs, il semblerait que la capacité de translocation soit spécifique à certaines souches qui de surcroît, manifestent une plus grande capacité d'adhésion au mucus et d'attachement aux cellules épithéliales que des souches non-pathogènes (Ljungdahl *et al.*, 2000). Ainsi, il a été montré que les bactéries aérobies Gram négatif entérovirulentes adhèrent plus facilement au mucus que les bactéries anaérobies non pathogènes (Beachey, 1981 ; Duffy *et al.*, 1994). De plus, l'endommagement de la muqueuse iléo-cæcale liée à l'adhésion de bactéries entérovirulentes, se traduit par une augmentation de la perméabilité iléale et une translocation bactérienne vers les ganglions mésentériques chez le rat (Alverdy & Aoys, 1992) et chez la souris Balb-c (Duffy *et al.*, 1997).

Par ailleurs, bien que le nombre de bactéries anaérobies soit 100 à 1000 fois supérieur à celui des bactéries aérobies et bien qu'elles soient attachées aux cellules épithéliales (Wells *et al.*, 1987), la translocation de bactéries anaérobies n'est observée que dans des conditions extrêmes telle que la rupture de l'intégrité de la barrière intestinale. Dans de tels cas, les bactéries anaérobies transloquent proportionnellement au degré d'endommagement tissulaire (Wells, 1990). A l'inverse, les bacilles aérobies Gram négatif peuvent transloquer aisément même à travers un épithélium intact (Wells *et al.*, 1987; Wells, 1990).

En conditions physiologiques les anaérobies agissent comme un "tapis" à la surface de la muqueuse et limitent la croissance et l'adhésion d'autres bactéries potentiellement invasives (Wells *et al.*, 1987). En conséquence,

l'élimination sélective par antibiothérapie des bactéries anaérobies facilite la croissance et la translocation des bactéries facultatives dans l'intestin (Wells *et al.*, 1987). En outre, il y a une corrélation directe entre la densité d'une souche bactérienne luminale donnée et le nombre de bactéries viables de cette même souche présent dans les ganglions mésentériques (Steffen & Berg, 1983).

Deux types d'altération de la défense immunitaire sont associés à la translocation bactérienne : les altérations des fonctions T cellulaires et les altérations de la sécrétion des IgA au niveau du tube digestif.

La déplétion en cellules CD4+ et CD8+ ou en macrophages augmente la translocation bactérienne de certaines bactéries intestinales telle qu'*E. coli* (Gautreaux *et al.*, 1994). De même, l'injection de facteurs stimulant la croissance des macrophages (rmGM-CSF) ou des polynucléaires entraînent moins de translocation bactérienne et plus de lyse bactérienne (Gennari *et al.*, 1994 ; Eaves-Pyles & Alexander 1996 ; Paksoy *et al.*, 1997).

Il a été rapporté *in vitro* que la fréquence de la translocation bactérienne était inversement proportionnelle à la concentration des IgA dans la lumière digestive (Albanese *et al.*, 1994 ; Diebel *et al.*, 1997). En effet, les IgA en recouvrant les bactéries intestinales diminuent leur adhésion à la muqueuse digestive (DeWitt & Kudsk, 1999) et préviennent leur passage transépithélial à travers un segment de tissu intestinal morphologiquement intact (Albanese *et al.*, 1994).

2. Les cellules et les médiateurs de l'inflammation

2.1. Les cellules de l'inflammation

Différents types de cellules immunitaires participent à la réaction inflammatoire en libérant un large spectre de médiateurs aux propriétés pro-inflammatoires. Parmi ces cellules on compte : les polynucléaires, les monocytes/macrophages, les mastocytes et les lymphocytes dont nous ne donnerons ici qu'une présentation très sommaire.

Eicosanoides	PAF LTB4	<i>platelet activating factor</i> <i>leucotriène B4</i>
Cytokines	GM-CSF IL-6 PDGF TNF- α	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> <i>interleukine 6</i> <i>platelet derived growth factor</i> <i>tumor necrosis factor α</i>
Chémokines CC	MIP-1 α MIP-2 PF-4	<i>macrophage inflammatory protein 1 a,</i> " 2 <i>platelet factor 4</i>
Chémokines CXC	IL-8 ENA-78 GRO- α NAP-1 NAP-2 NAP-3 MGSA	<i>interleukine 8</i> <i>epithelium derived neutrophil activating peptide</i> <i>growth related oncogene a</i> <i>neutrophil attracting protein-1,</i> " -2, " -3 <i>melanoma growth stimulating activity</i>
Peptides bactériens	LPS fMLP	Lipolysaccharides Peptide N-formylés
Facteurs du complément	C5a	

Tableau I : Facteurs chimiotactiques des polynucléaires neutrophiles (d'après Sampson, 2000).

2.1.1. Les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles représentent 50 à 75 % des leucocytes sanguins (Ford Bainton, 1992). En conditions physiologiques, ils sont distribués en quantité égale selon deux formes : circulants ou fixés à l'endothélium vasculaire. Ces derniers sont les premiers recrutés lors de l'inflammation. Leur infiltration par diapédèse dans le foyer inflammatoire est induite par certains médiateurs inflammatoires (Tableau I) tels que les éicosanoïdes (PAF: *platelet activating factor*, LTB₄ : leucotriène B₄), les cytokines, les chémokines et certains métabolites bactériens tels que le LPS et le fMLP (Sampson, 2000).

A l'état mature ces cellules contiennent deux types de granules sécrétoires, dont les granules azurophiles qui contiennent des enzymes lytiques (Roos, 1992). Ces enzymes sont libérées lors du processus de phagocytose et participent à l'éviction des corps phagocytés. Les neutrophiles peuvent également générer, lors du stress oxydatif, des radicaux libres qui ont une action toxique pour de nombreux pathogènes (bactéries, virus, parasites), suite à l'activation de la NADPH-oxydase et la sécrétion de la myéloperoxydase (Roos, 1992). Ainsi, le métabolisme oxydatif des neutrophiles activés va se traduire par la libération d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi que de substances toxiques à haut pouvoir microbicide tels que l'acide hypochloreux (HOCl) ou les N-chloramines (pour revue voir Grisham & Granger, 1988). De plus, les neutrophiles ont la capacité, par le biais de leur lipo- et cyclo-oxygénases, de métaboliser l'acide arachidonique libérant de ce fait certains médiateurs lipidiques (LTB₄, PAF) qui ont un rôle important dans le déroulement du processus inflammatoire (Issekutz, 1984). Enfin, ils synthétisent également mais à des taux relativement faibles certaines cytokines (IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ ...), toutefois les quantités produites localement dans un site inflammatoire où les polynucléaires neutrophiles sont majoritaires, peuvent être biologiquement significatives (Lloyd & Oppenheim, 1992 ; Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

2.1.2. Les monocytes et macrophages

Les monocytes représentent 2 à 10 % des leucocytes sanguins. Après leur libération par la moelle osseuse, les monocytes circulent dans le sang et traversent l'endothélium vasculaire pour atteindre les tissus où ils se différencient en macrophages résidents (pour revue voir Regnault, 1988). En conditions inflammatoires, les monocytes attirés sur le site de l'inflammation vont donner naissance à des macrophages immatures dont le rôle est d'éliminer au niveau du site inflammatoire des particules plus ou moins volumineuses selon le processus de macrophagocytose. Les macrophages possèdent des récepteurs de chimiotactisme et des récepteurs de surface pour les IgG, IgE, les fractions du complément, les cytokines et les facteurs de croissance. Par l'intermédiaire de ces récepteurs, les macrophages fixent les particules étrangères et les phagocytent. Après l'ingestion de l'agent pathogène ou de ses débris, les macrophages présentent l'antigène aux cellules immunocompétentes : les lymphocytes T.

Une fois activés, les macrophages possèdent un fort pouvoir cytotoxique et bactéricide grâce aux enzymes de dégradation (hydrolases, lipoprotéine lipase, lysosyme, collagénase,...) contenues dans leurs vésicules lysosomiales mais aussi grâce à la libération des radicaux libres oxygénés et des médiateurs lipidiques inflammatoires issus du métabolisme de l'acide arachidonique (Brade, 1980 ; Takemura & Werb, 1984). Ils sécrètent également de nombreux médiateurs tels que les cytokines (IL-1, IL-6, TNF), des facteurs chimioattractifs pour d'autres immunocytes (tels que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes), et des agents stimulant la dégranulation des mastocytes (Brade, 1980 ; Takemura & Werb, 1984).

2.1.3. Les mastocytes.

Dans les conditions physiologiques, les mastocytes différenciés existent exclusivement dans les tissus et leur nombre reste constant. Ils sont le plus

Médiateurs	Effets physiologiques possibles
Pré-formés	
Arylsulfatases	Hydrolyse des lipides et protéoglycanes
Facteurs chimiotactiques	Infiltration des leucocytes
Chymase	Lésions, douleur, métabolisme de l'angiotensine I et des kinines
Cytokines (IL-1,2,3,4,5 et 6, GM-CSF, INF- γ , MIF, TNF- α)	Lésions, chimiotaxie des leucocytes, douleur
Enképhalines	Contrôle de la douleur
Héparine	Angiogenèse, stabilisation du facteur de croissance
Histamine	Vasodilatation, angiogenèse, mitogenèse, douleur
Sérotonine	Vasoconstriction, douleur
Kinines	Vasodilatation, douleur
Kinogénases	Synthèse de kinines vasodilatatrices, douleur
Somatostatine	Régulation de la sécrétion des médiateurs
Tryptase	Lésions, douleur, process des neutrophiles
Peptide vasoactif intestinal (VIP)	Vasodilatation, douleur
Néo-formés	
Leukotriènes B4 (LTB4)	Chimiotaxie des leukocytes
Leukotriènes C4 (LTC4)	Bronchoconstriction, douleur
Monoxyde d'azote (NO)	Vasodilatation
Facteur d'activation plaquettaire (PAF)	Activation des plaquettes, bronchoconstriction
Prostaglandine D2 (PGD2)	Vasodilatation, douleur

Tableau II : Effets des médiateurs libérés par les mastocyte (d'après Theoharides, 1996).

souvent agrégés autour des nerfs, des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques (Metcalfé *et al.*, 1997).

Chez les rongeurs, deux populations de mastocytes ont été décrites : les mastocytes péritonéaux ou *connective tissue mast cell* (CTMC) et les mastocytes muqueux ou *mucosal mast cell* (MMC). Ces derniers prédominent dans l'intestin grêle, le cæcum et le côlon (Furgal & Litwin, 1998 ; Saavedra-Delgado *et al.*, 1989). Leur maturation est dépendante de facteurs T-lymphocytaires, contrairement aux CTMC. Au cours de la RCH (Balazs *et al.*, 1986) ou de la MC (Dvorak *et al.*, 1980), ils peuvent subir une hyperplasie importante, jouant ainsi un rôle important dans les processus inflammatoires digestifs. Par ailleurs, les mastocytes sont des acteurs privilégiés dans la relation neuro-immunitaire de l'inflammation (Stenton *et al.*, 1998) en raison de leur présence à proximité des terminaisons nerveuses du système nerveux entérique (Stead *et al.*, 1989) et de la présence à leur surface de récepteurs à la substance P. Cette dernière est un neuromédiateur pouvant induire la dégranulation des mastocytes (Deviller *et al.*, 1985). Les mastocytes sont en effet susceptibles, après dégranulation induite par des stimuli de diverses natures (Théoharides, 1996), de libérer une large variété de médiateurs appartenant à deux catégories (Tableau II) : les médiateurs préformés et que l'on retrouve dans la circulation sanguine après leur libération (i.e. histamine, sérotonine, facteurs chimiotactiques des neutrophiles et éosinophiles...), et les médiateurs néo-formés qui ne sont présents qu'après activation des cellules mastocytaires (i.e. certains métabolites de l'acide arachidonique, le PAF, le monoxyde d'azote et les cytokines) (pour revue voir Metcalfé *et al.*, 1997).

2.1.4. Les lymphocytes

Les lymphocytes représentent 20 à 40 % des leucocytes sanguins dont on distingue deux catégories : les lymphocytes T responsables de l'immunité à médiation cellulaire et les lymphocytes B dont la fonction principale est de produire des anticorps et de participer à la réponse immunitaire humorale.

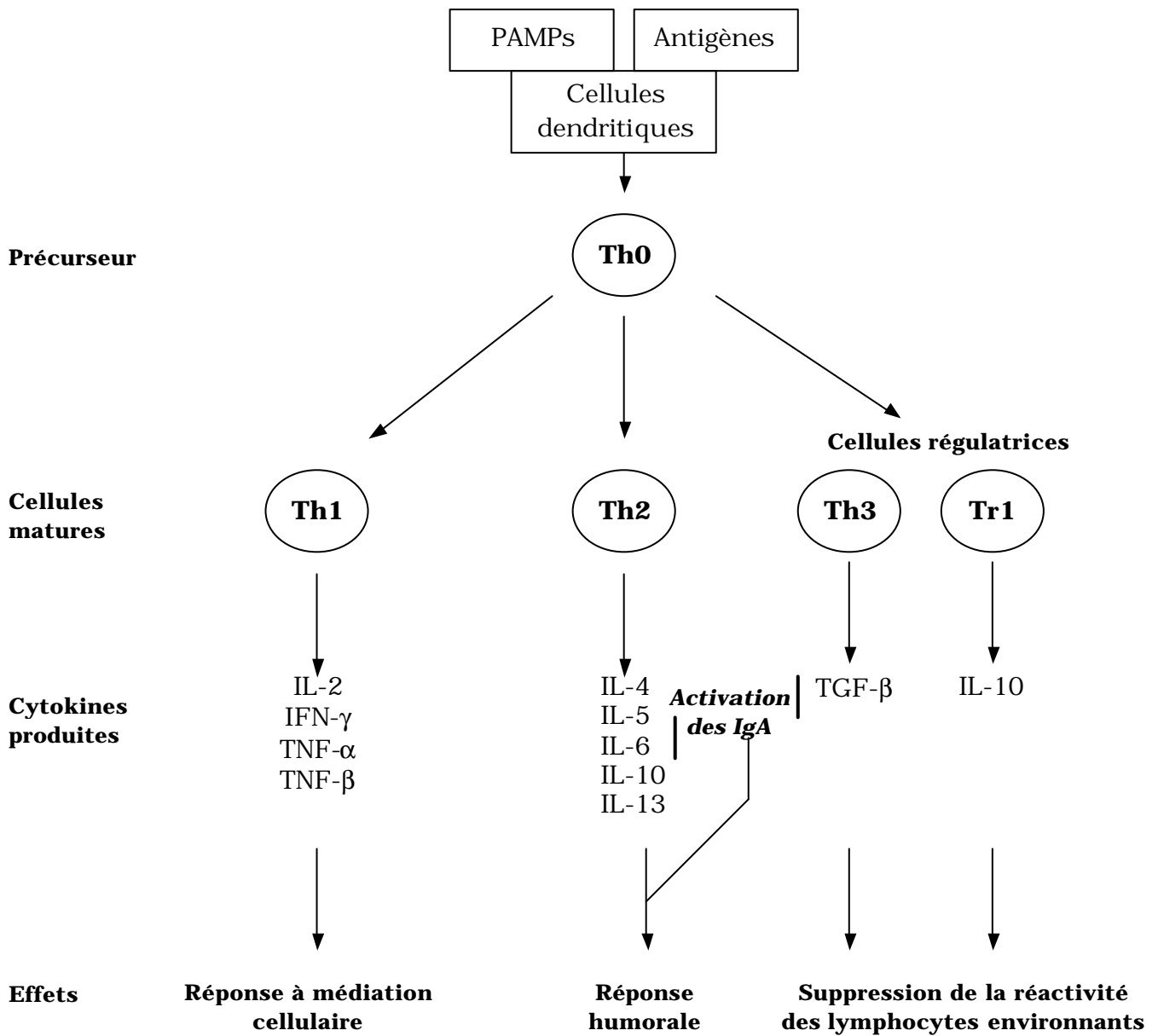


Figure 8 : Schéma de la différenciation des cellules T naïves

Ces deux lignées cellulaires sont caractérisées par une différenciation cellulaire en deux phases : la première dite centrale et la seconde dite périphérique. La phase centrale de différenciation est irréversible et faiblement dépendante de l'environnement en général. Elle a lieu dans le thymus pour les lymphocytes T et dans la moelle osseuse pour les lymphocytes B. Cette différenciation aboutit à l'expression membranaire des récepteurs antagoniques (TcR pour les lymphocytes T et BcR pour les lymphocytes B). Après maturation, les lymphocytes migrent dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, tissus lymphoïdes diffus) où se déroule la phase périphérique. Celle-ci dépend d'un signal induit par l'interaction du TcR avec un peptide associé à une molécule du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) et du BcR avec l'épitope de l'antigène.

Dans la circulation sanguine la majorité des lymphocytes sont de type T (70 à 80 % dont 60 à 80 % sont des lymphocytes T CD4+). Après activation les lymphocytes T se différencient en plusieurs types cellulaires :

- les lymphocytes CD4+ ou T helper ou cellules T coopérantes (Th0, Th1, Th2) qui produisent des cytokines, des lymphokines et stimulent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps (Figure 8),

- les lymphocytes CD8+ dont on distingue les lymphocytes T cytotoxiques qui détruisent les cellules tumorales et les cellules hôtes infectées par des pathogènes et les lymphocytes T suppresseurs qui ont pour rôle d'inhiber la réponse des lymphocytes B et T.

2.2. Les médiateurs de l'inflammation

Les médiateurs participant à la genèse et à l'entretien de la réponse inflammatoire incluent principalement les médiateurs lipidiques, les cytokines, les radicaux libres oxygénés et nitrogénés. De façon non exhaustive, l'origine et les effets physiologiques de quelques-uns de ces médiateurs seront décrites, et une attention plus particulière sera portée sur le monoxyde d'azote.

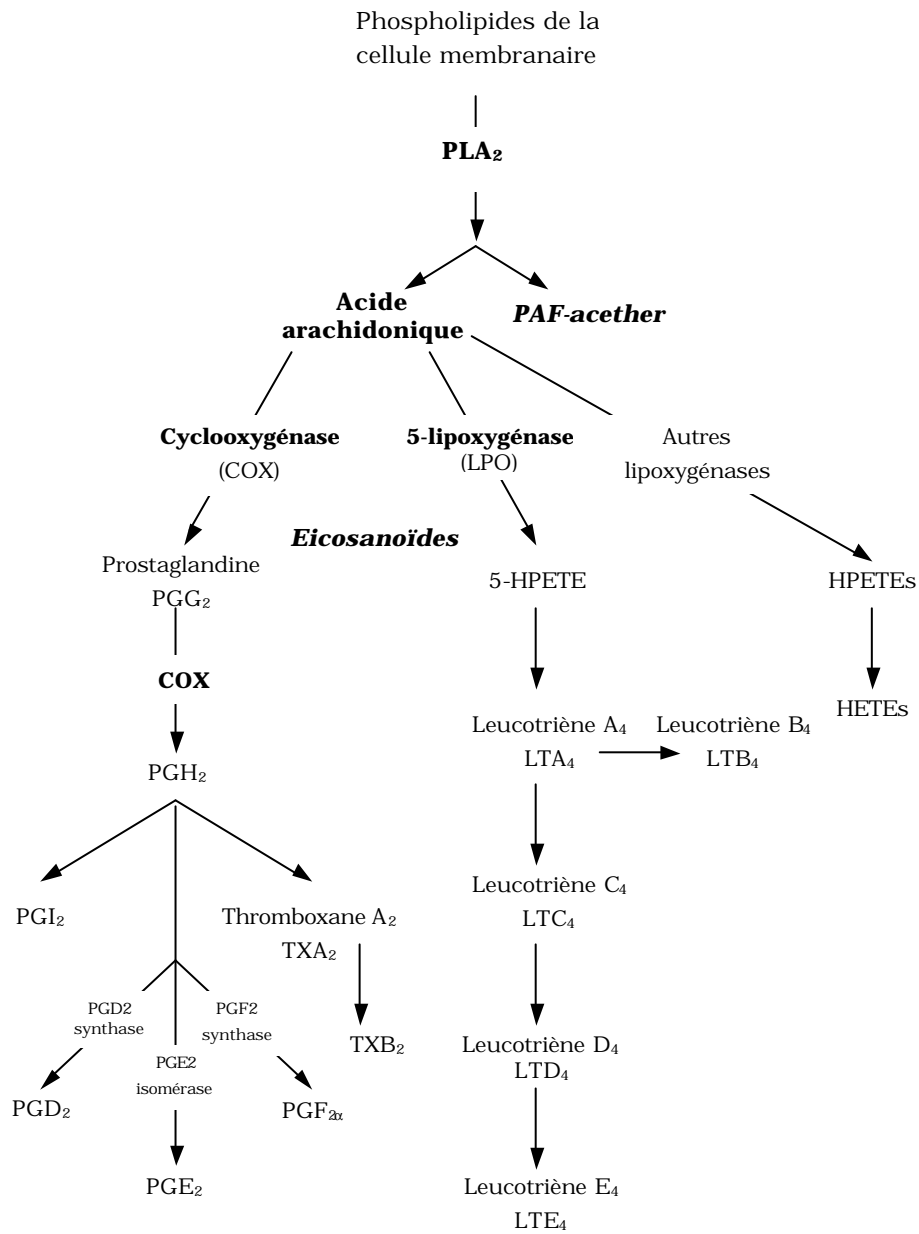


Figure 9 : Schéma du métabolisme de l'acide arachidonique.

2.2.1. Les médiateurs lipidiques

Au cours des processus inflammatoires, suite à l'activation des cellules de l'inflammation, on assiste à l'hydrolyse des phospholipides membranaires (via la phospholipase 2 PLA₂) et à la formation de l'acide arachidonique et de lysophospholipides. Les dérivés de ces molécules constituent les médiateurs lipidiques de l'inflammation : les éicosanoïdes (prostanoides et leucotriènes) et le PAF-acéther (Figure 9).

La production des prostanoides (PGs) est catalysée par les cyclooxygénases (COXs) et regroupent deux types de métabolites de l'acide arachidonique : les prostaglandines et les thromboxanes.

La COX₁ (forme constitutive des COXs) est présente dans presque tous les tissus et organes en conditions basales. De plus, outre le tractus digestif, un des sites importants de l'action de la COX₁ se situe au sein des plaquettes sanguines dans lesquelles elle induit la synthèse de précurseurs des thromboxanes (Williams & Dubois, 1996). A l'inverse, la COX₂ (forme inductible) est spécifiquement exprimée en conditions inflammatoires (Seibert *et al.*, 1994) par les cellules et tissus inflammatoires, et agirait préférentiellement pendant la réaction inflammatoire (pour revue voir Vane *et al.*, 1998 ; Mitchell & Warner, 1999). Son expression et sa biosynthèse sont en effet modulées par les cytokines pro-inflammatoires (Raz *et al.*, 1998) et des facteurs de transcription dont le facteur nucléaire NF- κ B (Schmid & Adler, 2000). D'après la littérature (Williams & Dubois, 1996), il semblerait que la COX₂ puisse également être exprimée de manière "constitutive" au niveau du tractus digestif (Zimmerman *et al.*, 1998). Cette expression constitutive serait le résultat de lésions superficielles ou d'infections légères ayant lieu sans l'apparition d'aucun symptôme. Dans ce cas de figure, l'expression de la COX₂ aurait une fonction similaire à celle de la COX₁ à savoir : une protection de la muqueuse contre les lésions. D'autres études ont proposé un effet cicatriciel des prostanoides issues de la COX₂ lors d'inflammations gastro-intestinales expérimentales (Reuter *et al.*, 1996 ; Mizuno *et al.*, 1997 ; Ukawa *et al.*, 1998). Néanmoins, l'hypothèse la plus

	COX constitutive (COX₁)	COX inducible (COX₂)
Localisation	Presque tous les types cellulaires	
Fonction	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cytoprotectrice ✓ Maintien de l'intégrité de l'épithélium gastro-intestinal ✓ Vasodilatation de la muqueuse gastro-intestinale ✓ Inhibition de l'adhérence des neutrophiles ✓ Stimulation de la survie des cellules souches des cryptes et leur prolifération ✓ Régulation de l'homéostasie 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pro-inflammatoire ✓ Oedème, fièvre, douleur ✓ Stimulation de la sécrétion de Cl⁻ au niveau de l'épithélium intestinal ✓ Cicatrisation tissulaire
Autres caractéristiques	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Incapable d'utiliser l'acide arachidonique endogène dans les cellules immunitaires et fibroblastes 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Capable d'utiliser l'acide arachidonique endogène dans les cellules immunitaires et fibroblastes

Tableau III : Caractéristiques de différentes cyclooxygénases (d'après Wallace & Ma, 2001)

vraisemblable est que l'activité COX₂ serait délétère lorsqu'elle continue à produire des prostanoïdes de façon prolongée dans le temps. Par conséquent, d'une manière générale, on peut considérer que les prostaglandines dérivant de la COX₁ apportent une contribution importante dans la défense de la muqueuse gastro-intestinale, alors que les prostaglandines issues de la COX₂ jouent un rôle important dans l'inflammation, mais aussi dans la douleur associée (Tableau III) (Wallace & Ma, 2001).

Il a été rapporté que les prostaglandines et plus particulièrement la PGE₂ et la prostacycline PGI₂, modulent la réponse inflammatoire par des mécanismes paracrines et autocrines (Dubois *et al.*, 1998). Par exemple, elles augmentent la perméabilité vasculaire et sont de puissants chimioattracteurs pour les polynucléaires neutrophiles (Crunkhorn & Willis, 1969). Elles sont également impliquées dans la douleur inflammatoire en sensibilisant les nocicepteurs des terminaisons nerveuses afférentes à d'autres médiateurs (histamine, bradykinine, substance P, sérotonine) (Moncada *et al.*, 1978).

Les leucotriènes (LTs) sont issus du métabolisme de l'acide arachidonique en présence de la 5-lipoxygénase (Figure 9). On distingue ensuite deux types de composés le LTB₄ principalement synthétisé par les polynucléaires neutrophiles, et les peptido-leucotriènes (LTC₄, LTD₄, LTE₄) principalement libérés par les mastocytes (Wallace & Chin, 1997).

Le LTB₄ a été décrit comme médiateur pro-inflammatoire induisant la chimiotaxie des polynucléaires neutrophiles, leur agrégation aux parois des cellules endothéliales et leur dégranulation (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980 ; Palmblad *et al.*, 1981). De plus, il stimule la libération de métabolites oxygénés radicalaires par ces cellules (Wallace & Chin, 1997). Le LTB₄ est également un agent chimioattracteur pour les monocytes (Smith *et al.*, 1980), il permet l'activation des lymphocytes T suppresseurs et augmente la production d'IgG par les lymphocytes B (Samuelson & Claesson, 1990 ; Rola-Pleszczynski *et al.*, 1982).

Le lyso-PAF, formé sous l'action de la PLA₂ à partir des phospholipides membranaires est ensuite transformé en PAF-acéther sous l'action d'une

acétyl-co-transférase. Un grand nombre de cellules et notamment les cellules de l'inflammation (polynucléaires neutrophiles, basophiles, éosinophiles, monocytes, macrophages, mastocytes) produisent du PAF lorsqu'elles sont stimulées. Celui-ci contribue à l'amplification de la réaction inflammatoire à travers ses propriétés vasoactives (vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire) et de ses propriétés chimiotactiques (agrégation plaquettaire et leucocytaire) (Rosam *et al.*, 1986). En outre, le PAF joue un rôle dans différentes pathologies digestives (entérocrites nécrosantes, maladie de Crohn, ulcère gastrique) (Travis & Jewell, 1994 ; Ewer, 2002).

2.2.2. Les cytokines

Les cytokines sont exprimées à l'état physiologique dans la muqueuse intestinale. Trois groupes ont été caractérisés : les cytokines inflammatoires, les cytokines anti-inflammatoires et les cytokines immunorégulatrices. Ces dernières sont classées en deux types Th1 (représentées par l'IL-2 et l'INF- γ) et Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) et interviennent dans (i) la susceptibilité et la résistance aux agents infectieux (Th1 et Th2), (ii) les mécanismes allergiques (Th2), (iii) la régulation des cytokines inflammatoires. La balance entre les cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- α) et les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10 et TGF- β) gère localement l'intensité et la durée de la réaction inflammatoire et peut-être également à l'origine de l'augmentation de la synthèse de protéines inflammatoires.

Certaines cytokines produites au cours de la réaction inflammatoire induisent la libération de médiateurs de l'inflammation tels que les médiateurs lipidiques, les radicaux libres et agissent sur les phases vasculaires et cellulaires de l'inflammation.

L'interleukine-1 β (IL-1 β) et le *tumor necrosis factor*- α (TNF- α) constituent les deux principales cytokines impliquées dans la réaction inflammatoire (Sartor, 1991 ; Cavillon, 1993). Ces deux cytokines sont essentiellement produites par les cellules mononuclées dans la muqueuse de patients atteints

de MICI (Mahida *et al.*, 1989 ; Ligumsky *et al.*, 1990 ; Pullman *et al.*, 1992). Elles induisent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales qui vont permettre l'adhésion des leucocytes circulants et leur passage vers les foyers inflammatoires. Elles favorisent particulièrement la production de prostaglandines en induisant à la fois la synthèse de la PLA₂ (Vadas *et al.*, 1991 ; Hulkower *et al.*, 1994), de la COX₂ (Raz *et al.*, 1988 ; Angel *et al.*, 1994) et la production de l'anion superoxyde en activant les polynucléaires neutrophiles, les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales (Ferrante *et al.*, 1988 ; Meier *et al.*, 1989).

Les cytokines anti-inflammatoires jouent un rôle important dans la régulation physiologique de l'inflammation en régulant la synthèse des cytokines inflammatoires.

L'IL-4 synthétisée par les lymphocytes T inhibe la production d'IL-1 β et de TNF- α par les monocytes et macrophages activés (Esser *et al.*, 1989 ; Donnelly *et al.*, 1990).

L'IL-10 inhibe les principales fonctions des monocytes et macrophages activés (Fiorentino *et al.*, 1991 ; Ralph *et al.*, 1992 ; Oswald *et al.*, 1992) et diminue la production d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α synthétisés par ces cellules (Fiorentino *et al.*, 1991 ; Bogdan *et al.*, 1991 ; Ralph *et al.*, 1992 ; de Waal Malefyt *et al.*, 1991) et celle du monoxyde d'azote (de Waal Malefyt *et al.*, 1993).

Le TGF- β inhibe la production d'IL-1 β et de TNF- α par les macrophages activés et diminue la production d'anion superoxyde et de monoxyde d'azote (Cavaillon, 1993).

2.2.3. Les dérivés réactifs de l'oxygène

La chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle capital dans la cellule en étant responsable de la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Toutefois, la conséquence de cette réaction est double. En effet, d'une part elle fournit de l'énergie à la cellule sous forme d'ATP, mais d'autre part elle produit en

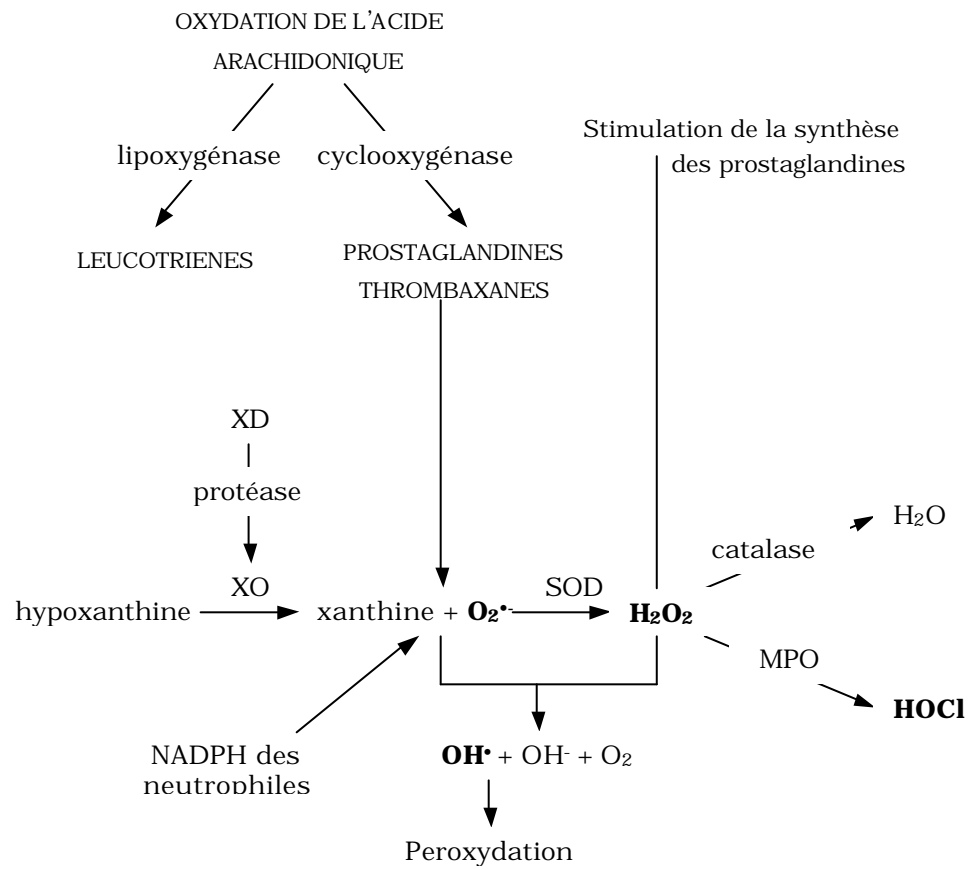


Figure 10 : Sources potentielles de superoxyde et transformation du peroxyde d'hydrogène (d'après Parks & Granger, 1983 ; Keshavarzian *et al.*, 1992)

parallèle des espèces oxygénées activées (EOA) particulièrement réactives voire toxiques, dont font partie les radicaux libres (RLO). Ces dernières sont également issues du métabolisme cellulaire normal dans le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et le cytoplasme. Au cours de ces réactions de réduction, le transfert d'un électron à l'oxygène moléculaire va générer le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), transformé entre autre sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (espèce non radicalaire mais toxique en raison de son pouvoir oxydant). Par addition de nouveaux électrons le H_2O_2 donne le radical hydroxyl (OH^{\bullet}) qui est l'espèce radicalaire la plus réactive et la plus oxydante. D'autres réactions chimiques telle que l'oxydation de H_2O_2 par la myéloperoxydase granulocytaire conduit à la formation d'acide hypochloreux (HOCl) et d'oxygène singleton ($O_2^1\Delta G$). Lors de la réponse inflammatoire, les leucocytes activés par les cytokines pro-inflammatoires libèrent de l' $O_2^{\bullet-}$ sous l'action de la NADPH oxydase (Figure 10). Ces dérivés réactifs de l'oxygène sont dotés de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où ils sont produits, avec toute une série de substrats. Leur activité principale est de participer à la fonction microbicide des cellules phagocytaires à travers un phénomène qualifié de stress respiratoire (Allen, 1979), mais sont aussi à l'origine des lésions tissulaires. En activant le facteur nucléaire NF- κ B, les RLO favorisent la libération de cytokines et de chémokines exacerbant l'inflammation et conduisant à la destruction de l'épithélium (Schmidt *et al.*, 1995 ; Kaul & Forman, 2000). Pour se protéger contre cet effet toxique de l'oxygène, l'organisme a développé différents systèmes de défense anti-radicalaires : (i) ceux qui tendent à empêcher la production des RLO (catalase et glutathion peroxydase), (ii) ceux destinés à éliminer les RLO après leur formation (SOD, vitamines A, E et C, glutathion cellulaire...), (iii) ceux chargés de réparer les dommages causés par les RLO.

Un stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants (EOA) et des systèmes de défense anti-oxydants, avec comme conséquence, l'apparition de dommages souvent irréversibles pour la cellule (Sies, 1991).

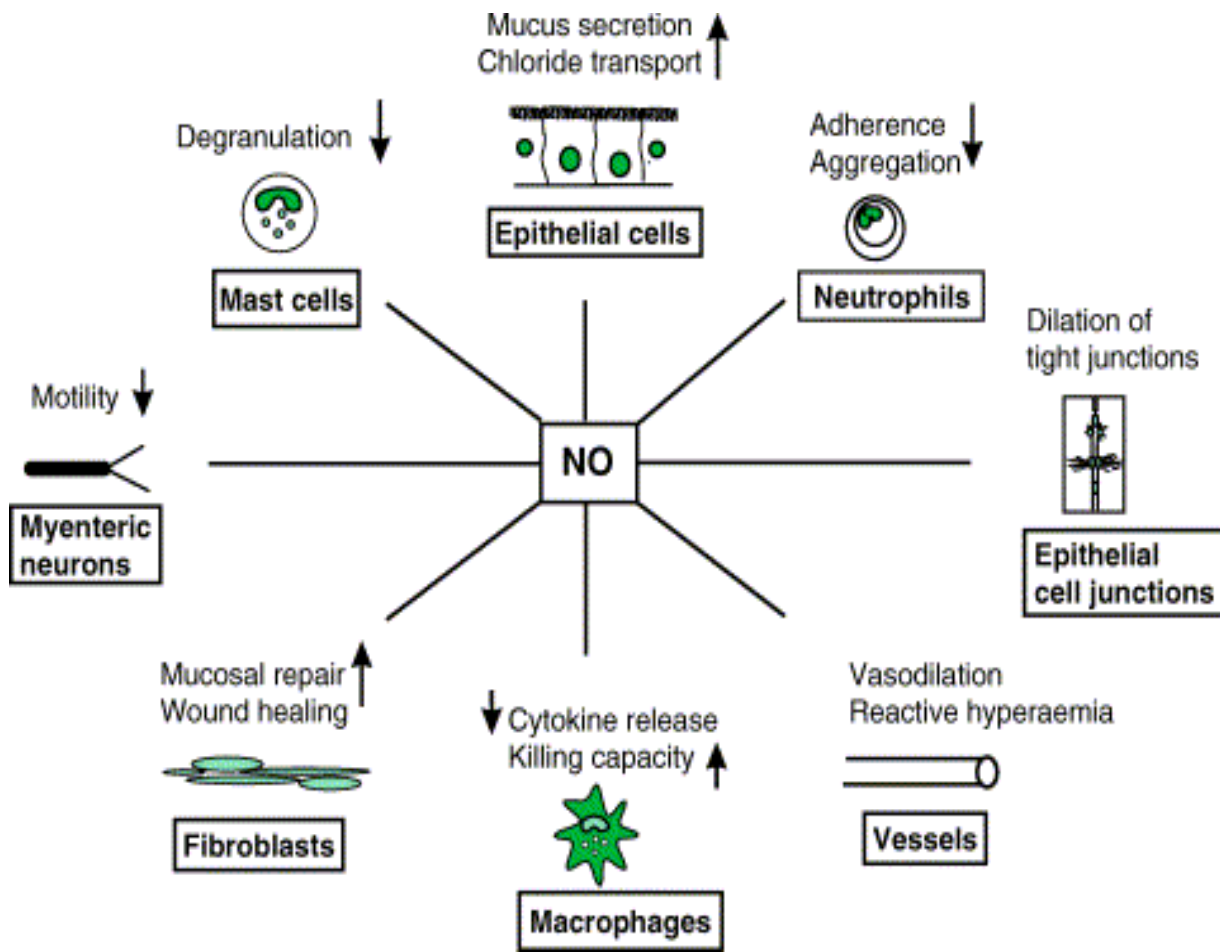


Figure 11 : Schéma des voies d'action du NO dans la défense de la muqueuse digestive (d'après Wiest & Rath, 2001 adapté d'après Wallace & Miller, 2000)

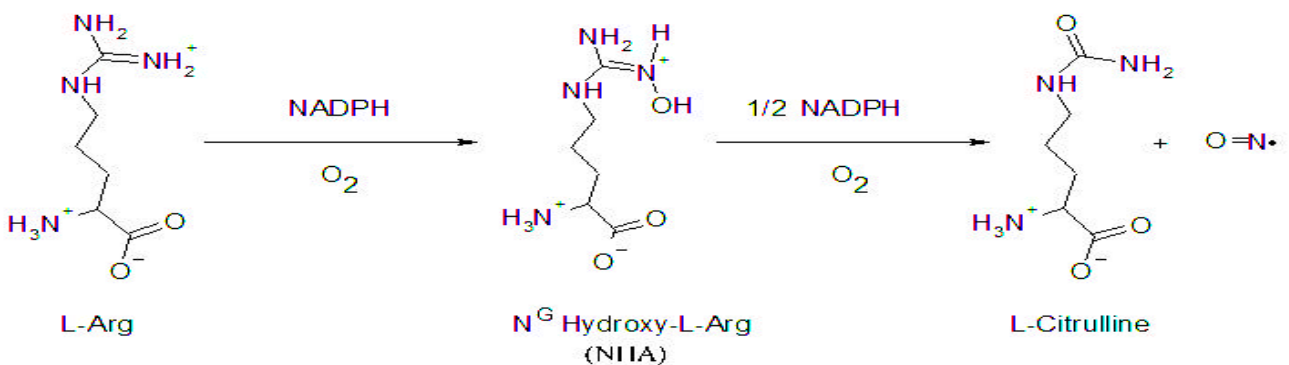


Figure 12 : Formation de monoxyde d'azote à partir de la catalyse de la L-arginine par les NOS

Le stress oxydant rapporté au cours des MICI (Grisham, 1994 ; Jourd'heuil *et al.*, 1997) se traduit par une augmentation de la formation de RLO au niveau de la muqueuse intestinale lésée de ces patients (Keshavarzian *et al.*, 1992 ; Simmons *et al.*, 1992) et une diminution de la capacité des systèmes de défense (Buffinton & Doe, 1995 ; Lih-Brody *et al.*, 1996 ; Geerling *et al.*, 1999). Ainsi, une diminution des concentrations en SOD, en glutathion et en catalase (Mulder *et al.*, 1991 ; Buffinton & Doe, 1995 ; Sido *et al.*, 1998) a été observée. Enfin, des carences en cofacteurs des enzymes anti-oxydantes au cours des MICI ont également été rapportées (Reimund *et al.*, 2000).

2.3. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz radicalaire, lipophile qui a été décrit comme étant un médiateur jouant un rôle prépondérant dans la régulation de l'homéostasie de nombreux systèmes biologiques (cardiovasculaire, nerveux, génito-urinaire, digestif, immunitaire). Au niveau du tube digestif, le NO participe à de nombreux processus tant physiologiques que physiopathologiques (Figure 11).

2.3.1. Synthèse du NO

Le NO est synthétisé par les NO synthétases (NOS) qui catalysent la transformation de la L-arginine en L-citrulline et NO. Cette réaction d'oxydation se déroule en deux étapes (Figure 12) : une première étape qui consiste en une hydroxylation de la L-arginine en une molécule intermédiaire, la N^G-hydroxyl-Arginine qui est ensuite oxydée en L-citrulline et NO (Marletta *et al.*, 1988).

Trois isoformes de NOS ont été identifiées et caractérisées chez l'homme et chez la souris selon la nomenclature suivante, qui respecte l'ordre chronologique dans lequel les NOS ont été purifiées et leurs ADNc respectifs isolés :

- la NOS de type I correspondant à l'isoforme neuronale ou nNOS, a été la première NOS découverte et purifiée à partir de cerveaux de rat et de porc (Bredt & Snyder, 1990 ; Mayer *et al.*, 1990 ; Schmidt *et al.*, 1991). Depuis elle a été identifiée dans divers tissus (pour revue voir Förstermann *et al.*, 1998) tels que le système nerveux central, les muscles squelettiques (Gath *et al.*, 1997), les neurones nitrergiques périphériques (Belai *et al.*, 1992) et les entérocytes (Moochhala *et al.*, 1996).

- la NOS de type II correspondant à l'isoforme inductible ou iNOS. Cette isoenzyme a été isolée à partir de macrophages de souris (Hevel *et al.*, 1991; Stuehr *et al.*, 1991). Depuis, sa présence a été révélée dans de nombreux types cellulaires. En outre, la génération de NO est caractéristique des cellules du système immunitaire (cellules dendritiques, cellules NK, mastocytes, et les cellules phagocytiques incluant les monocytes, les macrophages et les neutrophiles) ainsi que d'autres cellules impliquées dans les réactions immunes (telles que les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules du muscle lisse vasculaire) (Bogdan, 2000).

- la NOS de type III correspondant à l'isoforme endothéliale ou eNOS. La eNOS a tout d'abord été identifiée au niveau des cellules endothéliales (Förstermann *et al.*, 1991 ; Pollock *et al.*, 1991). Bien que les cellules endothéliales constituent sa principale localisation, elle a également été décrite dans les cellules épithéliales tels que les entérocytes (Brown *et al.*, 1992 ; Moochhala *et al.*, 1996), mais également dans les cellules du système immunitaire tels que les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK. En outre, de nombreux tissus expriment cette enzyme (pour revue voir Förstermann *et al.*, 1998).

Les isoformes NOS neuronale (nNOS) et NOS endothéliale (eNOS) sont exprimées de façon constitutive et sont regroupées sous le terme cNOS. Elles produisent en conditions physiologiques de faibles quantités de NO. L'isoforme de type II est inductible (iNOS), elle est synthétisée *de novo* seulement après stimulation et libère d'importantes quantités de NO. Toutefois certains travaux chez l'homme et chez les rongeurs ont révélé qu'une faible quantité de iNOS serait exprimée de façon constitutive dans

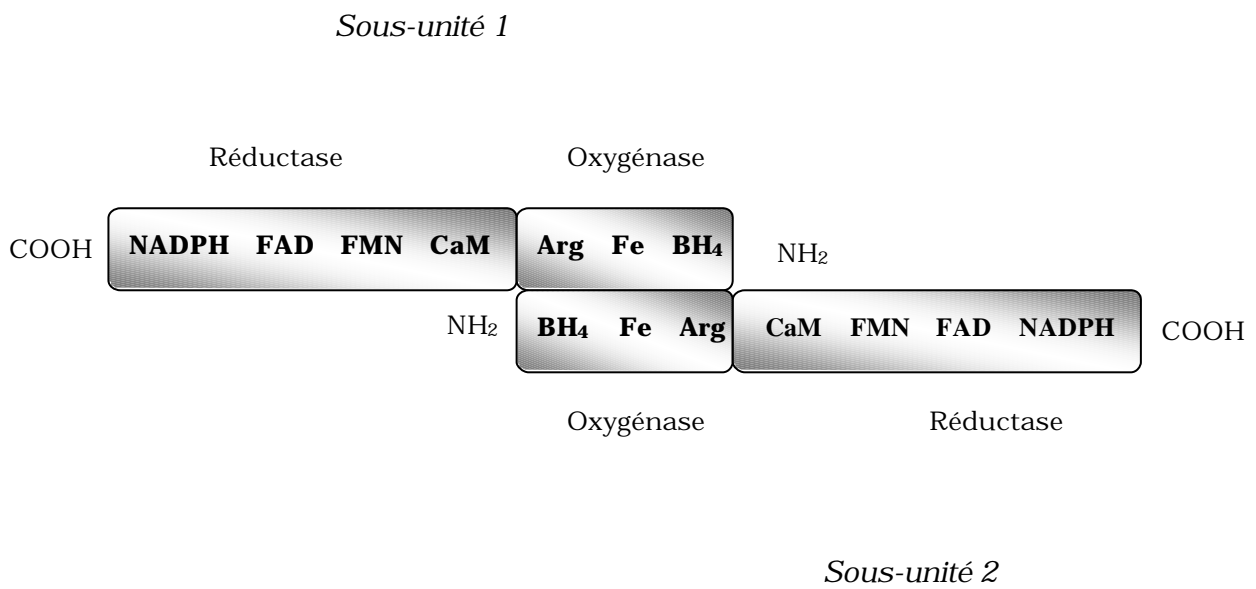


Figure 13 : Schéma représentatif de la structure des dimères constituant les NOS.

certains tissus tel que le muscle squelettique (Boczkowski *et al.*, 1996), l'épithélium respiratoire (Guo *et al.*, 2000), les plaquettes sanguines (Chen & Mehta, 1996) et l'épithélium colique (Roberts *et al.*, 2001; Perner *et al.*, 2002a). Cependant, son expression devient prépondérante dans presque tous les tissus par l'intermédiaire de certaines molécules impliquées dans la défense immunitaire et la réaction inflammatoire comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , INF- γ) et le LPS bactérien (Hevel *et al.*, 1991 ; Stuehr *et al.*, 1991).

En conséquence, outre leur distribution cellulaire et tissulaire ainsi que l'amplitude et la durée de production du NO, les NOS se différencient par leur régulation.

2.3.2. Expression et régulation des différentes NOS

La séquence primaire des acides aminés des NOS contient des séquences consensus comprenant les différents sites de liaisons aux cofacteurs et coenzymes dont elles ont besoin pour l'assemblage des monomères et/ou pour leur activité catalytique. Les NOS sont en effet des protéines homodimériques dont les deux monomères peuvent eux-mêmes être divisés en deux domaines principaux (Figure 13) : l'un ayant une activité réductase du côté carboxy-terminal et possède les sites de liaisons à la calmoduline (CaM), à la FMN (*flavin mononucleotide*), à la FAD (*flavin adenine dinucleotide*) et au NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), et l'autre ayant une activité oxygénase du côté amino-terminal et contient les sites de liaisons pour la L-arginine, l'hème prosthétique (Fe) et la tetrahydrobioptérine (BH₄).

2.3.2.1. Les cNOS

L'activité de la nNOS est régulée par des mécanismes dépendant du calcium et de la calmoduline. Sous forme inactive dans le cytosol, la nNOS est présente à l'état phosphorylé (Dinerman *et al.*, 1994), notamment au niveau des résidus sérine (Zoche *et al.*, 1997 ; Hayashi *et al.*, 1999), empêchant la

fixation du complexe Ca^{2+} /calmoduline. En réponse à une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , la nNOS interagit avec le complexe Ca^{2+} /calmoduline, passe dans le cytoplasme où elle va alors être déphosphorylée ce qui provoque son activation (Wang & Marsden, 1995 ; Dawson *et al.*, 1998). Par ailleurs, bien que s'exprimant de façon constitutive, le gène de la nNOS peut être régulé au niveau transcriptionnel par divers facteurs de transcription dont le NF- κ B (Hall *et al.*, 1994).

De façon similaire, l'expression de la eNOS est constitutive et son activité est Ca^{2+} /calmoduline dépendante (Förstermann *et al.*, 1991 ; Pollock *et al.*, 1991). En revanche, contrairement à la nNOS, elle est reliée à la membrane cellulaire (Garcia-Cardena *et al.*, 1996a,b). Cette localisation semble être favorable à la libération locale d'importantes concentrations de NO dans le tissu endothélial (Liu *et al.*, 1996), en réponse aux nombreux stimuli tant en conditions physiologiques que pathologiques (Förstermann *et al.*, 1998). Les phosphorylations vont également réguler l'activité de la eNOS. Toutefois en fonction du site de phosphorylation touché, la eNOS peut être inactive ou active. Ainsi par exemple, la phosphorylation par une protéine kinase C de la thréonine 495, localisée au niveau du domaine de fixation de la calmoduline, entraîne une inhibition de l'activité eNOS (Förstermann *et al.*, 1998).

2.3.2.2. La iNOS

La iNOS nécessite également la calmoduline pour être active mais contrairement aux autres isoformes, celle-ci est déjà fortement liée à l'enzyme (Cho *et al.*, 1992) dont l'activité est de ce fait indépendante du taux de calcium.

L'activation maximale du promoteur du gène de la iNOS et par conséquent l'augmentation des taux basaux de transcription, est produite lors de la combinaison entre les cytokines pro-inflammatoire et le LPS (Cho *et al.*, 1992). Le NF- κ B semble à ce niveau jouer un rôle primordial dans la régulation de l'expression de la iNOS (Xie *et al.*, 1993; Chartrain *et al.*, 1994 ;

Ghosh *et al.*, 1998 ; Taylor *et al.*, 1998). Une inhibition transcriptionnelle de l'expression du gène de la iNOS a été décrite *in vitro* avec le TGF- β dans les macrophages (MacMicking *et al.*, 1997 ; Jun *et al.*, 1995) et avec les interleukines IL-4, IL-10 et IL-13 (Jungi *et al.*, 1997).

De plus, les cytokines telles que l'INF- γ , le TNF- α , l'IL-1, l'IL-4 et TGF- β , induisent ou suppriment la guanosine triphosphate cyclohydrolase I, enzyme clé de la synthèse de BH₄, essentiel pour la catalyse des NOS, constituant de ce fait un autre niveau de la régulation des différentes NOS (Werner-Felmayer *et al.*, 2002).

Outre le niveau transcriptionnel, l'autre niveau de régulation des NOS est catalytique et s'effectue à travers des systèmes de rétrocontrôles et notamment à travers la disponibilité du substrat (L-arginine) et le NO lui-même.

Il existe deux pools séparés de L-arginine (Chang *et al.*, 1998). La production du NO par la iNOS dépend de la L-arginine extracellulaire, même lorsqu'un niveau en L-arginine intracellulaire adéquat est présent (Chang *et al.*, 1998). Dans les macrophages, les protéines de transport qui permettent la "capture" de la L-arginine extracellulaire sont "sur-régulées" par le LPS (Closs *et al.*, 2000 ; Nicholson *et al.*, 2001). Toutefois, la concentration extracellulaire en L-arginine est fortement modulée par un antagoniste endogène de la iNOS : l'arginase, qui dégrade la L-arginine en urée et ornithine (Wu & Morris, 1998). Cette enzyme est fortement exprimée dans les macrophages, les cellules dendritiques et les entérocytes sous l'action des cytokines de type Th2 (IL-4 avec ou sans IL-10, IL-13), le TGF- β et le LPS (Munder *et al.*, 1999; Gotoh & Mori, 1999). Lorsque la "sur-régulation" de l'arginase précède l'induction de la iNOS par l'INF- γ associé au TNF- α ou au LPS, elle prévient la production de NO par déplétion de substrat (Munder *et al.*, 1999 ; Gotoh & Mori, 1999 ; Rutschman *et al.*, 2001). Le pool de L-arginine peut être régénérer dans les macrophages à partir de la citrulline par l'arginosuccinate synthétase induite par le LPS (avec ou sans l'INF- γ) (Hattori *et al.*, 1994 ; Nüssler *et al.*, 1994 ; Nagasaki *et al.*, 1996).

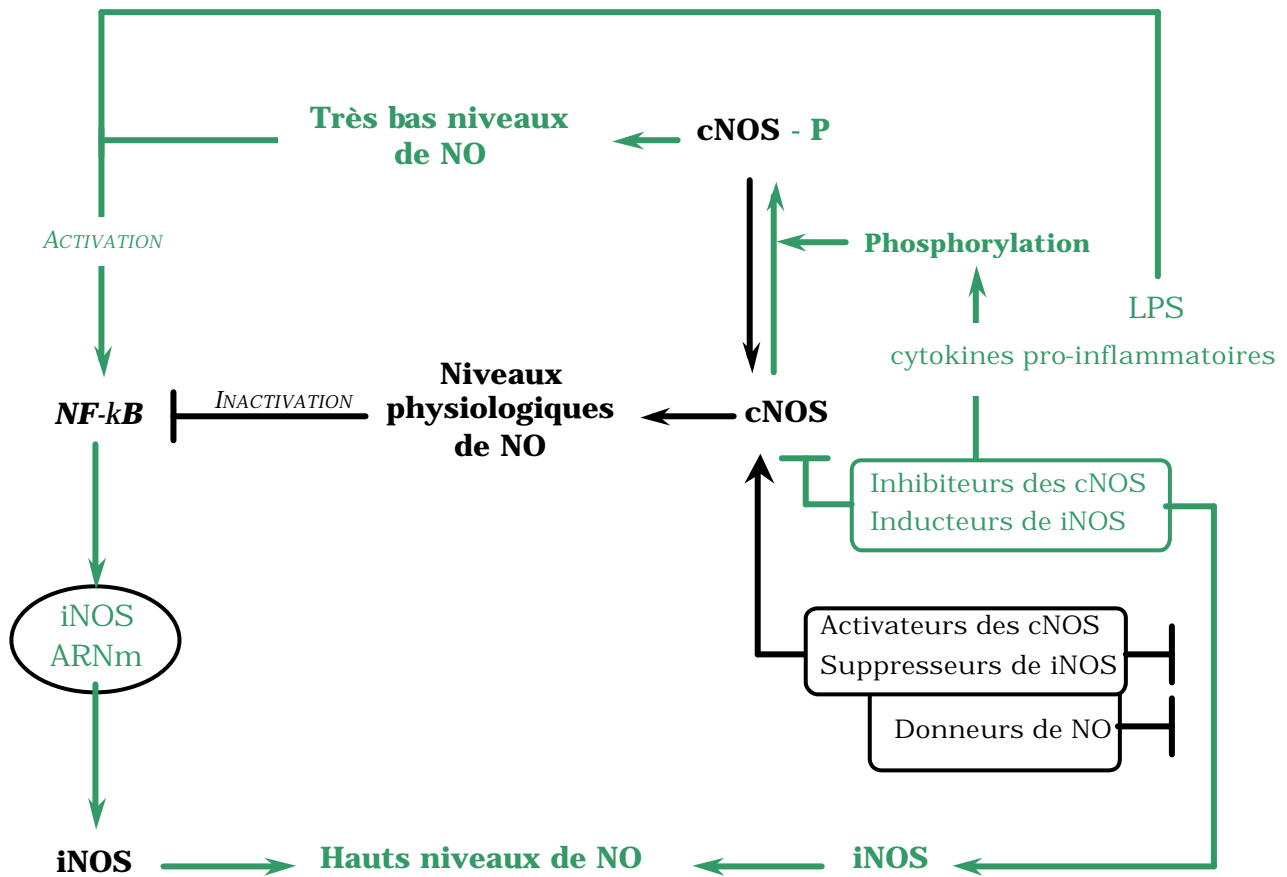




Figure 14 : Schéma de synthèse du contrôle des niveaux de NO (d'après Colasanti & Suzuki, 2000)

INACTIVATION  ACTIVATION 

Par ailleurs, le NO inhibe la iNOS à travers un mécanisme impliquant le fer du groupement prosthétique de l'enzyme (Griscavage *et al.*, 1993). En effet, les trois isoformes de NOS ont une structure commune correspondant à un acide aminé vraisemblablement le Trp 409 conservé dans les différentes isoformes (Adak *et al.*, 1999). Ainsi, en se fixant sur l'hème au niveau de cette structure, le NO va donner naissance à un complexe fer-nitrosyl supprimant alors son activité catalytique (Kurjak *et al.*, 1999). Par conséquent, le NO endogène exerce un effet inhibiteur sur l'activité catalytique des NOS de façon autocrine et module donc sa propre transcription. Ainsi, le NO endogène mais aussi le NO apporté par des donneurs de NO réduisent significativement l'activité de la NOS inductible (Griscavage *et al.*, 1993 ; Morin *et al.*, 1994) de la NOS neuronale (Rogers & Ignarro, 1992 ; Rengasamy & Johns, 1993 ; Abu-Soud *et al.*, 1995 ; Hosoda *et al.*, 1998), et de la NOS endothéliale (Buga *et al.*, 1993 ; Ravichandran *et al.*, 1995 ; Sheehy *et al.*, 1998).

Cet effet modulateur du NO a également été observé au niveau transcriptionnel. En effet, de nombreux travaux ont montré que le NO endogène ou les donneurs de NO pouvaient exercer un rétrocontrôle négatif sur la transcription des gènes codant pour les différentes NOS et plus particulièrement pour la iNOS, notamment en inactivant le facteur transcriptionnel NF- κ B (Mattews *et al.*, 1996 ; Park *et al.*, 1997 ; Togashi *et al.*, 1997 ; Katsuyama *et al.*, 1998 ; de la Torre *et al.*, 1999 ; Qu *et al.*, 2001).

Ainsi, dans les conditions normales, les concentrations physiologiques du NO issu des cNOS exercent un effet répresseur sur l'induction de l'expression de la iNOS en maintenant le NF- κ B dans un état d'inactivation (Figure 14). Toutefois, il a été observé qu'en conditions pathologiques, certains composés agissant comme inducteurs de la iNOS (i.e. LPS, cytokines pro-inflammatoires ou les deux) vont rapidement déplacer l'équilibre nNOS/eNOS \Leftrightarrow nNOS-P/eNOS-P vers la forme phosphorylée. La phosphorylation des cNOS va se traduire par une inactivation de ces dernières et par conséquent par un abaissement abrupt du niveau intracellulaire de NO en dessous de la valeur seuil physiologique qui

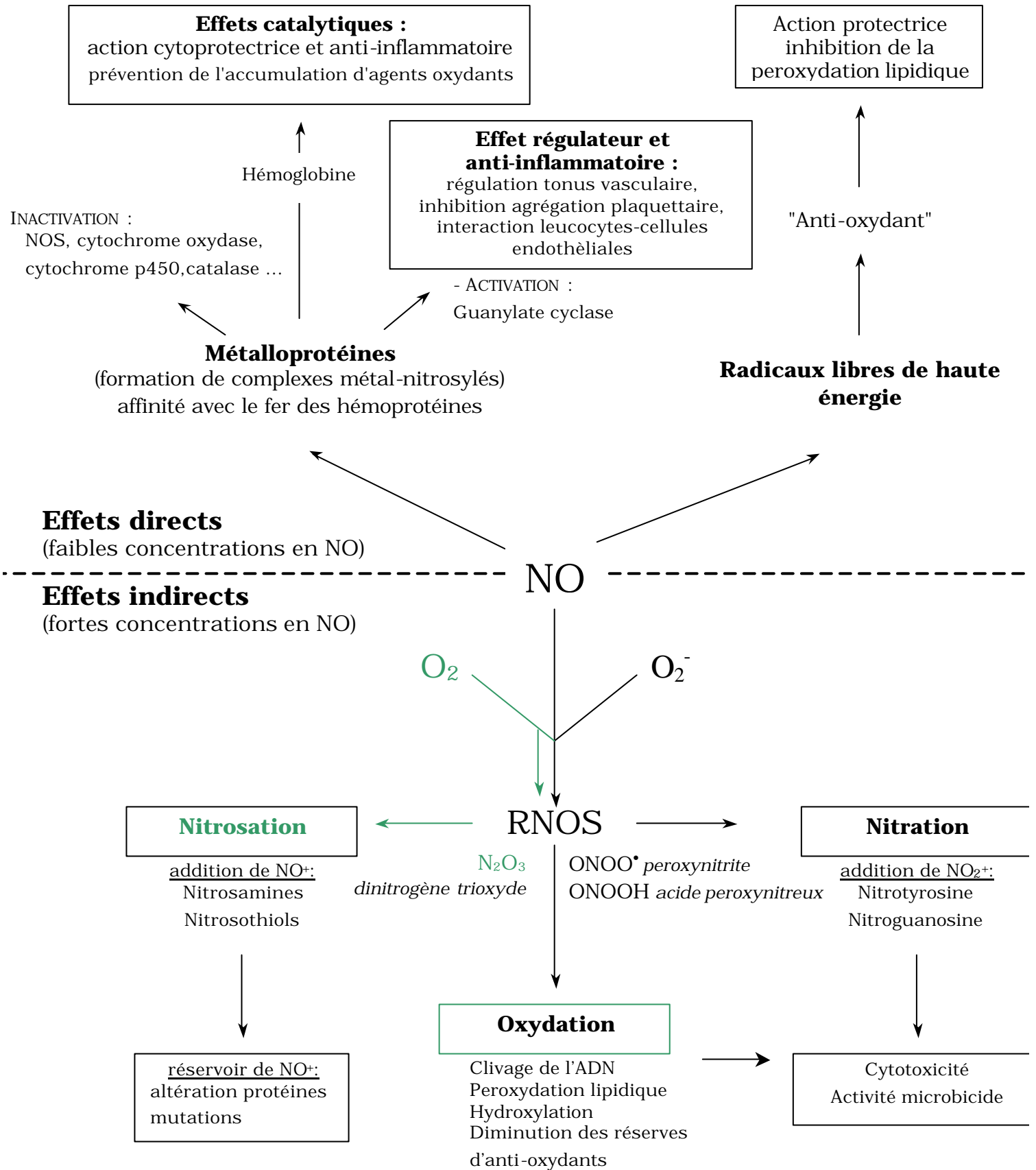


Figure 15 : Les effets du NO adapté d'après la littérature (Grisham *et al.*, 1999; Wallace & Miller, 2000).

maintenait l'effet inhibiteur de la iNOS (Colasanti *et al.*, 1997 ; Colasanti *et al.*, 1999). Le niveau très faible de NO alors présent va se traduire par une levée de l'inhibition de l'activation du NF- κ B suivi par l'induction de l'expression de la iNOS et par la production d'importantes quantités de NO (Figure 14). En outre, tout composé réduisant la concentration intracellulaire de NO tels que les inhibiteurs des cNOS peut induire le même phénomène. Réciproquement, la suppression des inducteurs de l'expression de la iNOS va avoir l'effet inverse. Ils peuvent augmenter le niveau de NO intracellulaire issu des cNOS et ainsi maintenir la suppression de l'activation du NF- κ B en présence d'inducteurs de la iNOS. Les activateurs des cNOS ainsi que les donneurs de NO peuvent agir selon une voie similaire.

2.3.3. La réactivité du NO

La demi-vie du NO dans les systèmes biologiques est de l'ordre de quelques secondes (Marletta, 1988), son apolarité lui facilite son passage à travers les membranes biologiques, et sa diffusion à travers les tissus. La distance de diffusion du NO sécrété par une cellule unique est de l'ordre de 150 à 300 μ m en 4-15 secondes, et encore d'avantage lorsque les cellules sont regroupées (Lancaster, 1994 ; Lancaster, 1996). Ainsi, de par ses capacités de diffusion, l'activité du NO n'est pas restreinte à son site de production. Le NO ne se fixe pas sur un récepteur mais il interagit avec des molécules cibles non spécifiques. Les effets du NO diffèrent avec son taux, sa durée et son lieu de production, et la nature des molécules cibles. A ce titre, Wink & Mitchell (1998) proposent deux types d'effets du NO (directs et indirects) résultant de deux types de réactions dans les milieux biologiques (Figure 15). Ainsi, les effets directs vont correspondre à l'interaction directe du NO avec des molécules biologiques et ont lieu lorsque la concentration en NO est faible. Ces effets correspondent aux effets physiologiques protecteurs et régulateurs du NO. A l'inverse, les effets indirects correspondent aux réactions impliquant les dérivés intermédiaires du NO tels que les RNOS (*reactive nitric oxygen species*) qui résultent de la combinaison du NO avec l'oxygène moléculaire

(O₂) ou l'anion superoxyde (O₂⁻) (Figure 15). Les RNOS prédominants *in vivo* sont le dinitrogène trioxyde (N₂O₃) et le peroxydinitrite (ONOO⁻), pouvant tous deux induire différents types de stress chimique : nitratif, nitrosatif et oxydatif (Wink & Mitchell, 1998). Ces effets apparaissent lorsque la concentration en NO est importante. Les RNOS participent à la genèse des lésions tissulaires dans plusieurs situations pathologiques dont l'inflammation (Grisham *et al.*, 1998 ; Hierholzer *et al.*, 1998; Wink & Mitchell, 1998).

En d'autres termes le NO peut s'opposer aux multiples mécanismes lésionnels issus des processus inflammatoires, mais il peut également les accompagner.

2.3.4. NO et inflammation digestive

2.3.4.1. NO endogène

En cas d'agression, c'est dans un premier temps le NO issu des cNOS qui participe au maintien de l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale en limitant l'extension des processus lésionnels par l'intermédiaire entre autre de son action vasodilatatrice (Warner *et al.*, 1989 ; Li *et al.*, 1992 ; Salzman, 1995). Secondairement, on assiste à l'intervention du NO provenant de la iNOS.

D'une manière générale, le NO va exercer de nombreux effets incluant (i) l'inhibition de l'adhérence et de l'agrégation plaquettaire (Radomski *et al.*, 1987 ; Radomski *et al.*, 1990), (ii) la modulation de la perméabilité endothéliale (Kubes & Granger, 1992), (iii) l'atténuation de l'adhérence, de l'agrégation (De Caterina *et al.*, 1995 ; Bogdan *et al.*, 2000; Trifilieff *et al.*, 2000 ; Pfeilshifler *et al.*, 2001) et des fonctions leucocytaires (Kubes *et al.*, 1991) dont le piégeage des radicaux libres et plus particulièrement du radical superoxyde (en inhibant l'auto-assemblage de la NADPH oxydase) (Fujii *et al.*, 1997 ; Bloodsworth *et al.*, 2000).

Cependant, la littérature dans son ensemble suggère qu'une production importante de NO induit des dommages au niveau du tube digestif. L'utilisation d'inhibiteurs de NOS dans des modèles de colites expérimentales montre en effet qu'une inhibition de la production de NO peut atténuer les lésions inflammatoires (Miller *et al.*, 1993 ; Grisham *et al.*, 1994 ; Hogaboam *et al.*, 1995 ; Miller *et al.*, 1995 ; Rachmilewitz *et al.*, 1995 ; Nakamura *et al.*, 1999), ce qui est toutefois controversé par d'autres travaux où l'inhibition des NOS montrent peu (Ribbons *et al.*, 1997 ; Hogaboam *et al.*, 1995) ou pas d'effet (Hutcheson *et al.*, 1990 ; Mac Kendrick *et al.*, 1993 ; Conner *et al.*, 1995 ; Kiss *et al.*, 1997 ; Dikopoulos *et al.*, 2001) ou voire même une exacerbation de l'inflammation (Pfeiffer & Qui, 1995).

Cet effet ambivalent du NO trouverait son explication dans le fait qu'en fonction de la phase inflammatoire, le NO régule la réponse immunitaire dans le sens anti-ou pro-inflammatoire.

L'importance du NO dans l'inhibition de l'inflammation durant la phase initiale (aiguë) a été rapportée dans différents travaux et notamment à travers ses effets "anti-neutrophiles" (Mac Kendrick *et al.*, 1993 ; Kubes *et al.*, 1994) et anti-oxydants à l'égard de l'O₂⁻ et de l'H₂O₂ (Wink *et al.*, 1993 ; Johnston *et al.*, 1996). Dans des modèles d'inflammation aiguë, l'inhibition du NO se traduit par une augmentation du recrutement des neutrophiles, du stress oxydatif, de la dégranulation des mastocytes et de la perméabilité microvasculaire et épithéliale (Kubes *et al.*, 1991 ; Kubes, 1992 ; Kubes & Granger, 1992 ; Kubes *et al.*, 1993) et de ce fait par une exacerbation des lésions (Hutchensonn *et al.*, 1990 ; Kubes *et al.*, 1995 ; Hosoi *et al.*, 2001). A cet effet, l'intervention essentielle de la iNOS dans ce processus a été soulignée : (i) l'utilisation de l' amino-guanidine (AG : un inhibiteur spécifique de la iNOS) se traduit par une augmentation des lésions de la muqueuse colique et de la réponse inflammatoire dans le modèle de colite au TNBS chez le rat (Dikopoulos *et al.*, 2001), (ii) les souris iNOS^{-/-} ne développent pas de processus de réparation suite à une colite induite par l'acide acétique (McCafferty *et al.*, 1997) et présentent en phase aiguë des lésions plus sévères que les souris sauvages (McCafferty *et al.*, 1997 ; Mashimo & Goyal, 1999),

(iii) l'administration chronique d'inhibiteurs de NOS induit une inflammation intestinale (Miller *et al.*, 1993 ; Miller *et al.*, 1994).

Le rôle bivalent de la iNOS dans la phase de développement de l'inflammation au TNBS (phase aiguë *versus* phase chronique) a été étudié. Ces études montrent que (i) la iNOS neutrophilaire améliore la colite en phase aiguë mais n'a pas d'impact en phase chronique (Mc Cafferty *et al.*, 1999a), (ii) un pré-traitement de 2 jours avec le L-NAME exacerbe les lésions inflammatoires et à l'inverse, l'administration de L-NAME après l'induction de la colite les réduit (Kiss *et al.*, 1997).

Ainsi, un rôle néfaste de la iNOS dans le développement de la phase inflammatoire chronique a été rapporté dans différents travaux, mais est toutefois controversé. Par exemple, l'utilisation de L-NAME (inhibiteur non-spécifique de la iNOS) et d'AG (inhibiteur spécifique), dans le modèle TNBS montre que seule l'AG réduit la sévérité de la colite chez le rat (Nakamura *et al.*, 1999) et diminue l'iléite chez le cobaye (Miller *et al.*, 1995). A contrario, d'autres travaux montrent qu'aucun de ces deux inhibiteurs n'a d'effet sur la sévérité de la colite chez le rat (Armstrong *et al.*, 2000). De même, le mercaptoalkylguanidine (MEG : inhibiteur spécifique de l'enzyme inducible) atténue significativement les signes cliniques (diarrhée, perte de poids) de la colite induite par le TNBS chez le rat, ainsi que l'infiltration des granulocytes, les scores lésionnels macroscopiques et histologiques (Zingarelli *et al.*, 1998).

Dans le modèle de colite induite par le TNBS, l'utilisation de souris iNOS^{-/-} montre une résolution totale de la colite en phase chronique chez ces dernières, alors qu'à ce stade de l'inflammation les souris sauvages présentent encore des dommages sévères (Zingarelli *et al.*, 1999). A l'inverse, il a été rapporté que l'absence d'induction de la iNOS importe peu sur le développement de la phase chronique dans ce modèle (McCafferty *et al.*, 1999a). Enfin, dans le modèle de colite chronique qui se développe spontanément chez des souris IL-10 déficientes, il a été observé que la colite se développe avec la même intensité chez des souris déficientes non seulement du gène de l'IL-10 mais aussi pour le gène de la iNOS (McCafferty *et al.*, 1999b).

Chez l'homme, le rôle du NO dans les maladies inflammatoires de l'intestin a été suggéré à travers diverses études cliniques qui démontrent la présence d'un niveau élevé de nitrites/nitrates dans le plasma, de NO \cdot dans les dialyses rectales, ainsi qu'une augmentation de l'activité iNOS dans les neutrophiles, les macrophages, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales dans les biopsies issues de ces patients (Boughton-Smith *et al.*, 1993 ; Roedinger *et al.*, 1986 ; Rachmilevitz *et al.*, 1995 ; Singer *et al.*, 1996 ; Kolios *et al.*, 1998 ; Ikeda *et al.*, 1997 ; Iwashita *et al.*, 1998). De plus, une corrélation entre l'activité iNOS et la sévérité des lésions endoscopiques et histologiques a été montrée (Kimura *et al.*, 1998). Toutefois, il a également été décrit que dans des cas cliniques de *collagenous colitis* (colite qui n'est jamais associée avec des ulcérations macroscopiques marquées), le taux de NO était beaucoup plus élevé que celui rencontré dans le cas de la colite ulcéreuse (Perner *et al.*, 2002b). Il n'existe donc pas de corrélation entre la concentration en NO et la formation des lésions. Les mécanismes responsables des effets délétères du NO au niveau de la muqueuse intestinale englobent en effet la production de radicaux libres nitrogénés potentiellement oxydants (pour revue voir Pryor & Squadrito, 1995), tels que le peroxy-nitrite et la mise en place de réactions d'oxydation (Virag *et al.*, 2003) déclenchant des processus cytotoxiques incluant la peroxydation lipidique et l'endommagement de l'ADN, et des réactions de nitration (Miller & Sandoval, 1999) de la tyrosine par exemple conduisant à la formation de la 3-nitrotyrosine (3-NT). Cette dernière est utilisée en tant que méthode standard reflétant la formation du peroxy-nitrite compte tenu de la haute réactivité de ce dernier.

La formation de 3-NT a été mise en évidence en utilisant les techniques d'immunohistochimie tant chez l'homme dans des biopsies issues de patients atteints de MICI (Singer *et al.*, 1996 ; Dijkstra *et al.*, 1998 ; Kimura *et al.*, 1998), que chez l'animal dans des modèles d'inflammation expérimentale (Miller *et al.*, 1995 ; Zingarelli *et al.*, 1998). Dans ce dernier cas, la formation de 3-NT et les index inflammatoires sont significativement réduits lors de l'administration d'AG dans le modèle d'iléite induite par le TNBS chez le

cobaye (Miller *et al.*, 1995) et par l'administration de MEG dans la colite induite par le TNBS chez le rat (Zingarelli *et al.*, 1998). De façon similaire, chez des souris iNOS déficientes, une réduction significative des stress oxydatif et nitrosatif induits par le TNBS a été observée (Zingarelli *et al.*, 1999). En conséquence, ces travaux suggèrent que l'augmentation du NO par l'activation de la iNOS est nécessaire à la formation de peroxy-nitrite. Toutefois, de par la diffusion aisée du NO dans les tissus, la 3-NT et la iNOS ne sont pas toujours co-localisées. Ainsi, dans le cas de la colite au TNBS, la iNOS a été localisée dans les cellules inflammatoires infiltrantes (MacCafferty *et al.*, 1999 ; Zingarelli *et al.*, 1998) alors que la formation de la 3-NT apparaît tout au long du tissu enflammé (Zingarelli *et al.*, 1998). Une autre étude montre également que le site de formation de 3-NT dans le modèle de colite induite par le TNBS est distinct de celui de la iNOS (Miampamba & Skharkey 1999). En revanche, dans le modèle d'iléite, la formation de 3-NT apparaît au voisinage de l'expression de la iNOS (villosités des cellules épithéliales et neurones) (Miller *et al.*, 1995).

Chez l'homme, la 3-NT a été détectée au niveau des cellules épithéliales (Singer *et al.*, 1996 ; Dijkstra *et al.*, 1998 ; Kimura *et al.*, 1998) et de la lamina propria (Dijkstra *et al.*, 1998 ; Kimura *et al.*, 1998) chez des patients atteints aussi bien de la maladie de Crohn, que de recto-colite hémorragique ou de diverticulite. Toutefois, les résultats de ces études divergent quant à la co-localisation ou non de la iNOS et de la 3-NT. Par exemple, une immunoréactivité intense de la iNOS associée à la formation de 3-NT a été montrée (Singer *et al.*, 1996). A l'inverse, dans une autre étude la formation de 3-NT a été détectée à la surface des cellules inflammatoires produisant les ROMs (*reactive oxygen metabolite*) et l'expression de la iNOS a été détectée principalement au niveau épithélial (Dijkstra *et al.*, 1998)

Ces données obtenues aussi bien chez l'homme que chez l'animal, suggèrent que le NO issu des iNOS ne détermine pas nécessairement le lieu de formation du peroxy-nitrite et que le NO issu des cNOS ainsi que le site de formation des ROMs sont également à considérer. Par ailleurs, bien que la

plupart des cellules soient capables de produire à la fois du NO et de l'O₂⁻, le flux relatif de production de ces deux radicaux est un facteur important dans la formation du peroxy-nitrite. A ce titre, il a été montré que la formation de peroxy-nitrite n'est augmentée que si le NO et l'O₂⁻ sont produits en quantité égale (réaction stœchiométrique) (Miles *et al.*, 1996). De plus, la génération en excès de l'un de ces deux radicaux se traduit par une diminution de la formation de peroxy-nitrite (Miles *et al.*, 1996). Par ailleurs, compte tenu du fait que contrairement au NO, le radical superoxyde ne diffuse pas, la quantité de peroxy-nitrite produite est limitée d'une manière site-spécifique aux endroits où il y a une forte production d'O₂⁻ (Grisham *et al.*, 1999).

Le NO peut moduler la perméabilité intestinale et la translocation bactérienne dans différentes voies et directions, en fonction des modèles expérimentaux employés et de la concentration locale en NO.

En conditions physiologiques, l'inhibition de l'activité cNOS par le L-NAME induit une augmentation substantielle et rapide de la perméabilité épithéliale (Kubes, 1993 ; Kanwar *et al.*, 1994). A contrario, l'implication d'une forte concentration en NO dans la rupture de l'intégrité de la barrière épithéliale a été soulignée au travers de nombreux travaux. Les mécanismes par lesquels la surproduction de NO induit un dysfonctionnement de la barrière intestinale apparaissent complexes et multi-factoriels. Ils incluent entre autres les réactions d'oxydation et de nitration (Alican & Kubes, 1996 ; Liu & Sundqvist, 1997), l'ouverture des jonctions serrées et la rupture du cytosquelette d'actine (Salzman *et al.*, 1995 ; Banan *et al.*, 2000 ; Forsythe *et al.*, 2002).

Ainsi, la rupture de l'intégrité de la barrière intestinale par rupture du cytosquelette, liée à la nitration et à l'oxydation de la molécule d'actine, par les radicaux nitrogénés tels que le peroxy-nitrite a été rapportée (Banan *et al.*, 2000). En outre, l'utilisation d'inhibiteurs de NOS et de piègeurs de radicaux nitrogénés ont reversé ces effets (Banan *et al.*, 2001). De plus, au cours de la colite induite par le TNBS les peroxy-nitrites contribuent majoritairement à l'apoptose des entérocytes (Yue *et al.*, 2001). Enfin, la rupture de la barrière

épithéliale induite par le LPS résulterait de dommages provoqués par le NO entérocytaire de manière autocrine (Forsythe *et al.*, 2002)

Plusieurs autres travaux confirment l'implication du NO dans l'augmentation de la perméabilité intestinale en utilisant des inhibiteurs de NOS chez le rat ou des souris iNOS déficientes. Ces études montrent que cet effet du NO sur la perméabilité épithéliale s'accompagne de translocation bactérienne (Kanwar *et al.*, 1994 ; Sorells *et al.*, 1996 ; Mishima *et al.*, 1997 ; Unno *et al.*, 1997).

Il a en effet été rapporté que le NO issu des iNOS favorise la translocation bactérienne après un challenge au LPS (Unno *et al.*, 1997). Ceci a été confirmé en utilisant des souris iNOS^{-/-} qui exposées au LPS ne présentent pas de translocation bactérienne (Mishima *et al.*, 1997). De même, dans le modèle d'obstruction iléale chez le rat, il a été montré que l'inhibition des NOS par l'AG et le L-NAME réduit le temps minimum de transit bactérien durant la translocation bactérienne dans la sous-muqueuse (Samel *et al.*, 2003). Le temps minimum de transit est un paramètre de cinétique de translocation décrivant la période de temps minimal nécessaire à une bactérie intestinale d'entrer et de traverser la muqueuse intestinale. De plus, l'administration de L-arginine accélère significativement ce temps au niveau de la musculuse (Samel *et al.*, 2003).

Toutefois, le NO produit en fortes quantités via la iNOS par les cellules immunitaires (et plus particulièrement les macrophages), et les cellules épithéliales intestinales intervient également dans l'élimination des agents pathogènes.

L'utilisation de L-NMMA (inhibiteur des NOS) réduit *in vitro* la cytotoxicité des macrophages envers des micro-organismes pathogènes (Granger *et al.*, 1988). Il semblerait que le caractère bactéricide du radical NO macrophagique résulterait essentiellement de la production des RNOS et des réactions d'oxydation, de nitrosation et de nitration qui en découlent (De Groote & Fang, 1995 ; Fang, 1997 ; Bogdan *et al.*, 2000). De plus, le peroxy-nitrite qui compte parmi les molécules à haut pouvoir microbicide peut être formé à

l'intérieur des microorganismes par la réaction entre le NO provenant de l'hôte et l'O₂⁻ provenant du pathogène (St John *et al.*, 2001).

Certaines bactéries intraluminales induisent la production de NO par les cellules épithéliales de la muqueuse colique en activant le NF-κB (Salzman *et al.*, 1998). A ce niveau, le NO interviendrait (i) dans la défense de l'hôte contre les pathogènes luminaux, (ii) dans la maintien en "latence" de ces microorganismes (Fang, 1997). Dans ce cas également, le NO agirait *via* la production de radicaux libres nitrogénés et des réactions qui en résultent (Fang, 1997).

Toutefois, certaines bactéries pathogènes possèdent des systèmes de défense microbienne à l'égard du stress oxydatif et nitrosatif (Fang, 1997). Par exemple, *M. tuberculosis* et *S. thyphimurium* sont équipées de peroxyredoxine, enzyme qui détoxifie le peroxy-nitrite en nitrite (Bryk & Mryglod, 2000). L'existence chez *Salmonella dublin* d'un facteur inhibant l'expression du messager de la iNOS dans les cellules épithéliales intestinales a également été décrite (Salzman *et al.*, 1998).

2.3.4.2. NO exogène

Le rôle du NO dans les systèmes biologiques a également été étudié en utilisant des donneurs de NO. Parmi les plus couramment utilisés (pour revue voir Feelish & Stamler, 1996 ; Feelish, 1998) on trouve :

- les nitrates inorganiques tels que la triglycérine (GTN) et l'isosorbide dinitrate (ISDN),
- les S-nitrosothiols et notamment le S-nitroglutathion (SNOG),
- les sydnonimines avec la 3-morpholinosydine (SIN-1),
- les NONOates et plus particulièrement la spermine et la diéthylamine (Sper/NO, DEA/NO),
- les métaux de transition nitroxylés comme le nitroprussiate de sodium (SNP : Na₂[Fe (CN)₅ NO]²⁻ qui se décompose dans l'organisme au niveau des érythrocytes et des tissus en cyanure (CN⁻) qui est ensuite transformé en thiocyanate (SCN⁻) et en NO.

Les voies conduisant à la libération de NO varient en fonction des différentes classes de donneurs de NO (catalyse enzymatique, interactions avec d'autres molécules ou libération spontanée, réduction ou oxydation) (pour revue voir Feelish & Stamler, 1996). L'activité des donneurs de NO est tributaire de certains facteurs tels que leur sensibilité aux modifications de pH, d'oxygène, de lumière et de température, ainsi que l'effet de composés issus de leur métabolisme *in vivo*. Par ailleurs, le NO se présente sous différents états redox (NO⁺, NO⁻, NO[·]) qui influencent sa réactivité vis-à-vis des molécules cibles (Butler *et al.*, 1995). L'état redox du NO libéré dépend également des conditions environnementales, du profil enzymatique et de l'organe ou tissu considéré (Feelish & Stamler, 1996).

En cas d'agression, le rôle du NO dans l'atténuation des processus lésionnels a été montré en utilisant des donneurs de NO. L'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire en réponse à des facteurs chimiotactiques (Wallace *et al.*, 1999) et leur agrégation dans les microvaisseaux mésentériques (Gaboury *et al.*, 1993) peuvent être supprimées par l'administration de NO. De plus les donneurs de NO sont des inhibiteurs de la synthèse du LTB₄ et de la production d'O₂⁻ (Ney *et al.*, 1990 ; Darius *et al.*, 1992; Moilanen *et al.*, 1993; Pieper *et al.*, 1994). Ces effets inhibiteurs pouvant être en partie expliqués par des effets enzymatiques indépendants du cGMP. Par exemple, le NO inhibe la NADPH oxydase et la 5-lipo-oxygénase qui sont responsables de la production de l'O₂⁻ et de LTB₄ respectivement (Clancy *et al.*, 1992). En outre, l'accumulation des leucocytes et la destruction tissulaire peuvent être reversées par la perfusion de donneurs de NO (Lefter *et al.*, 1993).

En conditions physiologiques, l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par le L-NAME est reversée par des donneurs de NO tel que le SNP (Kubes, 1992). Par ailleurs, les études conduites *in vivo* chez le chat et *in vitro* sur des cellules épithéliales humaines ont démontré qu'une perfusion locale de composés libérant de forte quantité de NO ne provoque aucun changement, ni au niveau de la perméabilité microvasculaire, ni au niveau de

l'intégrité de la barrière épithéliale au niveau de l'intestin grêle (Kubes *et al.*, 1993). De plus, une administration concomitante d'un donneur de NO avec un médiateur pro-inflammatoire (PAF) inhibe l'augmentation de la perméabilité intestinale et microvasculaire induite par ce dernier. Cet effet anti-inflammatoire du NO exogène a également été rapporté dans la résolution de la colite induite par le TNBS (Wallace *et al.*, 1999). En outre, l'administration de NO-mésalamine est plus efficace que la mésalamine administrée seule (Wallace *et al.*, 1999).

En conditions pathologiques, l'administration de donneurs de NO améliore l'augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale induite par des endotoxines (Payne & Kubes, 1993). Réciproquement, l'inhibition des NOS aggrave le dysfonctionnement de la barrière intestinale induit par des stimuli nocifs (Hutcheson *et al.*, 1990 ; Alican & Kubes, 1996). Cependant, d'autres travaux réalisés *in vitro* suggèrent qu'un apport de NO se traduise par une rupture de la jonction péri-jonctionnelle des filaments d'actines et/ou la diminution intracellulaire de l'ATP, de manière pH-, dose- et temps-dépendants (Unno *et al.*, 1997 ; Xu *et al.*, 2002). Ces effets impliqueraient en partie le peroxy-nitrite et son acide conjugué issus de la réaction entre le NO exogène et l'O₂⁻ endogène intracellulaire (Menconi *et al.*, 1998).

Un effet dose-dépendant des donneurs de NO sur la viabilité des bactéries dans les entérocytes et leur passage à travers la barrière épithéliale a également été rapporté (Inaba *et al.*, 1999). Dans un modèle d'inflammation systémique, le SNP augmente la translocation bactérienne (Eleftheriadis *et al.*, 2000). Toutefois, un effet bénéfique dose-dépendant d'un autre donneur de NO, le NOR-3 (E-ethyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexamine) sur la translocation bactérienne dans un modèle de lésions hémorragiques intestinales induites par l'indométacine a été montré (Tanaka *et al.*, 2001).

Enfin, les donneurs de NO présentent également des propriétés microbicides, et la résistance microbienne à leur égard semble être corrélée avec la pathogénicité de ces microorganismes (Fang, 1997).

2.4. Hypersensibilité viscérale d'origine inflammatoire

Les phénomènes inflammatoires induisent un état d'hyperalgésie viscérale correspondant à une activation exagérée des voies sensibles en réponse à des stimuli douloureux ou non, au niveau périphérique et au niveau central (pour revues voir Mayer & Gebhart, 1994 ; Buéno *et al.*, 1997 ; Fioramonti *et al.*, 2001). Au niveau périphérique, ces altérations mettent en jeu la sensibilisation des afférences primaires, essentiellement les nocicepteurs polymodaux des fibres C, des modifications des systèmes modulateurs de la douleur et le recrutement de nocicepteurs silencieux à l'état basal (pour revues voir Mayer & Gebhart, 1994 ; Buéno *et al.*, 1997 ; Fioramonti *et al.*, 2001).

Chez les patients atteints de MICI des modifications de la sensibilité viscérale ont en effet été observées (Farthing & Lennard-Jones, 1978). Une hypersensibilité du rectum se traduisant par un abaissement du seuil de douleur en réponse à la distension intraluminaire rectale a été rapportée chez les patients souffrant de RCH (Rao *et al.*, 1987). De même une inflammation colique induite par le TNBS chez le rat sensibilise le rectum à la distension se traduisant également par un phénomène d'allodynie (Morteau *et al.*, 1994).

Les médiateurs chimiques synthétisés et libérés dans le foyer inflammatoire jouent un rôle dans l'induction, la transmission et la modulation des messages nociceptifs (pour revue voir Fioramonti *et al.*, 2001). Ainsi, lors d'une inflammation périphérique la bradykinine, certaines cytokines, les prostaglandines, le NGF (*nerve growth factor*) stimulent et sensibilisent les terminaisons des neurones sensoriels primaires. A côté de ces médiateurs inflammatoires, il existe des médiateurs d'origine neuronale (substance P, CGRP, neurokinine A...) libérés par les nocicepteurs eux-mêmes. Ces neuropeptides algogènes vont induire une inflammation neurogène. En outre, l'ensemble de ces médiateurs pérennise l'inflammation et la douleur.

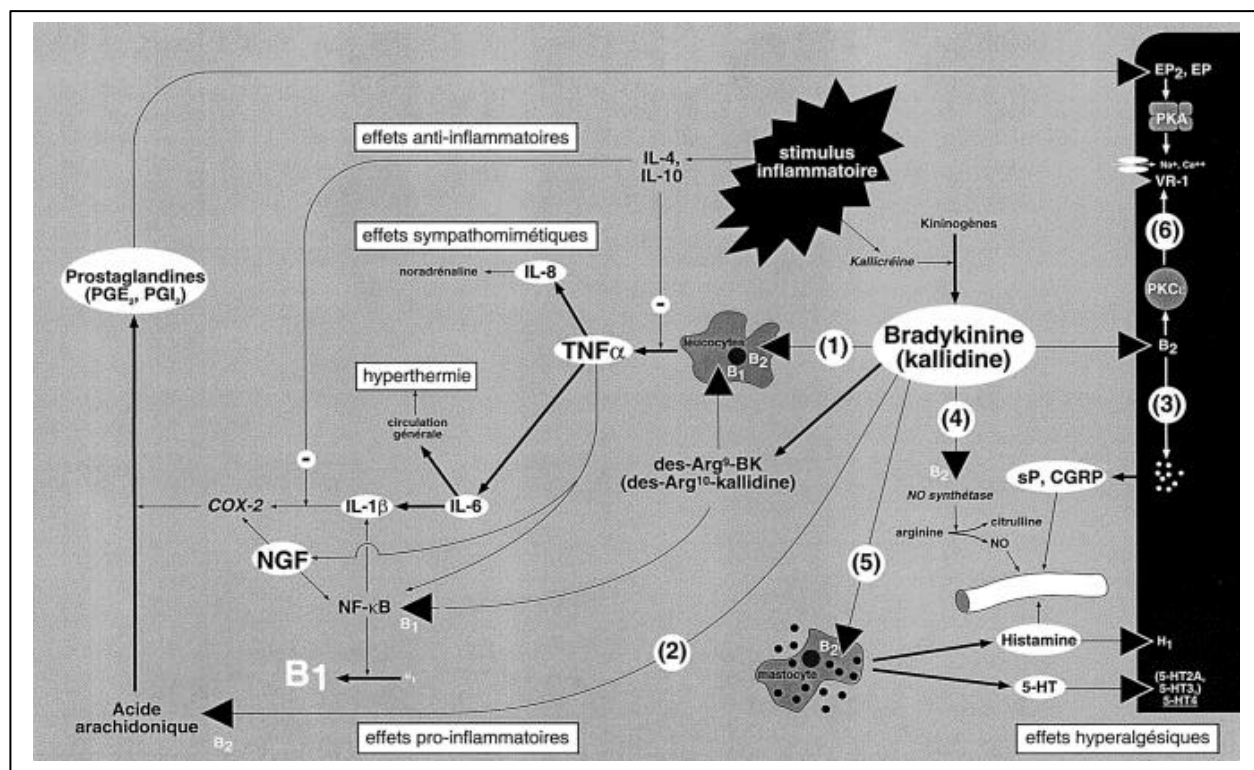


Figure 16 : Les kinines et la chaîne des cytokines dans la douleur aiguë inflammatoire (d'après Le Bars & Adam, 2002)

2.4.1. Les médiateurs

La bradykinine est impliquée dans la transmission de la douleur viscérale lors des phases précoces et tardives de l'inflammation. Les récepteurs à la bradykinine sont de deux types B1 et B2 (Regoli & Barade, 1980). Le récepteur B1, de type inductible, participerait au maintien de l'hyperalgésie inflammatoire chronique (pour revue voir Buéno *et al.*, 1997). Son expression est déclenchée par des agents inflammatoires comme le LPS, certaines cytokines, le NGF et la bradykinine elle-même (Ahluwalia & Perretti, 1999). Le récepteur B2 aurait quant à lui plutôt un rôle dans la genèse de l'hyperalgésie lors de l'inflammation chronique (pour revue voir Buéno *et al.*, 1997).

Outre son action directe pro-nociceptive, la bradykinine est à l'origine de la libération des autres médiateurs et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la vasodilatation qui en résultent (LeBars & Adam, 2002). En effet, c'est la bradykinine qui déclenche la libération (i) des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8), (ii) de l'acide arachidonique favorisant la formation des prostaglandines, (iii) des neuropeptides par les terminaisons libres des fibres afférentes primaires. Elle stimule la synthèse de NO et provoque la dégranulation des mastocytes ce qui a pour conséquence de libérer histamine et sérotonine (Figure 16).

Les cytokines sont avant tout pro-inflammatoires et hyperalgésiques (pour revue voir Watkins *et al.*, 1995) notamment par la chaîne TNF- α \rightarrow IL-6 \rightarrow IL-1 β qui est à l'origine de l'induction de la synthèse de COX₂ et donc de la libération de prostaglandines. Ces mécanismes sont freinés par des cytokines anti-inflammatoires, notamment IL-4 et IL-10.

Les prostaglandines (PGE₂ et PGI₂) sensibilisent les nocicepteurs à l'action des substances algogènes (histamine, sérotonine...) en abaissant le seuil d'activation avec pour conséquence une réponse accrue aux stimuli nociceptifs (Befus *et al.*, 1992 ; McKay & Bienenstock, 1994 ; Tracey & Walker, 1995).

L'histamine et la sérotonine libérées après activation et dégranulation des mastocytes vont exercer un effet direct sur les terminaisons périphériques des afférences primaires (Collins, 1993). La sérotonine est impliquée à différents stades depuis la sensibilisation des afférences primaires au niveau de l'intestin jusqu'à l'intégration centrale des messages nociceptifs. Morteau *et al.* (1994), rapportent qu'elle est l'un des médiateurs essentiels impliqués dans l'hypersensibilité à la distension rectale lors de la colite induite par le TNBS. L'histamine, dont le rôle dans l'inflammation est multiple, intervient comme médiateur de la composante vasculaire de l'inflammation et des réactions d'hypersensibilité immédiate par ses propriétés vasodilatatrices (Atkinson & Kaliner, 1992), et en augmentant la perméabilité vasculaire (Grega, 1986). De plus, des récepteurs à la substance P sont présents à la surface des mastocytes (Devillier *et al.*, 1985). En outre, la proximité étroite entre les mastocytes et les neurones sensitifs conduit à une boucle amplificatrice dans laquelle la substance P, libérée par les terminaisons nerveuses, active la dégranulation des mastocytes avec libération d'histamine qui en retour induit la libération de substance P par les terminaisons sensitives (Purcell & Atterwill, 1995).

La substance P, mais aussi le CGRP (*calcitonine gene-related peptide*) sont des peptides stockés dans les granules de sécrétion des neurones sensitifs et sont libérés lors de stimulations axonales (Levine *et al.*, 1993). Le CGRP est un puissant vasodilatateur mais il agit le plus souvent en synergie avec la substance P. Ainsi, la substance P limite l'action du CGRP, en induisant la dégranulation des mastocytes et la libération de protéases qui dégradent ce dernier (Payan *et al.*, 1983).

La substance P est l'un des médiateurs neuro-immunitaires le plus étudié de par sa participation à de nombreux échanges nerfs/cellules immunitaires tant en conditions physiologiques que pathologiques. La substance P augmente la perméabilité microvasculaire et active localement la libération de médiateurs de l'inflammation par les monocytes, les macrophages, les mastocytes et les neutrophiles (Payan *et al.*, 1984). Elle potentialise la réponse des neutrophiles à la fMLP (formyl-méthynyl-leucyl-phénylalanine) et

au complément C5a (Perianin *et al.*, 1989), elle stimule également la production de certaines cytokines (IL-6 et TNF- α) par les macrophages (Lotz *et al.*, 1988), elle induit la prolifération des lymphocytes et la synthèse des immunoglobulines (Stanisz *et al.*, 1987).

Une corrélation étroite entre la production accrue de substance P et une inflammation colique associée à une douleur viscérale a été rapportée chez le rat (Kishimoto *et al.*, 1994). Au cours de l'inflammation induite par le TNBS, l'implication de la substance P dans la transmission des messages nociceptifs sensoriels, mais aussi celle d'autres tachykinines telles que la neurokinine A (NKA) et la neurokinine B (NKB) passent par leur fixation à leurs récepteurs NK1 et NK2 (Julia *et al.*, 1995). Les fibres afférentes de type C sensibilisées lors d'inflammation tissulaire périphérique sont considérées comme des nocicepteurs silencieux sensibles aux neurokinines (Haebler *et al.*, 1990).

2.4.2. NO et l'hypersensibilité viscérale d'origine inflammatoire

A l'heure actuelle, aucune étude relative à l'implication du NO dans l'hyperalgésie viscérale d'origine inflammatoire n'est disponible dans la littérature. Toutefois en conditions physiologiques, le peu d'études conduites afin d'évaluer le rôle du NO dans la sensibilité viscérale lui attribue un effet anti-nociceptif. Ainsi, il a été montré que le SNP réduit la réponse nociceptive à la distension gastrique chez le rat (Rouzade *et al.*, 1999). Par ailleurs, il apparaît que l'inhibition de la production du NO par le L-NAME se traduit par à un abaissement du seuil de sensibilité à la distension du côlon chez des sujets sains (Corsetti *et al.*, 2002).

En revanche, l'implication du NO dans l'hyperalgésie somatique d'origine inflammatoire a fait l'objet de nombreux travaux lui attribuant un effet anti-nociceptif ou pro-nociceptif.

Par exemple, une administration intraplantaire de SIN-1 réduit l'hyperalgésie induite par le PGE₂ dans le test de la pression de la patte chez le rat (Ferreira *et al.*, 1991). Le SNP a un effet anti-nociceptif dans le *writhing test* chez la souris (Fidecka & Lalewick 1997). L'inhibition de l'œdème et de

l'hyperalgésie mécanique de la patte arrière induite par le carragenane a été observée après une administration intrapéritonéale de nitro-paracétamol NCX-701 chez le rat (Al-Swayek *et al.*, 2000 ; Futter *et al.*, 2001), une administration intra-cérébroventriculaire ou sous-cutanée ou intra-plantaire de L-arginine (Durate *et al.*, 1990 ; Kawabata *et al.*, 1992). A l'inverse, une administration intra-plantaire de L-arginine n'a pas d'effet sur l'hyperalgésie induite par l'administration intraplantaire de PGE₂ dans le test de la pression de la patte chez le rat (Nakamura *et al.*, 1996).

Le rôle pro-nociceptif du NO a été mis en évidence en utilisant des inhibiteurs de NO. Ainsi, le L-NAME est efficace dans le test au formalin chez la souris après une administration intra-cérébroventriculaire, intrapéritonéale ou orale (Moore *et al.*, 1991 ; Babbedge *et al.*, 1993). Le L-NMMA administré par voie intra-thécale (Malmberg & Yaksh, 1993) est également efficace dans le test au formalin chez le rat alors qu'il ne l'est pas lorsqu'il est administré par voie intra-plantaire (Granados-Soto *et al.*, 1997).

Chapitre 3

Les probiotiques

SOMMAIRE

Définitions
Modalités d'utilisation
Probiotiques et inflammation digestive
Probiotiques et douleur viscérale
Lactobacillus farciminis

3

Les probiotiques

1. Définitions

A partir du sens littéral du mot probiotique, du grec *pro* = pour *bios* = vie (en faveur de la vie), de nombreuses définitions ont chronologiquement été proposées. A l'origine, le terme probiotique fut donné en 1965 par Lilly & Stillwell, par opposition au terme antibiotique (*anti*=contre *bios*=vie) et décrivait *des substances produites par un micro-organisme qui stimulent la croissance d'un autre*. En 1974, Parker y intègre la notion de maintien de la microflore intestinale et décrit les probiotiques comme étant *des organismes et des substances qui contribuent à l'équilibre intestinal microbien*. Cette définition trop vaste englobant les cultures microbiennes, les métabolites produits par les micro-organismes mais aussi les antibiotiques, est revue en 1989 par Füller. Ce dernier, tout en conservant le rôle des probiotiques sur la microflore intestinale, restreint la définition aux micro-organismes et insiste sur l'importance de leur viabilité et désigne donc les probiotiques comme *un supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore microbienne intestinale*. Cette description bien qu'ayant encore évoluée soit très proche du sens actuel. Dans les années 1990, de nombreuses autres définitions ont été données (pour revue voir Schrezenmeir & de Vrese, 2001). Par exemple, en 1992, Havenaar & Huis in't Veld proposent une définition plus large concernant presque toutes les surfaces d'échange entre organismes supérieurs et environnement, c'est-à-dire non seulement l'intestin mais aussi la peau, les voies respiratoires supérieures et l'appareil urogénital et stipulent qu'*un probiotique contient des*

monocultures ou des cultures mixtes vivantes de micro-organismes agissant de façon bénéfique sur l'organisme de l'hôte (animal ou humain) en améliorant les caractéristiques de la microflore qui y réside. En 1997, la notion d'action préventive et thérapeutique apparaît avec Charteris qui définit les probiotiques comme étant des *micro-organismes qui lorsqu'ils sont ingérés peuvent exercer un effet positif dans la prévention ou le traitement dans des conditions pathologiques spécifiques.* En 2001, Schrezenmeir & de Vrese incluent dans leur définition du probiotique l'aspect quantitatif, la notion de caractérisation de la (ou des) souche(s) utilisée(s) et le fait que les effets observés doivent être supérieurs aux effets nutritionnels. Selon ces auteurs un probiotique est *une préparation ou un produit contenant des micro-organismes définis, viables, en nombre suffisant qui altèrent la microflore (par implantation ou colonisation) dans un compartiment de l'hôte et exercent ainsi des effets santé bénéfiques sur cet hôte.*

La FAO (*Food and Agriculture Organization*) des Nations Unies et le WHO (*World Health Organization*) ont établi des lignes directrices pour l'utilisation du terme probiotique dans les aliments (FAO/WHO, 2001). La définition des probiotiques du comité d'experts réunis par la FAO et le WHO en 2001 a été la suivante : *micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte.* Cette définition impose que le terme probiotique s'applique uniquement à des micro-organismes vivants ayant un effet bénéfique démontré, que les micro-organismes doivent non seulement survivre à leur passage dans le tube digestif mais également avoir la capacité d'y proliférer. Elle inclut également les micro-organismes vivants vecteurs de composés physiologiquement bénéfiques tels que par exemple les souches génétiquement transformées de *Lactococcus lactis* produisant de l'IL-10 (Steidler *et al.*, 2000). Au terme des exigences qu'englobe cette définition ne sont pas considérés comme probiotiques ni les micro-organismes vivants au moment de leur ingestion, qui ont un effet physiologique démontré, mais qui ne survivent pas au cours du transit digestif, ni les micro-organismes irradiés ou inactivés par la chaleur même si certains ont montré des effets thérapeutiques (AFSAA, 2003).

2. Modalités d'utilisation

Les probiotiques les plus fréquemment utilisés aussi bien chez l'homme que chez l'animal sont les bactéries lactiques, les bifidobactéries et les levures (*Saccharomyces boulardii* et *Saccharomyces cerevisiae*). Parmi les bactéries lactiques, les lactobacilles constituent le genre majeur et le plus utilisé, à côté duquel figurent également les genres streptocoque, enterocoque et lactocoque. Ces bactéries ou levures peuvent être présentes soit naturellement dans les aliments et notamment dans les produits laitiers fermentés ou apportés par des compléments alimentaires.

L'efficacité des probiotiques diffèrent en fonction de la souche considérée ainsi que des modalités d'utilisation. Ainsi, l'ingestion de différentes espèces d'un même genre bactérien et de différentes souches d'une même espèce n'ont pas les mêmes effets. De plus, une même souche peut avoir des effets différents en fonction du modèle pathologique dans lequel elle est utilisée. Par exemple, *Lactobacillus plantarum* DSM9843 est plus efficace dans la réduction de la colite induite par le methotrexate que *Lactobacillus reuteri* RL2C (Mao *et al.*, 1996) alors qu'il n'a aucun effet sur la colite induite par le TNBS (Kennedy *et al.*, 2000).

Ensuite, du fait que les effets observés mettent en jeu soit les composants de la paroi bactérienne, soit l'ADN bactérien, soit des enzymes ou des métabolites bactériens, le débat actuel repose sur la nécessité ou non d'utiliser des micro-organismes vivants. Des bactéries mortes, des produits de fermentation ou encore l'ADN bactérien peuvent en effet être actifs dans certains cas, alors qu'inversement la bactérie vivante et physiologiquement active sera absolument nécessaire dans d'autres. Par exemple, *Lactobacillus rhamnosus* GG utilisé vivant supprime l'internalisation d'*E. coli* entéropathogène (EPEC) sur des lignées cellulaires coliques humaines, mais cet effet suppressif n'est pas observé si *L. rhamnosus* GG est inactivé par la chaleur, de même les surnageants de culture de ce lactobacille sont inactifs (Hirano *et al.*, 2003). Le cocktail VSL#3 (*Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Bifidobacterium longum*, *B. brevis*, *B. infantis* et *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*) vivant ou irradié est efficace dans la colite au DSS et au TNBS chez la souris, mais

Situation pathologique	Traitement	Dose (ufc/j)	N	Durée du traitement	Taux de rechute	Références
MC	<i>S. doular dii</i> vs placebo		18	16 semaines		Plein & Holtz, 1993
MC	<i>E.coli</i> Nissle 1917 vs placebo		28	12 mois	30% vs 70%	Malchow <i>et al.</i> , 1997
MC quiescente	<i>S. doular dii</i> +mesalazine vs mesalazine		32	6 mois	1/16 vs 6/16	Guslandi <i>et al.</i> , 2000
MC quiescente	L.GG vs placebo	12.10 ¹²	45	12 mois	Inefficace	Prantera <i>et al.</i> , 2002
RCH quiescente	<i>E.coli</i> Nissle 1917 vs mesalazine	5.10 ¹⁰	120	3 mois	Inefficace	Kruis <i>et al.</i> , 1997
RCH quiescente	VSL#3	5.10 ¹¹	15	12 mois	15%	Venturi <i>et al.</i> , 1999
RCH active	<i>E.coli</i> Nissle 1917 vs mesalazine	5.10 ¹⁰	116	12 mois	Inefficace	Rembacken <i>et al.</i> , 1999
Pochite récidivante	VSL#3 vs placebo	5.10 ¹¹	40	9 mois	15% vs 85%	Gionchetti <i>et al.</i> , 2000
Pochite réfractaire	L. GG	2.10 ¹⁰		3 mois	Inefficace	Kuisma <i>et al.</i> , 2003
Pochite réfractaire	VSL#3 vs placebo	2.10 ¹⁴	40	12 mois	15% vs 94%	Mimura <i>et al.</i> , 2004
AIA	VSL#3 vs placebo	2.10 ¹²	40	12 mois	10% vs 40%	Gionchetti <i>et al.</i> , 2003

Tableau IV : Effets des probiotiques au cours de différentes situations pathologiques inflammatoires chez l'homme (synthèse d'après la littérature). MC : maladie de Crohn ; RCH : rectocolite hémorragique ; AIA : anastomose iléo-anale ; N : nombre de patients

Modèles de colite	Souche	Dose (ufc/j)	Voie administration	Traitement et durée	Effet	Références
Acide acétique (rat)	<i>L. reuteri</i> R2LC <i>L. reuteri</i> HLC	35.10 ⁷	Intra-colique	Curatif	+	Fabia <i>et al.</i> , 1993
Acide acétique (rat)	<i>L. reuteri</i> R2LC L. GG	3.10 ⁹	per os per os	Curatif	+	Holma <i>et al.</i> , 2001
Methotrexate (rat)	<i>L. plantarum</i> DSM9843* <i>L. reuteri</i> R2LC*	4.10 ⁹	perfusion gastrique	Curatif 6 jours	+	Mao <i>et al.</i> , 1996
Iodoacétamide (rat)	VSL#3 L.GG	3.10 ⁹ 1.10 ¹⁰	per os per os	P (7j)+C(7j) P (7j)+C(7j)	+	Shibolet <i>et al.</i> , 2002
DNBS (rat)	VSL#3 L.GG	3.10 ⁹ 1.10 ¹⁰	per os per os	P (7j)+C(7j) P (7j)+C(7j)	-	Shibolet <i>et al.</i> , 2002
TNBS (rat)	<i>L. plantarum</i> DSM9843*	1.10 ⁹	per os	P (7j)+C(1j)	-	Kennedy <i>et al.</i> , 2002
TNBS (rat)	VSL#3 VSL#3 irradié VSL#3 inactivé chaleur	2.8.10 ⁸ 4.5.10 ¹¹ 2.8.10 ⁸	per os per os per os	P (10j)+C(7j) P (10j)+C(7j) P (10j)+C(7j)	+	Rachmilevitz <i>et al.</i> , 2004
DSS chronique (souris)	<i>L. lactis</i> LL-mIL-10	2.10 ⁷	per os	à J+21 C(14j)		Steidler <i>et al.</i> , 2000
DSS (rat)	VSL#3 VSL#3 irradié VSL#3 inactivé chaleur	2.8.10 ⁸ 4.5.10 ¹¹ 2.8.10 ⁸	sous-cutannée sous-cutannée sous-cutannée	2 h avant 2 h avant 2 h avant	+	Rachmilevitz <i>et al.</i> , 2004
DSS (rat)	<i>L. plantarum</i> DSM9843° <i>L. paracasei</i> DSM13434° <i>L. gasseri</i> 5B3° <i>Bifidobacterium</i> sp. 3B1° <i>B. infantis</i> DSM 15158°	6.10 ⁹ 6.10 ⁹ 6.10 ⁹ 6.10 ⁹ 6.10 ⁹	per os per os per os per os per os	P (7j)+C(7j) P (7j)+C(7j) P (7j)+C(7j) P (7j)+C(7j) P (7j)+C(7j)	+	Osman <i>et al.</i> , 2004
souris IL-10 ^{-/-}	<i>L. lactis</i> LL-mIL-10	2.10 ⁷		P		Steidler <i>et al.</i> , 2000
souris IL-10 ^{-/-}	VSL#3	2.8.10 ⁸	per os	C(4semaines)	+	Madsen <i>et al.</i> , 2001
souris IL-10 ^{-/-}	<i>L. salivarius</i> UCC433118*	1.10 ⁹	per os	P(16semaines)	-	O'Mahony <i>et al.</i> , 2001
souris IL-10 ^{-/-}	<i>L. plantarum</i> DSM9843	1.10 ⁹ 1.10 ⁹	eau de boisson eau de boisson	C (4semaines) P (6semaines)	-	Schultz <i>et al.</i> , 2002
souris IL-10 ^{-/-}	<i>L. salivarius</i> UCC433118° <i>B. infantis</i> 35624°	1.10 ⁹ 1.10 ⁸	per os per os	P(19semaines) P(19semaines)	+	McCarthy <i>et al.</i> , 2003
souris IL-10 ^{-/-}	<i>L. salivarius</i> 118		sous-cutannée	P(19semaines)	+	Sheil <i>et al.</i> , 2004

Tableau V : Effets des probiotiques dans différents modèles de colite expérimentale (synthèse d'après la littérature). * matrice fibres d'avoine, ° matrice lait ; per os = gavage gastrique ; P=préventif (avant la colite) ; C=curatif (après la colite)

ce même cocktail inactivé par la chaleur s'avère inactif dans ces deux modèles de colite expérimentale (Rachmilevitz *et al.*, 2004).

De plus, la question de l'utilisation des probiotiques en mono-association ou en pluri-association est également à l'ordre du jour. Ainsi, les effets anti-inflammatoires observés par le cocktail VSL#3 sur différents modèles de colites expérimentales (Madsen *et al.*, 2001 ; Rachmilevitz *et al.*, 2004) ont également été rapportés avec des bactéries administrées en mono-association sur ces mêmes modèles (Schultz *et al.*, 2002 ; Osman *et al.*, 2004).

Enfin, si la voie orale constituant la voie classique d'administration est généralement adoptée, certains probiotiques semblent toutefois pouvoir exprimer leurs effets après une administration par voie parentérale (Sheil *et al.*, 2004 ; Rachmilevitz *et al.*, 2004).

3. Probiotiques et inflammation digestive

Les études réalisées chez l'homme dans le cadre des MICI et chez l'animal à l'aide de modèles de colites expérimentales, en utilisant différents probiotiques, soulignent la variabilité de l'efficacité de ces derniers. L'ensemble des principales études est répertorié dans les Tableaux IV et V. Toutefois, bien que les mécanismes d'action ne soient pas encore parfaitement élucidés à l'heure actuelle, plusieurs ont été suggérés afin d'expliquer les effets protecteurs des probiotiques dans l'inflammation digestive. Ces derniers peuvent être classés en trois points (i) suppression de la croissance et/ou de l'adhésion/invasion des bactéries entériques pathogènes, (ii) amélioration des fonctions de la barrière épithéliale, (iii) activité immunorégulatrice.

3.1. Modulation de la flore endogène

Les effets des probiotiques sur la composition de la flore endogène en situation inflammatoire sont paradoxalement assez mal connus. Seules

quelques études font état des modulations de la microflore intestinale par les probiotiques.

Ainsi dans le modèle de colite induite par le méthotrexate, un traitement par *L. reuteri* et *L. plantarum* induit une augmentation de la population des lactobacilles et une diminution des flores totales aérobies et anaérobies, des entérobactéries et des anaérobies Gram négatif (Mao *et al.*, 1996). Dans le modèle de colite spontanée chez les souris IL-10 déficientes, un traitement par *L. reuteri* en phase précoce (avant le développement des lésions) se traduit par une restauration de la population des lactobacilles et une réduction du niveau de bactéries aérobies adhérant ou envahissant la muqueuse colique (Madsen *et al.*, 1999). Dans le même modèle, en phase établie de la colite, *L. salivarius spp salivarius* diminue le niveau des entérocoques, des coliformes fécaux et de *Clostridium perfringens* dans le contenu colique (O'Mahony *et al.*, 2001). Les modifications de la microflore intestinale et plus particulièrement la diminution du nombre de lactobacilles observée lors d'une colite induite par le DSS chez la souris, sont rétablies par un traitement oral de *B. longum* (Fujiwara *et al.*, 2003). Enfin, *Bifidobacterium infantis* réduit la croissance de *Bacteroides vulgatus* chez la souris (Shiba *et al.*, 2003). De même, la concentration fécale de *Bacteroides vulgatus* est réduite chez des patients atteints de RCH, après une consommation d'un an de lait fermenté par des bifidobactéries (Ishikawa *et al.*, 2003).

Le mécanisme exact par lequel les probiotiques exercent cet effet modulateur sur la flore endogène n'est toutefois pas connu. En revanche, il est maintenant bien établi que la plupart des lactobacilles et des bifidobactéries (i) réduit la croissance des bactéries pathogènes en diminuant le pH luminal via la production d'acides gras volatils (Kruis *et al.*, 1997; Venturi *et al.*, 1999), et/ou en sécrétant des substances anti-bactériennes, (ii) prévient l'adhérence à l'épithélium de ces pathogènes.

3.1.1. Effets anti-bactériens

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques à l'égard des micro-organismes pathogènes a été démontrée *in vivo*, principalement dans des modèles murins en utilisant des souris axéniques ou conventionnelles infectées par des souches de salmonelles ou d'*E. coli* (Hudault *et al.*, 1997 ; Bernet-Camart *et al.*, 1997; Coconnier *et al.*, 1997 ; Suzuki *et al.*, 1997 ; Lievin *et al.*, 2000 ; Shu & Gill, 2002 ; Mangell *et al.*, 2002).

Les bactéries lactiques sont capables de produire un certain nombre de métabolites capables d'inhiber la prolifération d'autres bactéries, voire de bactéries de la même espèce. Parmi ces substances figurent, l'acide lactique et autres acides organiques, l' H_2O_2 , l'éthanol ainsi que des bactériocines ou autres composés (pour revue voir Servin & Coconnier, 2003). Ainsi, outre la capacité de diminuer le pH luminal observée chez la plupart des lactobacilles et des bifidobactéries (Kruis *et al.*, 1997; Venturi *et al.*, 1999), l'une des capacités des probiotiques recherchée est celle de produire des substances anti-microbiennes comme les bactériocines.

La production de bactériocine a été montrée chez *L. acidophilus* AC1 (Mehta *et al.*, 1983) et *L. salivarius* UCC118 (Flynn *et al.*, 2002). Chez ce dernier, celle-ci a été caractérisée génétiquement et nommée ABP-118. Par ailleurs, *L. GG* libère un composé antibactérien (Silva *et al.*, 1987) qui a également été retrouvé dans le surnageant de culture de *L. acidophilus* LB et *L. acidophilus* La1 (Bernet-Camart *et al.*, 1997 ; Coconnier *et al.*, 1997). Ce composé, insensible aux protéases et indépendant de la production d'acide lactique ou acétique, est actif contre un grand nombre de bactéries Gram négatif et Gram positif mais inactif contre les lactobacilles et les bifidobactéries.

3.1.2. Effets sur l'adhésion et l'invasion des entéropathogènes

La capacité des probiotiques à inhiber l'adhésion et l'invasion des micro-organismes pathogènes a été largement étudiée *in vitro* (pour revue voir Servin & Coconnier, 2003).

Ainsi, *E. coli* Nissle 1917 inhibe *in vitro* l'adhésion et l'invasion des cellules intestinales (intestine-407) par différentes souches d' *E. coli* isolées de patients atteints de la maladie de Crohn (Boudeau *et al.*, 2003). L'adhésion de *L. plantarum* et de *L.GG* aux cellules épithéliales HT29 se traduit par une augmentation de la sécrétion de mucines extracellulaires *MUC2* et *MUC3* impliquées dans l'inhibition de l'adhésion d'*E. coli* entéropathogène (EPEC) sur ces cellules (Mack *et al.*, 1999, 2003) et une diminution de la translocation bactérienne associée (Mattar *et al.*, 2002).

L'inhibition par les probiotiques de l'attachement de certains pathogènes peut se faire par encombrement stérique (Neeser *et al.*, 2000; Lee & Puong, 2002). Un facteur protéique produit par des souches de bifidobactéries et qui inhibe l'attachement de souches d'*E. coli* entérotoxinogènes a été décrit (Fujiwara *et al.*, 1997). Certains lactobacilles et notamment *L. fermentum* RC-14 libèrent des composants protéiques de surface pouvant inhiber l'adhésion d'*E. faecalis* 1131 (Heinemann *et al.*, 2000).

3.2. Régulation de la barrière intestinale

In vivo, un effet protecteur des probiotiques sur les modifications de la perméabilité intestinale observées en conditions inflammatoires a été rapporté.

Ainsi, une réduction de l'augmentation de la perméabilité intestinale a été observée après un traitement par *L. reuteri* RL2C et *L. reuteri* HLC dans le modèle de colite induite par l'acide acétique chez le rat (Fabia *et al.*, 1993), par *L. reuteri* R2LC et *L. plantarum* dans le modèle de gastro-entérite induite par le methotrexate (Mao *et al.*, 1996) et par le cocktail VSL#3 dans le modèle de colite spontanée chez la souris IL-10 déficiente (Madsen *et al.*, 2001).

Les altérations de la perméabilité intestinale sont pour la plupart le résultat de dommages cellulaires provoqués par des bactéries entéropathogènes et/ou entéroinvasives (Sears *et al.*, 2000). Ces dernières diminuent la résistance transépithéliale et modifient les protéines de jonction et du cytosquelette. Il a été montré *in vitro* que certains probiotiques prévenaient ces effets et par conséquent atténuaient les altérations de la perméabilité intestinale qui en résultent.

Ainsi, *Saccharomyces boulardii* (Czerucka *et al.*, 2000), *L. acidophilus*, *S. streptococcus* (Resta-Lenert & Barret, 2003) et *L. GG* vivant ou son surnageant de culture (Khaled *et al.*, 2003) préviennent la diminution de la résistance transépithéliale des cellules épithéliales *in vitro* induite par des souches d'*E. coli* entéropathogènes (EPEC), entéroinvasives (EIEC) et isolées de patients atteints de la MC, respectivement. Par ailleurs en l'absence de challenge, *L. acidophilus* et *S. streptococcus* (Resta-Lenert & Barret, 2003) augmentent la résistance transépithéliale des cellules *in vitro*, de même que le cocktail VSL#3 qui renforce les jonctions serrées (Madsen *et al.*, 2001 ; Otte & Podolsky, 2004).

L'effet des probiotiques sur la résistance transépithéliale est en effet généralement accompagné par un maintien de l'intégrité fonctionnelle du cytosquelette et des jonctions serrées et par conséquent de la perméabilité paracellulaire. *L. acidophilus* et *S. streptococcus* vivants (et non lorsqu'ils sont inactivés par la chaleur) préviennent les modifications de la perméabilité induites par les EIEC en évitant la déphosphorylation des protéines de jonctions et du cytosquelette (Resta-Lenert & Barret, 2003). La capacité de ces probiotiques à prévenir la redistribution de l'actine, de l'occludine et de la ZO-1, serait en partie liée à la modulation de la voie de signalisation intracellulaire incluant les MAP-kinase et les Rho-GTPases (Trivedi *et al.*, 2003). La rupture du cytosquelette d'actine associée à l'adhésion de souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de la MC est également prévenue par *L. GG* (Khaled *et al.*, 2003). De même, *L. plantarum* exerce un effet bénéfique contre une souche d'*E. coli* EPEC qui endommage les protéines des jonctions serrées (Wonodi & Panigrahi 2003).

3.3. Effets des probiotiques sur la translocation bactérienne

Les effets probants des probiotiques sur l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes Gram négatif, et sur la stabilisation de la barrière épithéliale peuvent également s'accompagner par une protection de l'intestin de la translocation bactérienne. Ainsi, certains probiotiques inhiberaient la translocation d'*E. coli in vitro* sur des cellules épithéliales coliques Caco-2 (*L. GG* de manière dose-dépendante ; Mattar *et al.*, 2001) et atténueraient la translocation bactérienne dans des modèles expérimentaux d'entérocolite (*L. plantarum*, *L. reuteri* ; Mao *et al.*, 1996), de colite spontanée chez les souris IL-10 déficientes (VSL#3 ; Madsen *et al.*, 1999), de colite au TNBS (*L. plantarum* ; Pavan *et al.*, 2003) et de colite au DSS (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium spp* ; Osman *et al.*, 2004). A l'inverse, *L. plantarum* 299v n'a pas d'effet ni sur la perméabilité intestinale ni sur la translocation bactérienne dans le modèle de colite au TNBS chez le rat (Kennedy *et al.*, 2000).

3.4. Immunomodulation

Le rôle des probiotiques dans le renforcement de la barrière immunitaire se traduit globalement par une stimulation de la production des IgA, une induction de l'expression et de la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires et une diminution de l'expression et de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.

3.4.1. Probiotiques et IgA

Les probiotiques augmentent la production d'IgA au niveau intestinal en conditions physiologiques et pathologiques. Par exemple, une augmentation des IgA a été observée chez la souris après un traitement par *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbruekii* (Perdigon *et al.*, 1995) et *B. lactis* (Fukushima *et al.*, 1999). Un traitement par *B. lactis* ou *L. rhamnosus* suivi d'un challenge avec une souche d'*E. coli* entérohémorragique (EHEC) se traduit chez les

souris traitées par le probiotique par une augmentation des IgA (Shu & Gill, 2001). De même, un traitement avec *L. GG* renforce la réponse immunitaire intestinale en stimulant la production d'IgA chez des enfants souffrant de diarrhée à rotavirus (Kaila *et al.*, 1992) et chez des enfants souffrant de la maladie de Crohn (Malin *et al.*, 1996).

3.4.2. Profils des cytokines

Chez les patients atteints de MICI, les niveaux d'expression d'IL-8 sont corrélés avec la phase active de la pathologie (Banks *et al.*, 2003). L'étude des interactions entre les cellules épithéliales et les probiotiques montre que certains lactobacilles vivants ou inactivés par la chaleur, adhèrent de manière souche-dépendante aux cellules Caco-2 et que ce contact n'induit pas de production d'IL-6 et d'IL-8 (Mirota *et al.*, 2002). De même, le cocktail VSL#3 (Madsen *et al.*, 2001), les débris ou les extraits cellulaires des souches le constituant (Lammers *et al.*, 2002; Otte & Podolsky, 2004), ou leur ADN bactérien (Jijon *et al.*, 2004) n'induisent pas de production d'IL-8 dans les surnageants de cultures des cellules épithéliales humaines HT29/19A. A l'inverse, les débris ou les extraits cellulaires d'*E. coli* Nissle 1917 induisent la production d'IL-8 par les cellules épithéliales humaines HT29/19A (Lammers *et al.*, 2002 ; Otte & Podolsky, 2004). Par conséquent, il semblerait que les bactéries Gram positif (lactobacilles, VSL#3) et *E. coli* Nissle 1917 (Gram négatif) interagissent différemment avec les cellules de l'hôte. Ceci impliquerait des différences dans la voie de reconnaissance par les TLRs (Otte & Podolsky, 2004). Par ailleurs, *in vitro* VSL#3 ou son ADN bactérien inhibent la sécrétion épithéliale d'IL-8 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires, comme le TNF- α en inhibant la dégradation de l'I- κ B et par conséquent l'activation du NF- κ B (Madsen *et al.*, 2001; Jijon *et al.*, 2004).

VSL#3 ou son ADN bactérien réduisent également le taux de TNF- α et d'IFN- γ au niveau de la muqueuse colique dans le modèle de colite spontanée chez les

souris IL-10 déficientes (Madsen *et al.*, 2001; Jijon *et al.*, 2004) en atténuant l'activation du NF- κ B (Madsen *et al.*, 2001).

D'autres travaux ont également rapporté la capacité des probiotiques à réduire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et/ou à maintenir voire à augmenter la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires. Ainsi, dans le modèle de colite spontanée chez les souris IL-10^{-/-}, lorsque la colite est établie, un traitement par *L. plantarum* 299v réduit la production d'IL-12 (indicateur de l'activation des macrophages) et la production d'IFN- γ (indicateur de la présence de lymphocytes Th1 fonctionnels) au niveau de la muqueuse colique (Schultz *et al.*, 2002). En revanche, lorsque *L. plantarum* est administré en traitement préventif (avant l'établissement de la colite) ou lorsque les souris IL-10^{-/-} axéniques sont colonisées par *L. plantarum*, cette production cytokinique demeure inchangée (Schultz *et al.*, 2002). Les antigènes bactériens solubles issus de *E. coli* LAVES sont efficaces dans la diminution de la production de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'INF- γ lors d'une colite induite par le DSS chez les souris Balb/c et d'une colite établie chez les souris CH3/ IL-10^{-/-} (Konrad *et al.*, 2003). Une réduction au niveau systémique et muqueux de la production de cytokines pro-inflammatoires, le maintien de la production de TGF- β et l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 ont été observés dans le modèle de colite spontanée chez les souris IL-10^{-/-} après traitement par *L. salivarius* ou par *B. infantis* (McCarthy *et al.*, 2003) et le modèle de colite chez les rats HLA-B27 traités par *L. GG* (Dieleman *et al.*, 2003).

Des résultats similaires ont été observés dans des études conduites *ex vivo* montrant la capacité de certains probiotiques à induire la production d'IL-10 et de TGF- β et la suppression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF- α et l'INF- γ dans des biopsies issues de patients atteints de la maladie de Crohn (Borruel *et al.*, 2003), présentant une recto-colite hémorragique active (Pathmakanthan *et al.*, 2004) ou de patients souffrant de pouchites (Ulisse *et al.*, 2001).

Les effets des différents probiotiques sur les profils cytokiniques peuvent résulter d'une implication des cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) hautement spécialisées du système immunitaire intestinal (pour revue voir Stagg *et al.*, 2003) et sont les seules CPAg capables d'activer les cellules T naïves (Matzinger, 1994). L'expression des molécules co-stimulatrices sur les CD, permettant leur interaction avec les lymphocytes T, est induite par les micro-organismes (via leur PAMPs) et les cytokines. Cependant, le type d'antigène initiant la réponse, l'état de maturation des CD et la durée de leur activation sont autant de facteurs susceptibles d'agir sur la différenciation des cellules T naïves et la polarisation de la réponse (Banchereau *et al.*, 2000 ; Langenkamp *et al.*, 2000). Une stimulation répétée des CD inactivées et immatures peut préférentiellement induire la différenciation en Tr1 plutôt qu'en Th1 (Elson *et al.*, 2001). Les bactéries de la flore commensale intestinale qui sont quotidiennement phagocytées dans les plaques de Peyer et/ou les tissus lymphoïdes provoquent une réponse anti-inflammatoire qui prévient la maturation et l'activation des CD immatures (CDi). Ces dernières (CDi) sont impliquées dans la régulation de la tolérance vis-à-vis de la flore endogène en générant les populations de cellules T régulatrices (Khoo *et al.*, 1997 ; Stagg *et al.*, 2004). A l'inverse, en conditions pathologiques (i. e. infection, inflammation), les CD sont activées directement par l'agent pathogène ou par les signaux provenant des cellules épithéliales intestinales. Les CD alors matures (CDm) vont "driver" la différenciation fonctionnelle des cellules T et les signaux qu'elles émettent vont influencer la génération des réponses Th1 et Th2 (Moser & Murphy, 2000). Les CDm peuvent en effet produire de l'IL-12, de l'IL-18 et de l'IL-23 contribuant à une réponse Th1 (Macatonia *et al.*, 1995). Elles peuvent également produire de l'IL-4 (Kelleher *et al.*, 1999 ; d'Ostiani *et al.*, 2000) ou de l'IL-10 (Iwasaki *et al.*, 1999) et de ce fait contribuer à une réponse Th2 ou Th3. De plus, en répondant différemment (Th1 ou Th2) aux différents types de micro-organismes, les CD peuvent signaler la nature du pathogène (Pulendran *et al.*, 2001 ; de Jong *et al.*, 2002).

Il a été montré que les CD de la muqueuse de patients atteints de MICI sont activées (marqueurs de maturation fortement exprimés) par rapport à celles de sujets sains (Ikeda *et al.*, 2001 ; Vuckovic *et al.*, 2001). Des CD

activées ont également été observées dans les ganglions mésentériques dans un modèle de colite chez la souris (Malmstrom *et al.*, 2001). Par ailleurs, le blocage de l'interaction entre les CD activées et les cellules T par des anticorps dirigés contre les marqueurs de maturation prévient cette colite (Malmstrom *et al.*, 2001).

Il a été suggéré que les probiotiques puissent exercer leurs effets immunorégulateurs en partie en modulant la plasticité des CD intestinales (Hart *et al.*, 2002 ; Stagg *et al.*, 2004). Les probiotiques pourraient alors agir (i) en réduisant l'activation ou le recrutement des CD, par exemple en modulant la production de cytokines et chemokines par les cellules épithéliales intestinales, (ii) en influençant directement les CD, par exemple en induisant l'expression de cytokines anti-inflammatoires ou en diminuant l'expression des cytokines pro-inflammatoires par les CD, (iii) en agissant sur les populations des lymphocytes T en altérant la voie par laquelle les lymphocytes répondent au signal dérivant des CD.

Quelques travaux ont montré la capacité de certains probiotiques à induire la maturation des CD *in vitro* et à favoriser la production d'IL-10 par ces cellules. C'est le cas du cocktail VSL#3 et de ses composants bactériens (Drakes *et al.*, 2004), de *Bifidobacteria longum* (Rigby *et al.*, 2002) et de certains lactobacilles (Christensen *et al.*, 2002). A l'inverse, *L. rhamnosus* GG induit la maturation des CD accompagnée d'une faible expression des molécules de surface CD40 sans induire la production d'IL-10 (Braat *et al.*, 2004).

Toutefois, il a été montré que la sécrétion de cytokines par des CD murines activées *in vitro* par différents lactobacilles, varient non seulement en fonction de l'espèce, voire de la souche de lactobacille testée, mais également de la concentration bactérienne utilisée (Christensen *et al.*, 2002). Par exemple, de faibles concentrations en *L. casei* induisent d'importantes sécrétions d'IL-6, d'IL-12 et de TNF- α sans induire d'IL-10. A des concentrations plus fortes en *L. casei*, la production d'IL-10 augmente radicalement sans modification du niveau de production des autres cytokines. De manière intéressante, une des souches de *L. reuteri* inhibe

l'induction de l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α par *L. casei*, alors que la production de l'IL-10 n'est pas altérée. De la même manière, *L. reuteri* réduit la sur-expression de CD86 induite par *L. casei*. Ces résultats suggèrent que différentes souches de lactobacilles activent les CD de manière très différente et que certaines souches peuvent être capables d'inhiber l'activité d'autres souches de la même espèce.

En outre, en inhibant la production de l'IL-12 par les CD et en favorisant celle de l'IL-10, certains probiotiques peuvent renforcer l'induction des cellules T régulatrices à travers la modulation de la maturation des CD (Steinbrink *et al.*, 1997 ; Steinbrink *et al.*, 2002 ; Muller *et al.*, 2002). On pourrait même spéculer que les effets inhibiteurs de certains probiotiques pourraient mettre en jeu les TLRs des CD. En effet, la reconnaissance bactérienne (PAMPs) par les CD se fait grâce à leur PPRs et notamment leur TLRs (Jarrossay *et al.*, 2001 ; Kadowaki *et al.*, 2001 ; Krug *et al.*, 2001). La stimulation *in vitro* des CD par *L. plantarum* et *B. adolescentis* se traduit par une faible expression du TLR2 et du TLR4 à la surface des CD (Karlsson *et al.*, 2004). De plus, il a été rapporté que la bioactivité du LPS était liée à la configuration tridimensionnelle de l'un de ses composants, le lipide A, activant en fonction de sa configuration le TLR-2 (configuration cylindrique) ou le TLR4 (configuration conique) (Netea *et al.*, 2002). Aussi on peut envisager que certains probiotiques pourraient agir en altérant la configuration du LPS ou autre ligand des TLRs.

Toutefois à l'heure actuelle, les seules données relatives au dialogue probiotique-TLRs et la conséquence immunitaire qui en découle, concernent une étude impliquant l'ADN bactérien.

L'ADN bactérien contient des dinucléotides CpG non-méthylés présentant des propriétés immuno-stimulatrices, contrairement à l'ADN des cellules eucaryotes (Krieg *et al.*, 1995). Ce motif CpG non-méthylé est généralement présent à l'intérieur d'un hexamère palindromique (ISS). L'ISS-ADN ou son homologue synthétique l'oligodéoxynucléotide (ISS-ODN ou CpG-ODN) active l'immunité innée via le TLR9 (Krieg, 2002) et s'avère efficace dans le traitement de différents modèles de colite tels que la colite induite par le

DNBS chez la souris, la colite spontanée chez les souris IL-10 déficiente et la colite au DSS, en réduisant les taux d'IL-1 β et de TNF- α au niveau de la muqueuse colique (Rachmilewitz *et al.*, 2002). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'ADN bactérien du cocktail VSL#3 montrant l'implication des TLRs et plus particulièrement du TLR9 dans l'effet anti-inflammatoire de ce probiotique dans la colite au DSS, au TNBS et dans la colite spontanée chez les souris IL-10 déficientes (Rachmilewitz *et al.*, 2004).

4. Probiotiques et douleur viscérale

A l'heure actuelle aucune étude relative à l'évaluation de l'effet des probiotiques sur la douleur viscérale en général et sur l'hyperalgésie viscérale d'origine inflammatoire en particulier, n'est disponible dans la littérature. Toutefois quelques essais cliniques ont été conduits afin d'évaluer l'effet des probiotiques sur les troubles fonctionnels intestinaux (TFI) chez l'homme, pathologie dont le symptôme majeur est représenté par la douleur viscérale.

Ainsi, après 4 semaines de consommation journalière d'*E. faecium*, 81 % des sujets souffrant de TFI du groupe probiotique contre 41 % des patients du groupe placebo manifestent selon l'évaluation des médecins une amélioration de leurs symptômes (Gade & Thorn, 1989). Une étude randomisée en cross-over montre que 9 des 18 patients traités par *L. acidophilus* contre 1/18 dans le groupe placebo présentent une amélioration de l'ensemble des critères cliniques évalués (douleur abdominale, ballonnement ou gaz, nombre de selles journalières, leur consistance et leur contenu en mucus et l'état physique général) (Halpern *et al.*, 1996). Un traitement de 4 semaines par *L. plantarum* DSM 9843 réduit la flatulence chez des patients TFI par rapport au traitement placebo en revanche, les douleurs abdominales ont été réduites dans les 2 groupes (probiotique et placebo) (Nobaek *et al.*, 2000). Un traitement par ce même probiotique améliore les symptômes (douleur abdominale, normalisation des selles) chez les 20 sujets TFI traités par ce probiotique (Niedzielin *et al.*, 2001). A l'inverse, chez les 19 sujets d'une étude évaluant l'efficacité de *L.GG* dans l'amélioration des symptômes "TFI" aucune différence n'a été observée

entre le groupe recevant *L. GG* et le groupe placebo (O'Sullivan & O'Morain, 2000).

Des traitements comportant des bactéries en pluri-association ont également été testés chez les patients souffrant de TFI. Par exemple, la perfusion d'une suspension liquide contenant 18 bactéries (non spécifiées) dans le cæcum de sujets TFI améliore les symptômes de 25 patients sur 33 (Andrews & Borody, 1993). L'efficacité du cocktail VSL#3 a été testée chez 10 sujets présentant soit des TFI, soit une diarrhée fonctionnelle. Dans cette étude sans groupe contrôle, les 2 groupes de patients (TFI et diarrhée fonctionnelle) présentaient une amélioration clinique après traitement par VSL#3 et *L. plantarum* DSM 9843 (Brigidi *et al.*, 2001).

Néanmoins, bien que certains des traitements probiotiques testés dans ces différentes études semblent être efficaces dans la réduction des différents symptômes associés aux TFI, l'effet sur la douleur viscérale n'a pas été évalué. Par ailleurs, ces études restent critiquables quant à la caractérisation des populations "TFI" et le faible nombre de patients inclus. Par conséquent, il paraît encore hasardeux de conclure sur un quelconque effet, et des résultats plus probants sont souhaitables pour confirmer d'éventuels effets thérapeutiques des probiotiques dans les TFI.

5. *Lactobacillus farciminis*

Lactobacillus farciminis (*L. farciminis*) est une bactérie à Gram positif, micro-aérophile, catalase négative, en forme de bacilles fins en amas ou isolés, à extrémités carrées qui appartient au genre *Lactobacillus* du groupe homofermentaire strict des lactobactéries de la famille des bactéries lactiques. Il croît dans une plage de températures comprises entre 15 et 42 °C, avec une croissance optimale à 35 °C, à pH 7 (Reuter, 1970). Décrit et isolé à partir des saucisses (Reuter, 1970) il est identifié et déposé dans la collection allemande en 1983 sous le nom de *Lactobacillus farciminis* DSM20184 par Reuter. Ce lactobacille est naturellement présent dans les saucisses, les produits carnés

et le levain de panification. Il est également utilisé comme additif alimentaire en tant que ferment (Bioacarna®) dans l'industrie agro-alimentaire, et notamment pour la formation de la couleur et de la flaveur des produits de charcuterie, et en production animale pour les performances zootechniques (Bioacton®). A l'heure actuelle, il est disponible dans de nombreuses collections (DSM 20184, ATCC 29644...), pour nos travaux nous avons utilisé la souche de la collection de l'Institut Pasteur : CIP 103136.

L. farciminis produit du NO *in vitro* à partir de la réduction des nitrites par une nitrite réductase (Wolf *et al.*, 1990). Cette propriété est également connue pour d'autres bactéries. Ainsi *Propionabacterium acidipropionici* Pa1 (Avice *et al.*, 1999) et *L. fermentum* LFI (Xu *et al.*, 2001) sont capables de réduire les nitrates en nitrites et en NO.

Le NO peut aussi être produit par d'autres bactéries par une stimulation de la NO synthase inductible. Par exemple, à travers son acide lipoteichoïque, *L. GG* vivant ou inactivé par la chaleur est capable d'activer la iNOS et donc d'induire *in vitro* de bas niveaux de production de NO dans les lignées cellulaires de macrophages murins J774 en présence de la stimulation d'INF- γ , et dans les cellules épithéliales coliques humaines T84 en présence de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , INF- γ) (Korhonen *et al.*, 2001). Enfin, *L. acidophilus* induit l'activation de cytokines pro-inflammatoires et la production de NO dans les macrophages péritonéaux murins alors que *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. reuteri* et *Bifidobacterium* Bf-1 les atténuent (Tejada-Simon *et al.*, 1999). En revanche, aucune de ces souches n'altère la production de NO dans les leucocytes issus des plaques de Peyer et de la rate.

Etant donné le rôle protecteur attribué au NO exogène sur l'inflammation digestive des voies hautes (Kitagawa *et al.*, 1989 ; MacNaughton *et al.*, 1990 ; Larauche *et al.*, 2003) et basses (Wallace *et al.*, 1999), notre choix s'est porté vers *Lactobacillus farciminis* en tant qu'agent probiotique délivrant du NO de façon exogène. Ce choix a également été motivé par le fait qu'il s'agisse d'une bactérie naturellement présente dans les produits agro-alimentaires, facile à cultiver (souche aéro-anaérobie facultative) et facilement disponible.

Partie 2

Objectifs et Résultats

Objectifs de l'étude

L'objectif de ce travail était de proposer, à l'aide d'un modèle expérimental d'inflammation colique, une évaluation des potentialités thérapeutiques d'une souche bactérienne en vue de son utilisation en thérapeutique humaine.

Notre choix s'est porté sur *Lactobacillus farciminis* en raison de sa capacité à libérer du monoxyde d'azote (NO) *in vitro*. Le NO endogène jouant un rôle prépondérant dans la défense de la muqueuse digestive, nous avons donc étudié si le NO apporté de manière exogène présentait des effets anti-inflammatoires.

Au vu des effets biologiques observés à l'aide d'un donneur chimique de NO, nous avons, après avoir mis en évidence la capacité de *L. farciminis* de libérer du NO *in vivo*, tenté d'évaluer et de clarifier les propriétés anti-inflammatoires NO-dépendantes de ce lactobacille.

Le potentiel thérapeutique de cette souche a ensuite été examiné sur un modèle d'hypersensibilité viscérale d'origine inflammatoire.

*Résultats
expérimentaux*

RESULTAT 1

Le monoxyde d'azote libéré par *Lactobacillus farciminis* réduit la sévérité d'une colite induite par le TNBS chez le rat

Le monoxyde d'azote libéré par *Lactobacillus farciminis* réduit la sévérité d'une colite induite par le TNBS chez le rat

Scand J Gastroenterol 2003 ; 38 : 37-45.

Résumé

Des effets bénéfiques des lactobacilles ont été rapportés dans le traitement de colites expérimentales. Par ailleurs, malgré le rôle controversé du monoxyde d'azote (NO) dans les processus inflammatoires digestifs, un effet protecteur du NO exogène dans l'inflammation a été rapporté. Par conséquent, l'objectif de cette étude a été de déterminer les effets (i) d'un donneur chimique de NO, le nitroprussiate de sodium (SNP), (ii) d'un traitement par *Lactobacillus farciminis*, qui produit du NO *in vitro*, sur une colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique TNBS chez le rat et, (iii) d'évaluer le rôle du NO exogène ainsi apporté dans ces effets.

Matériel et méthodes : Les animaux (rats mâles Wistar) ont été divisés en trois groupes recevant : (i) une perfusion intra-colique (IC) en continue de SNP (1 mg / kg / j, groupe 1), (ii) une administration orale de *Lactobacillus farciminis* (10^{12} ufc / j, groupe 2) ou (iii) du NaCl (0,09 %, groupe 3). A J1 pour le groupe 1 et J15 pour le groupe 2, le TNBS ou le NaCl ont été administré par voie IC suivi par une perfusion en continue de NaCl ou d'hémoglobine (Hb) un piègeur de NO. A la fin des traitements, les paramètres suivants ont été évalués : lésions macroscopiques de la muqueuse colique, activité de la myéloperoxydase (MPO), activité des NO synthases (NOS) et production de NO dans la lumière colique.

Résultats : Chez les rats ayant reçu le TNBS, les traitements par le SNP et par *Lactobacillus farciminis* ont significativement ($P < 0,05$) réduit les scores lésionnels macroscopiques et les activités de la MPO et de la NOS inductible en comparaison avec les animaux témoins. La perfusion d'hémoglobine a aboli les effets anti-inflammatoires des traitements des deux donneurs de NO, mais n'a pas eu d'effet propre sur la colite.

Conclusion : Le NO libéré dans la lumière colique par perfusion de SNP ou par le traitement oral par *Lactobacillus farciminis* améliore la colite induite par le TNBS. Ces résultats indiquent un rôle protecteur d'un apport exogène de NO dans l'inflammation colique et montre pour la première fois un mécanisme impliquant la libération de NO par une souche bactérienne dans la réduction d'une colite expérimentale.

Nitric Oxide Released by *Lactobacillus farciminis* Improves TNBS-induced Colitis in Rats

F. Lamine, J. Fioramonti, L. Bueno, F. Nepveu, E. Cauquil, I. Lobysheva, H. Eutamène & V. Théodorou

Neuro-Gastroenterology and Nutrition Unit, INRA, Toulouse, France; Laboratoire Pharmacophores Redox Toulouse 3 University, Toulouse, France; Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan, Toulouse, France

Lamine F, Fioramonti J, Bueno L, Nepveu F, Cauquil E, Lobysheva I, Eutamène H, Théodorou V. Nitric oxide released by *Lactobacillus farciminis* improves TNBS-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:37–45.

Background: Beneficial effects of lactobacilli have been reported in experimental colitis. On the other hand, despite the controversial role of nitric oxide (NO) in the inflammatory gut process, a protective action of exogenous NO in inflammation has been suggested. Consequently, this study aimed to determine the effect of (i) sodium nitroprusside (SNP), a NO donor and (ii) treatment with *Lactobacillus farciminis*, which produces NO in vitro, on trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis in rats and to evaluate the role of exogenous NO in this effect. **Methods:** Rats were divided into three groups receiving one of the following: (i) a continuous intracolonic (IC) infusion of SNP for 4 days, (ii) *L. farciminis* orally for 19 days, or (iii) saline. On day 1 and day 15, respectively, TNBS and saline were administered IC, followed by a continuous IC infusion of saline or haemoglobin, a NO scavenger. At the end of treatments, the following parameters were evaluated: macroscopic damage of colonic mucosa, myeloperoxidase and nitric oxide synthase activities and colonic luminal NO production. **Results:** In colitic rats, SNP and *L. farciminis* treatment significantly ($P < 0.05$) reduced macroscopic damage scores, myeloperoxidase and nitric oxide synthase activities compared to controls. Haemoglobin infusion abolished the anti-inflammatory effect of both NO donor treatments, but had no effect per se on colitis. **Conclusion:** NO released intraluminally by SNP infusion or by *L. farciminis* given orally improves TNBS-induced colitis in rats. These results indicate a protective role of NO donation in colonic inflammation and show for the first time a mechanism involving NO delivery by a bacterial strain reducing an experimental colitis.

Key words: Inflammation; nitric oxide; probiotic

Vassilia Theodorou, Ph.D., INRA, Neuro-gastroenterology and Nutrition Unit, 180 chemin de Tournefeuille, BP3, F-31931 Toulouse cedex 9, France (fax. +33 561 28 51 45, e-mail. vtheodor@toulouse.inra.fr)

Inflammatory bowel diseases (IBD) are multifactorial disorders whose aetiology remains unknown. Among the numerous agents involved in this inflammatory process, nitric oxide (NO) seems to play an important role. NO concentrations and NO synthase (NOS) activities have been found dramatically increased in colonic mucosa of ulcerative colitis and Crohn disease patients (1–4). This increase in NO production has been considered deleterious, since inhibition of NO synthases has been found to reduce experimental colitis in rodents (5, 6). Similarly, genetic ablation of iNOS conferred a significant resistance to trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)-induced colonic damage and lethality to mice compared to wild-type mice (7). However, the role of NO in intestinal inflammation remains controversial. For example, several iNOS inhibitors did not modify histological inflammatory scores in a spontaneous ulcerative colitis in rhesus monkeys (8). Contrary to the

results of Zingarelli et al. (7), it has been shown that iNOS-deficient mice have increased macroscopic colonic inflammation for 72 h after TNBS instillation compared with wild-type mice (9). It has also been shown that aminoguanidine, a selective iNOS inhibitor, increases colonic damage and inflammatory response to TNBS (10).

Interestingly, the anti-inflammatory action of the mesalamine-modified molecule, NO mesalamine, infused in the colon of TNBS-treated rats is greater than mesalamine itself. This greater efficacy of NO mesalamine has been attributed to the NO delivered in the colonic lumen (11). An anti-inflammatory action of NO delivered in the lumen of the digestive tract has already been found at gastric level (12, 13).

On the other hand, despite some negative data (14), there is now abundant literature showing that probiotics might be a promising therapeutic alternative in the treatment of IBD (15). Encouraging results have been obtained in the therapy of

IBD using lactobacilli (16), *Escherichia coli* Nissle 1917 (17, 18), *Saccharomyces boulardii* (19), or VSL#3, a cocktail of probiotic strains (20). Similarly, exogenous administration of several lactobacilli strains has been found to reduce the severity of experimental colitis in animals (21–23). The mechanisms involved in the anti-inflammatory action of probiotics remain speculative and are based on certain general properties of the protective bacteria, such as prevention of overgrowth of pathogenic microorganisms (22), or stimulation of the intestinal immune defence system (24, 25). A recent original approach in the probiotic treatment of colitis was the use of bacteria as carrier of an anti-inflammatory compound which will be delivered in the colonic lumen. Steidler et al. (26) were therefore able to reduce experimental colitis in mice with a bacteria genetically engineered to secrete the anti-inflammatory cytokine interleukin-10.

According to the possible anti-inflammatory action of NO delivered in the colonic lumen, we searched for bacteria capable of producing NO spontaneously. *Lactobacillus farciminis* is a strain, currently found in some foods, producing NO from nitrite reduction in vitro conditions (27). The first step in this study was to determine the effect of exogenous NO released by sodium nitroprusside (SNP), a chemical NO donor, in TNBS-induced colitis. The second step was to verify the ability of *Lactobacillus farciminis* to produce NO in vivo in the colonic lumen, and then to determine whether it reduces TNBS-induced colitis and whether this effect is NO-mediated.

Methods

Animal preparation and treatment

Male Wistar rats weighing between 200 and 250 g were obtained from Harlan (Gannat, France), individually housed in polypropylene cages and kept in a temperature-controlled room (21 ± 1 °C). They were allowed free access to water and fed standard pellets (U.A.R., Epinay/Orge, France). The Local Animal Care and Use Committee approved all experimental protocols described in this study.

Sodium nitroprusside and TNBS colitis

In a first series of experiments, 7 groups of 10 rats were used. The rats were anaesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of acepromazine (Calmivet, Vetiquol, Lure, France) and ketamine (Imalgene 1000, Rhône-Mérieux, Lyon, France) at doses of 0.6 and 120 mg/kg, respectively. A polyethylene catheter (OD 0.7 mm, ID 0.3 mm, length 60 cm) was implanted in the proximal colon, 2 cm from the cecocolonic junction, attached to the abdominal muscle wall, and exteriorized at the back of the neck. This catheter was used to perform intracolonic (IC) infusions. Five days after surgery, saline (0.2 mL) was injected IC in rats of groups 1–3 and TNBS (80 mg/kg in 0.2 mL 50% ethanol) was injected IC in rats of groups 4–7. Four hours after saline or TNBS administration, rats were continuously (24 h/24 h) infused

IC for 4 days with saline (0.25 mL/h groups 1 and 4), sodium nitroprusside (SNP; 1 mg/kg/day; groups 2 and 5), haemoglobin (Hb; 200 mg/kg/day; groups 3 and 6), or SNP (1 mg/kg/day) plus Hb (200 mg/kg/day) for group 7. At the end of treatments, the animals were killed and the colon was removed for evaluation of macroscopic damage scores (MDS) and determination of myeloperoxidase (MPO) activity. Additionally, constitutive and inducible nitric oxide synthase (NOS) activities were determined in samples of proximal colon (groups 1, 2, 4 and 5).

Similarly, three groups of 10 rats were continuously infused (0.25 mL/h; 24 h/24 h) IC for 4 days with saline (group 1), SNP (1 mg/kg/day; group 2), or SNP (1 mg/kg/day) plus Hb (200 mg/kg/day) for group 3, as previously described. At the end of each treatment a sample of luminal content collected from the proximal colon was taken for determination of NO production in the colonic lumen.

Lactobacillus farciminis and TNBS colitis

In a second series of experiments, 5 groups of 10 rats received orally for 19 days either saline (groups 1 and 3) or *L. farciminis* (CIP 103136, Institut Pasteur, Paris, France) at a dose of 10^{12} colony-forming units (CFU)/day (groups 2, 4 and 5). On day 10, all rats were equipped with a catheter in the proximal colon as previously described in the first series of experiments. On day 15, saline (0.2 mL; groups 1 and 2) or TNBS (80 mg/kg in 0.2 mL 50% ethanol; groups 3–5) was administered IC. Four hours after saline or TNBS administration, rats were continuously (24 h/24 h) infused IC (0.25 mL/h) for 4 days with saline (groups 1–4) or Hb (200 mg/kg/day; group 5). At the end of treatments, animals were killed and the colon was removed for evaluation of macroscopic damage and determination of MPO activity (groups 1–5). Constitutive and inducible NOS activities were also measured in proximal colon samples (groups 1–4).

Additionally, 5 groups of 10 rats received orally for 19 days either saline (groups 1, 4) or *L. farciminis* (10^{12} CFU/day; groups 2, 3 and 5). On day 15, saline (0.2 mL; groups 1–3) or TNBS (80 mg/kg in 0.2 mL 50% ethanol; groups 4–5) was administered IC and group 3 was continuously (24 h/24 h) infused IC (0.25 mL/h) for 4 days with Hb (200 mg/kg/day). At the end of each treatment a sample of luminal content collected from the proximal colon was taken for determination of NO production in the colonic lumen.

Body weight and colitis

Body weight was measured in all groups of animals from the day of TNBS administration until the day of sacrifice and was expressed as a percentage of change after saline or TNBS administration.

Macroscopic damage scores (MDS)

Immediately after sacrifice, the colon was removed, opened longitudinally and rinsed with saline. Intestinal damage was scored according to a modified Wallace et al. (28) scale

Table I. Criteria for macroscopic scoring of proximal colonic damage (modified from Wallace et al. (28))

Feature	Score
Ulceration	
Normal appearance	0
Focal hyperaemia, no ulcers	1
Ulceration without hyperaemia of bowel wall thickening	2
Ulceration with inflammation at 1 site	3
≥2 sites of ulceration and inflammation	4
Major sites of damage extending >1 cm along the length of the colon	5
When an area of damage extended >2 cm along the length of the colon, the score is increased by 1 for each additional cm of involvement	6–10 plus
Adhesion	
No adhesion	0
Minor adhesions	1
Major adhesions	2
Diarrhoea	
No	0
Yes	1
Total score =	

(detailed in Table I), which takes into account the severity and extent of macroscopically visible damage, the presence and severity of adhesion, and the presence of liquid faeces in the distal colon. Scores were given in a blind manner.

Myeloperoxidase (MPO) activity assay

The activity of the enzyme MPO, a marker of polymorphonuclear neutrophil primary granules, was determined in proximal colon tissue according to Bradley et al. (29). Immediately after sacrifice, a colonic sample (1-cm long) was taken at 3 cm from the ceco-colonic junction. Samples were suspended in a potassium phosphate buffer (50 mmol/L, pH 6.0) and homogenized in ice using a polytron. Three cycles of freezing and thawing were undertaken. Suspensions were then centrifuged at 10,000g for 15 min at 4 °C. Supernatants were discarded and pellets were resuspended in hexadecyl trimethylammonium bromide buffer (HTAB 0.5%, w/v, in 50 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 6.0), a detergent inducing release of MPO from the polymorphonuclear neutrophil primary granules. These suspensions were sonicated on ice, and again centrifuged at 10,000g for 15 min at 4 °C. Supernatants obtained were diluted in potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.167 mg/mL of *O*-dianisidine dihydrochloride and 0.0005% of hydrogen peroxide (H₂O₂). MPO from human neutrophils (0.1 U/100 µL) was used as a standard. Changes in absorbance at 450 nm, every 10 sec over 2 min, were recorded with a spectrophotometer (Uvikon 860, Kontron Instruments, St Quentin en Yvelines, France). One unit of MPO activity was defined as the quantity of MPO degrading 1 µmol hydrogen peroxide/min/mL at 25 °C. Protein concentration (g/mL) was determined with a commercial kit of the modified method of Lowry (Detergent Compatible Assay, Biorad, Ivry, Seine,

France) and MPO activity was expressed as MPO units per milligram of protein.

Nitric oxide synthase (NOS) activity assay

Tissue NOS activities were estimated by measuring the rate of conversion of L-[¹⁴C] arginine to L-[¹⁴C] citrulline, as described by Bush et al. (30). Tissue samples were homogenized on ice in buffer (pH 7.4) containing Tris/HCl (50 mmol/L), dithiothreitol (DTT, 1 mmol/L), phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF; 1 mmol/L), ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA; 0.1 mmol/L) and two protease inhibitors: leupeptin (23.4 µmol/L) and pepstatin (14.6 µmol/L). After centrifugation (13,500g, 30 min, 4 °C), 100 µL of supernatant was added to a reaction mixture containing 50 mmol/L Tris/HCl (pH 7.4), 1.58 µmol/L L-[¹⁴C] arginine, 200 µmol/L NADPH as co-substrate, 10 µmol/L flavine mononucleotide and 10 µmol/L flavine adenine dinucleotide as prosthetic groups of NOS, DTT (1 mmol/L), tetrahydrobiopterine (50 µmol/L) and valine (50 mmol/L). Determination of total NOS activity was performed by adding CaCl₂ (2 mmol/L). iNOS activity was determined in the presence of a calcium chelator, ethylene glycol-bis(β-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, 1 mmol/L). cNOS activity was determined by the difference between both activities. After 30 min incubation at 37 °C, the enzymatic reaction was stopped by adding cold HEPES buffer (pH 5.5) containing EGTA (1 mmol/L) and EDTA (1 mmol/L). L-[¹⁴C] citrulline formed in the medium was separated by applying the samples to columns containing pre-equilibrated Dowex AG50W-X8, eluting them with water, and measuring the amount of radioactivity with a Beta liquid scintillation counter (Kontron Instruments, St Quentin en Yvelines, France). Protein content was measured following the method of Lowry. Enzyme activity was expressed as picomoles of citrulline formed per milligram of protein and per hour.

Nitric oxide detection

Immediately after sacrifice, luminal contents were collected from the proximal colon and added to iron(II) diethyldithiocarbamate complex ([Fe(II)(DETC)₂]) as NO spin trap. Nitric oxide production was measured by electron paramagnetic resonance (EPR). The paramagnetic NO adduct ([Fe(II)NO(DETC)₂]) was assayed according to Vanin & Kelschyov (31), with slight modifications. The 1 mmol/L colloid solution of nitric oxide trapping agent [Fe(II)-(DETC)₂] was prepared by mixing a 2.00 mmol/L DETC solution in 15 mmol/L HEPES buffer, pH 7.6 with a 1.00 mmol/L Fe(II) sulphate solution as described by Kleschyov et al. (32). Samples prepared by incubating the colonic content (0.25 mL) with the [Fe(II)(DETC)₂] colloid solution (1 mM, 0.25 mL), 30 min at 37 °C, gave an EPR spectrum with large bands due to the presence of manganese species. These large bands masked the EPR signal of the [Fe(II)NO(DETC)₂] spin adduct, which was superimposed with the third and fourth components of the hyperfine

Table II. Body weight (% change 4 days after saline or TNBS administration)

	Saline	TNBS
Saline	4.0 ± 2.0	-7.1 ± 6.2 ^a
Sodium nitroprusside	2.5 ± 1.7	1.1 ± 2.9 ^b
Haemoglobin	4.1 ± 2.3	-2.1 ± 3.1 ^a
Sodium nitroprusside + haemoglobin		-7.1 ± 3.1 ^{a,c}
Saline	4.0 ± 2.0	-8.1 ± 4.2 ^a
<i>L. farciminis</i>	5.6 ± 1.7	3.4 ± 4.4 ^b
<i>L. farciminis</i> + haemoglobin		-3.9 ± 5.3 ^{a,d}

Sodium nitroprusside and haemoglobin were continuously infused intracolonicly for 4 days at a dose of 1 and 200 mg/kg/day, respectively. *L. farciminis* was given orally for 15 days before and 4 days after TNBS administration at a dose of 10¹² CFU/day and haemoglobin was continuously infused intracolonicly for 4 days at a dose of 200 mg/kg/day.

Significantly different ($P < 0.05$) from ^asaline/saline, ^bTNBS/saline, ^cTNBS/sodium nitroprusside and ^dTNBS/*L. farciminis*.

structure of the manganese species. To avoid this superimposition, the [Fe(II)NO(DETC)₂] spin adduct, obtained after 30 min incubation at 37 °C, was extracted with cold deoxygenated triacetyl glycerol (TAG) (sample/solvent, 1:1, v/v) after 5 min incubation at 0 °C. The samples were centrifuged at 2,000g for 5 min and the organic solvent phase was collected and frozen in liquid nitrogen for subsequent EPR measurements.

EPR measurements were performed on a MS100 spectrometer (Magnetech GmbH, Berlin) under the following conditions: room temperature, microwave frequency 9.34 GHz, microwave power 20 mW, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 0.5 mT, time constant fixed 1 ms. EPR quantitative analysis was carried out by double integration of the EPR signal of the [Fe(II)NO(DETC)₂] spin adduct and comparison of the integral intensity of a 10 μM diphenylpicrylhydrazine (DPPH) solution in deoxygenated triacetyl glycerol.

Chemicals

TNBS, SNP, Hb, potassium phosphate, HTAB, H₂O₂, ODHC, MPO, DETC, DPPH, sodium salt, FeSO₄, triacetin (triacetyl glycerol), Dowex AG50W-X8 (H⁺ form) 100–200 mesh, valine, tetrahydrobiopterine, NADPH, DTT, PMSF, EDTA, EGTA, leupeptin, pepstatin, flavine mononucleotide, flavine adenine, CaCl₂, PBS, HEPES and Tris-HCl buffers were purchased from Sigma, Saint Quentin Fallavier, France. Lowry (Detergent Compatible Assay, Biorad, Ivry, Seine, France). L-[¹⁴C]arginine was purchased from ICN Biomedicals, Orsay, France.

Statistical analyses

For each parameter studied, data were expressed as mean ± s (standard deviation). Comparisons between the different treatments were performed after an analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test for unpaired data when the P value of F was < 0.05 . Statistical significance was set up for $P < 0.05$.

Results

Reduction of TNBS-induced colitis severity

Neither *L. farciminis* nor SNP treatment had any effect on body weight, colonic macroscopic damage or myeloperoxidase activity in the absence of inflammation.

Four days after IC administration of TNBS, in both series of experiments a loss of body weight ($-7.1\% \pm 6.3\%$ and $-8.1\% \pm 4.2\%$, respectively) was observed (Table II), as well as macroscopic damage in the colonic wall, which consisted of mucosal necrosis over 1–5 cm, a dark red to brown colour and apparent hyperaemia and ulcers (6.9 ± 3.1 and 5.7 ± 2.7 , respectively) (Fig. 1.) associated with a dramatic increase of MPO activity (5346 ± 1750 and 3171 ± 1298 U/g protein, respectively) (Fig. 2.)

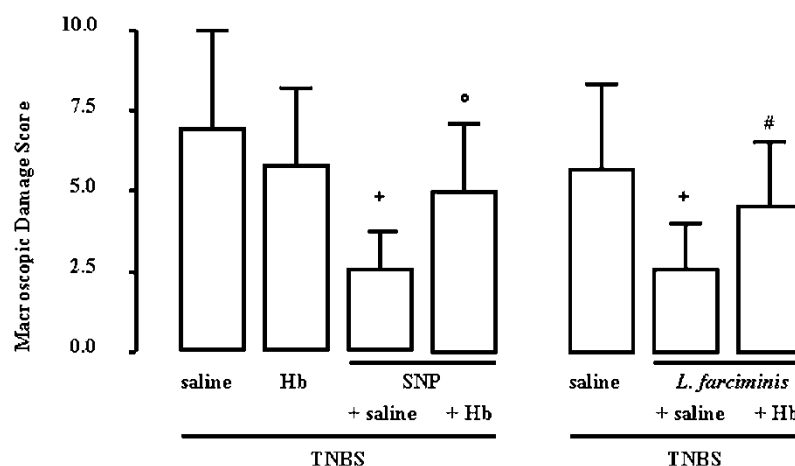


Fig. 1. Effect of SNP (1 mg/kg/day) and *L. farciminis* (10¹² CFU/day) treatment on macroscopic damage score in TNBS-induced colitis and reversion by haemoglobin (Hb, 200 mg/kg/day). ⁺ $P < 0.05$ versus TNBS, saline; [°] $P < 0.05$ versus TNBS, SNP; [#] $P < 0.05$ versus TNBS, *L. farciminis*.

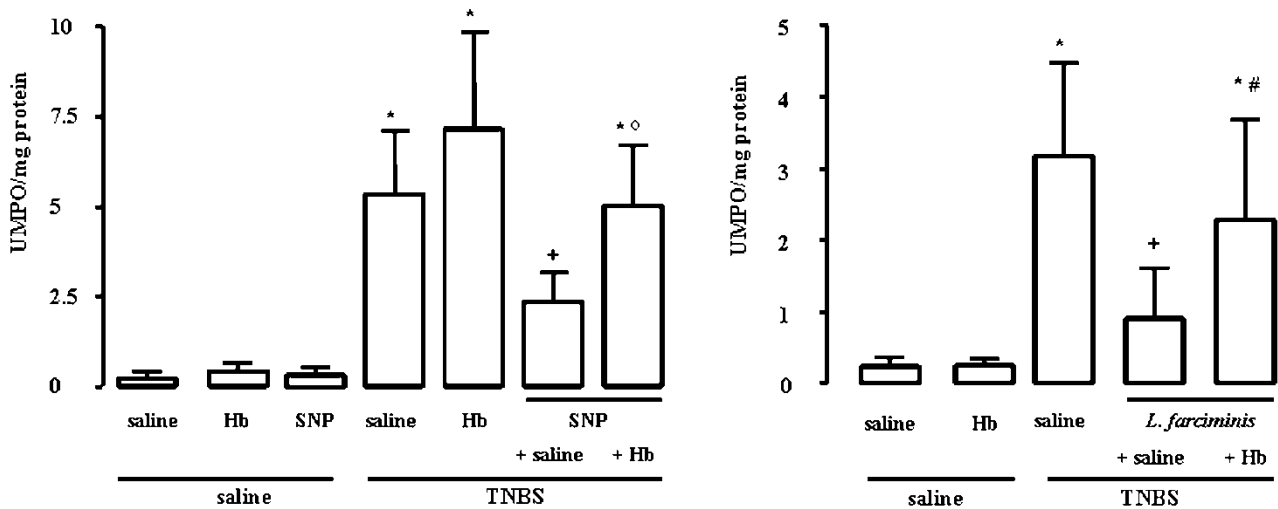


Fig. 2. Effect of SNP (1 mg/kg/day) and *L. farciminis* (10^{12} CFU/day) treatment on MPO activity in TNBS-induced colitis and reversion by haemoglobin (Hb, 200 mg/kg/day). * $P < 0.05$ versus saline, saline; + $P < 0.05$ versus TNBS, saline; ° $P < 0.05$ versus TNBS, SNP; # $P < 0.05$ versus TNBS, *L. farciminis*.

After SNP or *L. farciminis* treatment, TNBS-induced loss of body weight was suppressed and a gain of body weight was observed ($1.1\% \pm 2.9\%$ and $3.4\% \pm 4.5\%$, respectively) (Table II). The beneficial effect of these treatments was abolished when animals received Hb infusion simultaneously ($-7.1\% \pm 3.1\%$ and $-3.9\% \pm 5.3\%$, respectively) (Table II).

SNP infusion or *L. farciminis* given orally significantly reduced ($P < 0.05$) the macroscopic damage score observed after TNBS administration (2.5 ± 1.2 and 2.6 ± 1.4 , respectively). These effects were reversed by Hb infusion (5.0 ± 2.1 and 4.5 ± 2.0 , respectively) (Fig. 1).

The increase in colonic MPO activity induced by TNBS was significantly reduced after SNP or *L. farciminis* treat-

ments (2357 ± 828 and 905 ± 702 U/g protein). These effects were also abolished after Hb infusion (5038 ± 1680 and 2288 ± 1395 U/g protein) (Fig. 2).

Hb infusion alone did not modify loss of body weight ($-7.1\% \pm 3.1\%$), macroscopic damage score (5.7 ± 2.4) and MPO activity (7174 ± 2668 U/g protein) associated with TNBS (Figs 1, 2).

In the absence of treatment by SNP or *L. farciminis*, changes in body weight, macroscopic damage score and MPO activity were not significantly different ($P > 0.05$) in the two groups receiving intracolonic saline. Furthermore, there was no significant difference of these values between the two groups.

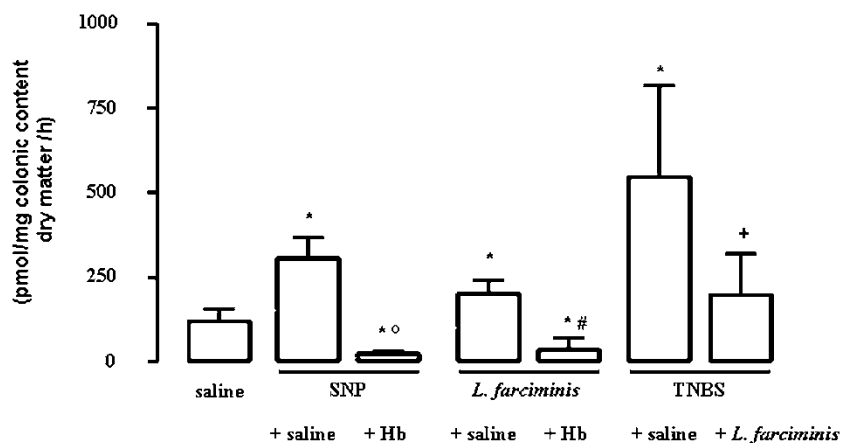


Fig. 3. Effect of SNP (1 mg/kg/day) and *L. farciminis* (10^{12} CFU/day) treatment on NO presence in colonic content. * $P < 0.05$ versus saline, saline; ° $P < 0.05$ versus SNP, saline; # $P < 0.05$ versus *L. farciminis*, saline; + $P < 0.05$ versus TNBS, saline.

Table III. Nitric oxide synthase (NOS) activities (pmol/mg protein/h) in the proximal colon

	cNOS		iNOS	
	Saline	TNBS	Saline	TNBS
Saline	42.2 ± 16	14.2 ± 15	5.3 ± 4.0	576.8 ± 453.0 ^a
Sodium nitroprusside	39.2 ± 3.8	36.4 ± 24	4.9 ± 3.1	126.3 ± 262.0 ^b
Saline	46.3 ± 15	11.1 ± 15	4.0 ± 2.5	641.6 ± 380.7 ^a
<i>L. farciminis</i>	58.5 ± 2.3	37.9 ± 33	5.6 ± 4.1	85.9 ± 100.2 ^b

Sodium nitroprusside was continuously infused intracolonicly for 4 days (after saline or TNBS administration) at a dose of 1 mg/kg/day. *L. farciminis* was given orally for 15 days before and 4 days after saline or TNBS administration at a dose of 10¹² CFU/day. Significantly different ($P < 0.05$) from ^asaline/saline and from ^bTNBS/saline.

Ex vivo NO measurement in luminal content

In the absence of any treatment, the NO production measured ex vivo in the lumen of the colon was 120 ± 38 pmol/mg colonic content dry matter/h. This production was 2.5-fold higher after SNP infusion and 1.7-fold higher after oral treatment by *L. farciminis* than in controls (307 ± 62 pmol/mg colonic content dry matter/h and 202 ± 41 pmol/mg colonic content dry matter/h, respectively). Furthermore, Hb infusion significantly reduced ($P < 0.05$) this NO production (25 ± 6 pmol/mg colonic content dry matter/h and 36 ± 34 pmol/mg colonic content dry matter/h, respectively) (Fig. 3.)

Four days after IC administration of TNBS, in the absence of *L. farciminis* treatment, the NO measured in the colonic content was 4.5-fold higher than in controls (546 ± 272 pmol/mg colonic content dry matter/h). This value was significantly reduced ($P < 0.05$) to 199 ± 123 pmol/mg colonic content dry matter/h when TNBS administration was preceded during 15 days, and followed for 4 days, by *L. farciminis* treatment (Fig. 3.)

NOS activities

In the absence of any treatment, both cNOS and iNOS activities in the proximal colon were low (Table III). In both series of experiments, TNBS strongly increased iNOS activity (577 ± 453 pmol/h/mg protein and 642 ± 381 pmol/h/mg protein, respectively), and slightly reduced cNOS activity (14 ± 15 pmol/h/mg protein and 11 ± 15 pmol/h/mg protein, respectively). SNP infusion and *L. farciminis* treatment significantly reduced ($P < 0.05$) the TNBS-induced increase in iNOS activity (126 ± 262 pmol/h/mg protein and 86 ± 100 pmol/h/mg protein respectively) (Table III).

In the absence of treatment by SNP or *L. farciminis*, NOS activities observed after IC saline administration did not differ significantly ($P > 0.05$) between the two groups of rats. Similarly, no difference was observed between the two groups receiving TNBS.

Discussion

This study indicates that delivery of exogenous NO by *L. farciminis* and SNP in the colonic lumen exerts a protective action against TNBS colitis. The involvement of NO in the effects of *L. farciminis* and SNP is demonstrated by the

increase of NO production in the colonic content after *L. farciminis* and SNP treatment and the reversal of the anti-inflammatory effect of *L. farciminis* and SNP by haemoglobin.

A beneficial role of NO in TNBS experimental colitis has already been suggested by Wallace et al. (11), who found a greater efficacy of colonic administration of NO mesalamine, which releases NO, than mesalamine in reducing a TNBS colitis. In the same study, an attempt to reduce the inflammation by SNP was performed, but the dose used was toxic (100 mg/kg as opposed to 1 mg/kg/day in this study). Moreover, a protective action of topical application of NO-releasing substances against mucosal damage induced by injurious agents has already been reported as gastric (13, 33).

Among numerous hypotheses, there are at least two main possibilities explaining the reduction of inflammation by exogenous NO. The first involves the decrease of leucocyte adhesion by NO (34) which is likely to be due to a reduced expression of adhesion molecules (35). More precisely, at intestinal level, NO donors inhibit leucocyte adhesion to mesenteric postcapillary venules (11). The adhesion molecules play a pivotal role in inflammation, and antibodies to some of them have been found to reduce an experimental colitis in rats (36).

The second hypothesis involves oxygen- and nitrogen-derived free radicals. Peroxynitrite is a highly toxic radical that is produced in the inflamed intestine (37) and its IC administration produces widespread colonic injury (38). Equimolar concentration of superoxide and NO can yield peroxynitrite, but excess production of either of these radicals can strongly inhibit the production of peroxynitrite (39, 40). In pathological conditions, cytokine-stimulated macrophages are thought to generate both superoxide and NO at the same sustained rate, maintaining equimolar concentrations of both radicals (41). Moreover, the co-production of NO and superoxide is a general mechanism involved in NO formation by NOS from L-arginine (42). In this regard, an excess of NO of exogenous origin can be considered as antioxidant. This general concept can be applied to colonic inflammation. Intense iNOS labelling in the inflamed colonic epithelium of patients with ulcerative colitis or Crohn disease has been reported (43), indicating generation of NO in the epithelial cells. Superoxide production by cultures of crypt epithelium from rat colon (44), or by cultures of transformed colonic

epithelial cell lines and primary epithelial cells from human colon (45), has been described in basal conditions. In biopsy specimens from patients with ulcerative colitis, superoxide production by epithelial cells has been detected even when the major source of superoxide was vascular endothelium (46). Phagocytic leucocytes are also known to produce large amounts of superoxide and NO (47). Furthermore, Singer et al. (43) have shown that localization of iNOS and nitrotyrosine (a marker of peroxynitrite-induced nitration of cellular proteins) in the epithelium from ulcerative colitis or Crohn disease patients suggests that peroxynitrite that caused the formation of nitrotyrosine was formed in or near the affected epithelial cells. Taking all these data together, it can be proposed that NO derived mainly by epithelial iNOS can react with superoxide formed in major part by transmigrating polymorphonuclear leucocytes to generate the peroxynitrite responsible for colonic injury.

TNBS induced a marked increase of iNOS, as previously shown (48), and this effect was reduced by *L. farciminis* or SNP treatments. Since a pronounced iNOS expression has been found in neutrophils (9), the reduction of iNOS activity by a donation of NO can be attributed to a decreased number of migrating neutrophils in the colonic wall, as reflected by reduced MPO activity either *L. farciminis* or SNP treatments. On the other hand, SNP is known to produce a reversible inhibition of NOS through a direct feedback mechanism (49), and to inhibit iNOS activity in neutrophils (50). Consequently, we can hypothesize that *L. farciminis*, with increased NO concentration, as SNP, may reduce the NO increase after TNBS through inhibition of iNOS activity.

Our results indicate for the first time a mechanism of action for the beneficial effects of a probiotic. However, the NO-mediated anti-inflammatory effect of *L. farciminis* does not exclude mechanisms proposed for other probiotics, mainly a role in prevention of overgrowth by potentially pathogenic microorganisms (22). Many clinical and experimental reports emphasize the role of normal resident luminal bacteria in the pathogenesis of IBD and it has been suggested that perpetuation of inflammation derives from a loss of tolerance to the commensal intestinal microflora (51, 52). The role of microflora in inflammation concerns non-pathogenic bacteria (53), as well as enteropathogenic bacteria (54). It has been suggested that in TNBS-induced colitis the colonic microflora invades the colonic wall after disruption of the epithelium and the presence of bacteria within the wall participates in the transmural inflammation (54).

There are bi-directional relationships between NO in the colonic lumen and the colonic microflora. An increase in the number of nitrate-reducing bacteria has been found in patients with diversion colitis (55) and in TNBS-induced colitis (54). This increase in pathogenic nitrate-reducing bacteria may be due to an increase in nitrate concentration in the colonic lumen consecutive to iNOS activation, since NO is rapidly metabolized in the colon to nitrite and nitrate (56). On the other hand, microbial lipopolysaccharide (LPS) alters gut

barrier function through a mechanism dependent upon iNOS activation. The iNOS inhibitor aminoguanidine has been found to reduce the increase in intestinal permeability and the subsequent bacterial translocation induced by LPS (57, 58). Lastly, NO displays a potent antimicrobial activity, probably mediated by its congeners resulting from the interactions of reactive oxygen species (59), which concerns a broad range of pathogenic microorganisms (59, 60).

Finally, *L. farciminis* can be considered as a promising treatment for reducing colonic inflammation. Its anti-inflammatory action seems to depend upon the NO release in the lumen, and, among the possible mechanisms of action, an indirect inhibition of iNOS activity can be proposed, and the subsequent reduction of NO tissue concentration may be important.

Acknowledgements

This study was supported by grants from INRA, ARC Grant 5358 (fellowship grant support: Irina LOBYSHEVA, visitor scientist from Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow) and INSERM-INRA, ATC Nutrition 2002. We thank all institutions as well as the Midi-Pyrénées Région and its Health-Food Network for financial support.

References

1. Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJ, et al. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 1993;342:338-40.
2. Rachmilewitz D, Stampler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 1995;36:718-23.
3. Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, et al. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 1998;42:180-7.
4. Herulf M, Ljung T, Hellstrom PM, Weitzberg E, Lundberg JO. Increased luminal nitric oxide in inflammatory bowel disease as shown with a novel minimally invasive method. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:164-9.
5. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E. Sulfhydryl blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase. *Gastroenterology* 1995;109:98-106.
6. Kankuri E, Vaali K, Knowles RG, Lahde M, Korpela R, Vapaatalo H, et al. Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298:1128-32.
7. Zingarelli B, Szabo C, Salzman A. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. *Gut* 1999;45:199-209.
8. Ribbons KA, Currie MG, Connor JR, Manning PT, Allen PC, Didier P, Ratterree MS, Clark DA, Miller MJ. The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase on chronic colitis in the rhesus monkey. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:1008-15.
9. McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, Sharkey KA, Kubes P. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. *Gut* 1999;45:864-73.
10. Dikopoulos N, Nussler AK, Liptay S, Bachem M, Reinshagen M,

- Stiegler M, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis by aminoguanidine increases intestinal damage in the acute phase of rat TNB-colitis. *Eur J Clin Invest* 2001;31:234–9.
11. Wallace JL, Vergnolle N, Muscara MN, Asfaha S, Chapman K, McKnight W, et al. Enhanced anti-inflammatory effects of a nitric oxide-releasing derivative of mesalamine in rats. *Gastroenterology* 1999;117:557–66.
 12. MacNaughton WK, Cirino G, Wallace JL. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. *Life Sci* 1989;45:1869–76.
 13. Kitagawa H, Takeda F, Kohei H. Effect of endothelium-derived relaxing factor on the gastric lesion induced by HCl in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:1133–7.
 14. Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut* 2002;51:405–9.
 15. Campieri M, Gionchetti P. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? *Gastroenterology* 1999;116:1246–9.
 16. Malin M, Suomalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Ann Nutr Metab* 1996;40:137–45.
 17. Kruis W, Schutz E, Frick P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:853–8.
 18. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:635–9.
 19. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1462–4.
 20. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:305–9.
 21. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Willen R, Andersson R, Molin G, et al. The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:155–62.
 22. Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Molin G, et al. The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996;111:334–44.
 23. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999;116:1107–14.
 24. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001;121:580–91.
 25. Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y, Rambaud JC. The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine. *World Rev Nutr Diet* 1993;74:1–21.
 26. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289:1352–5.
 27. Wolf G, Arendt EK, Pfahler U, Hammes WP. Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products. *Int J Food Microbiol* 1990;10:323–9.
 28. Wallace JL, Keenan CM, Gale D, Shoupe TS. Exacerbation of experimental colitis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is not related to elevated leukotriene B₄ synthesis. *Gastroenterology* 1992;102:18–27.
 29. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78:206–9.
 30. Bush PA, Gonzalez NE, Griscavage JM, Ignarro LJ. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:960–6.
 31. Vanin AF, Kleschyov AL. EPR studies and biological implications of nitrosyl nonheme iron complexes. In: Lukiewicz S, Zweier JL editors. Nitric oxide in transplant rejection and anti-tumor defence. London: Kluwer; 1998. p. 49–82.
 32. Kleschyov AL, Mollnau H, Oelze M, Meinertz T, Huang Y, Harrison DG, et al. Spin trapping of vascular nitric oxide using colloidal Fe(II)-diethyldithiocarbamate. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:672–7.
 33. MacNaughton WK, Cirino G, Wallace JL. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. *Life Sci* 1989;45:1869–76.
 34. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651–5.
 35. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9114–9.
 36. Wong PY, Yue G, Yin K, Miyasaka M, Lane CL, Manning AM, et al. Antibodies to intercellular adhesion molecule-1 ameliorate the inflammatory response in acetic acid-induced inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:475–80.
 37. Miller MJ, Thompson JH, Zhang XJ, Sadowska-Krowicka H, Kakkis JL, Munshi UK, et al. Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 1995;109:1475–83.
 38. Rachmilewitz D, Stamler JS, Karmeli F, Mullins ME, Singel DJ, Loscalzo J, et al. Peroxynitrite-induced rat colitis: a new model of colonic inflammation. *Gastroenterology* 1993;105:1681–8.
 39. Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA, Grisham MB. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem* 1996;271:40–7.
 40. Wink DA, Cook JA, Kim SY, Vodovotz Y, Pacelli R, Krishna MC, et al. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* 1997;272:11147–51.
 41. Schiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:446–51.
 42. Schmidt HH, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M. No NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14492–7.
 43. Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996;111:871–85.
 44. Craven PA, Pfanstiel J, DeRubertis FR. Role of reactive oxygen in bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation. *J Clin Invest* 1986;77:850–9.
 45. Perner A, Andresen L, Pedersen G, Rask-Madsen J. Superoxide production and expression of NAD(P)H oxidases by transformed and primary human colonic epithelial cells. *Gut* 2003;52:231–6.
 46. Oshitani N, Kitano A, Okabe H, Nakamura S, Matsumoto T, Kobayashi K. Location of superoxide anion generation in human colonic mucosa obtained by biopsy. *Gut* 1993;34:936–8.
 47. Jourdeuil D, Kang D, Grisham MB. Interactions between superoxide and nitric oxide: implications in DNA damage and mutagenesis. *Front Biosci* 1997;2:189–96.
 48. Kankuri E, Asmawi MZ, Korpela R, Vapaatalo H, Moilanen E. Induction of iNOS in a rat model of acute colitis. *Inflammation* 1999;23:141–52.
 49. Ravichandran LV, Johns RA, Rengasamy A. Direct and reversible inhibition of endothelial nitric oxide synthase by nitric oxide. *Am J Physiol* 1995;268:H2216–23.
 50. Mariotto S, Cuzzolin L, Adami A, Del Soldato P, Suzuki H, Benoni G. Inhibition by sodium nitroprusside of the expression

- of inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils. *Br J Pharmacol* 1995;114:1105–6.
51. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;102:448–55.
 52. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996;38:365–75.
 53. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:5224–31.
 54. Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, et al. Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol* 1997;272:G10–5.
 55. Neut C, Guillemot F, Colombel JF. Nitrate-reducing bacteria in diversion colitis: a clue to inflammation? *Dig Dis Sci* 1997;42:2577–80.
 56. Roediger WE, Radcliffe BC. Role of nitrite and nitrate as a redox couple in the rat colon. Implications for diarrheal conditions. *Gastroenterology* 1988;94:915–22.
 57. Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tytgat SH, Larkin V, Smith M, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 1997;113:1246–57.
 58. Kavuklu B, Agalar C, Guc MO, Sayek I. Evidence that aminoguanidine inhibits endotoxin-induced bacterial translocation. *Br J Surg* 1998;85:1103–6.
 59. Fang FC. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997;99:2818–25.
 60. De Groote MA, Fang FC. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin Infect Dis* 1995;21 Suppl 2:162S–5S.

Received 18 June 2003
Accepted 4 October 2003

RESULTAT 2

Réponses coliques au traitement par *Lactobacillus farciminis*
dans la colite induite par le TNBS chez le rat

Réponses coliques au traitement par *Lactobacillus farciminis* dans la colite induite par le TNBS chez le rat

Scand J Gastroenterol 2004 ; 39 : 1250-1258.

Résumé

Nous avons récemment montré qu'un traitement par *Lactobacillus farciminis* exerce un effet anti-inflammatoire sur une colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) à travers en partie la libération de monoxyde d'azote (NO) par cette souche. L'objectif de cette étude est d'évaluer si le traitement par *Lactobacillus farciminis* partage également les mécanismes d'action généralement impliqués dans les effets bénéfiques des probiotiques dans le processus inflammatoire colique.

Matériel et méthodes : Les animaux (rats mâles Wistar) ont reçu un traitement oral de *Lactobacillus farciminis* pendant les 15 jours qui ont précédé et les 4 jours qui ont suivi l'administration intra-colique (IC) de TNBS ou de NaCl. Les paramètres suivants ont été évalués : lésions macroscopiques de la muqueuse colique, l'activité de la myéloperoxydase (MPO), le niveau tissulaire de cytokines, le profil bactérien dans le contenu colique et la muqueuse colique, la translocation bactérienne et la perméabilité paracellulaire colique.

Résultats : En l'absence de TNBS, un traitement par *Lactobacillus farciminis* réduit la perméabilité paracellulaire colique et augmente l'expression tissulaire de l'IL-10. L'administration du TNBS induit des lésions macroscopiques de la muqueuse colique associées à une augmentation de l'activité MPO, de la translocation bactérienne, de la perméabilité paracellulaire colique et de l'expression tissulaire de l'IL-1 β et une diminution de l'expression tissulaire de l'IL-10. De plus, les profils bactériens du contenu colique et de la muqueuse colique ont été modifiés. Toutes ces altérations ont été abolies ou significativement réduites par le traitement par *Lactobacillus farciminis*.

Conclusion : Cette étude indique qu'en plus du NO libéré par *Lactobacillus farciminis*, l'action anti-inflammatoire de cette souche dans la réduction de la colite induite par le TBNS, implique également une "normalisation" de la microflore colique, une prévention de la translocation bactérienne, un renforcement de l'intégrité de la barrière colique et une diminution de l'expression tissulaire de l'IL-1 β .

Colonic Responses to *Lactobacillus farciminis* Treatment in Trinitrobenzene Sulphonic Acid-induced Colitis in Rats

F. Lamine, H. Eutamène, J. Fioramonti, L. Buéno & V. Théodorou

Neuro-Gastroenterology and Nutrition Unit, INRA, Toulouse, France; Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan, Toulouse, France

Lamine F, Eutamène H, Fioramonti J, Buéno L, Théodorou V. Colonic responses to *Lactobacillus farciminis* treatment in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:1250–1258.

Background: It has recently been shown that *Lactobacillus farciminis* treatment exerts an anti-inflammatory effect in trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis partly through a nitric oxide release by this strain. The aim of this study was to evaluate whether *L. farciminis* treatment shares also the general mechanisms of action involved in the beneficial effect of probiotics in the colonic inflammatory process. **Methods:** Rats received *L. farciminis* for 15 days before and 4 days after intracolonic administration of TNBS or vehicle. The following parameters were evaluated: macroscopic damage of colonic mucosa, myeloperoxidase activity, cytokine mucosal levels, bacterial profile in colonic content and mucosa, bacterial translocation and colonic paracellular permeability. **Results:** In the absence of TNBS, *L. farciminis* treatment reduced colonic paracellular permeability and increased the IL-10 level in the colonic wall. TNBS administration induced colonic macroscopic damage, associated with an increase of myeloperoxidase activity, bacterial translocation, colonic paracellular permeability and IL-1 β mucosal level, and a decrease in IL-10 mucosal level. Moreover, the bacterial profile of colonic content and mucosa was modified. All these alterations were abolished or significantly reduced by *L. farciminis* treatment. **Conclusions:** As previously shown, *L. farciminis* treatment improves TNBS-induced colitis. This study indicates that, in addition to the nitric oxide released by this bacterial strain, the anti-inflammatory action of *L. farciminis* involves also normalization of colonic microflora, prevention of bacterial translocation, enhancement of barrier integrity and a decrease in the IL-1 β mucosal level.

Key words: Cytokines; inflammation; *Lactobacillus farciminis*; permeability

Vassilia Théodorou, Ph.D., INRA, Neuro-Gastroenterology and Nutrition Unit, 180 Chemin de Tournefeuille, BP3, FR-31931 Toulouse cedex 9, France (fax. +33 561 285 145, e-mail. vtheodor@toulouse.inra.fr)

Despite some negative data (1, 2), some probiotics may be considered as an alternative or adjunct therapy in inflammatory bowel diseases (IBD) (3). Encouraging results have been obtained in IBD treatment with *Lactobacillus casei* (4), *Escherichia coli* Nissle 1917 (5, 6), *Saccharomyces boulardii* (7), or the cocktail of probiotic strains VSL#3 (8). Similarly, exogenous administration of several lactobacilli strains has been found to reduce the severity of experimental colitis in animals (9–12). The mechanisms involved in the anti-inflammatory action of probiotics are based on some general properties of these protective bacteria such as prevention of overgrowth of pathogenic microorganisms (10), reduction of bacterial translocation (10) or maintenance of mucosal barrier integrity (9, 10) and modulation of cytokine production (12). These properties of probiotics are interesting for the improvement of the main colonic alterations observed in IBD. A disruption of the enteric bacterial balance is involved in the maintenance of chronic intestinal inflammation (13–16). The course of in-

flammation is associated with impairment of the integrity of the mucosal epithelial barrier, mostly reflected by enhanced intestinal permeability (17–19), associated with bacterial translocation (16, 20) and likely resulting from direct contact with pathogenic bacteria (15, 21). Moreover, increased production of inflammatory mediators, including pro-inflammatory cytokines, plays a pivotal role in the inflammatory process (22, 23).

A recent original approach for the probiotic treatment of colitis entails the use of bacteria as a carrier of an anti-inflammatory compound which will be delivered in the colonic lumen. In this way, Steidler et al. were able to reduce experimental colitis in mice with a bacteria genetically engineered to secrete the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (24). Similarly, according to the possible anti-inflammatory action of nitric oxide (NO) delivered in the colonic lumen, we have shown in a previous study that *Lactobacillus farciminis* is able spontaneously to release NO in vivo, and through this pathway reduces the severity of

TNBS-induced colitis in rats (25). However, since this reduction was only partially reversed by scavenging NO by haemoglobin, this study was designed to determine whether the anti-inflammatory effect of *L. farciminis* treatment, partly due to the production of NO, is also associated with normalization of the colonic microflora, prevention of bacterial translocation, enhancement of barrier integrity and changes in cytokine profiles in TNBS-induced colitis in rats.

Methods

Animals

Male Wistar rats weighing 200–250 g, obtained from Harlan (Gannat, France) were individually housed in polypropylene cages and kept in a temperature-controlled room ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). The rats were allowed free access to water and were fed standard pellets (U.A.R., Epinay/Orge, France). The Local Animal Care and Use Committee approved all the experimental protocols described in this study.

Experimental protocol

Three series of experiments were conducted to assess the effects of *L. farciminis* treatment on TNBS-induced colitis. In each series, four groups of 10 rats were used. Animals were given either saline (groups 1 and 3) or *L. farciminis* (CIP 103136, Institut Pasteur, Paris, France) orally for 19 days at a dose of 10^{12} colony-forming units (CFU)/day (groups 2 and 4). On day 10, the animals were anaesthetized by intraperitoneal (IP) injection of acepromazine (Calmivet, Vetiquol, Lure, France) and ketamine (Imalgene 1000, Rhône-Mérieux, Lyon, France) at doses of 0.6 and 120 mg/kg, respectively. A polyethylene catheter (OD = 0.7 mm, ID = 0.3 mm, length = 60 cm) was implanted in the proximal colon, 2 cm from the caeco-colonic junction, attached to the abdominal muscle wall and exteriorized at the back of the neck. On day 15, saline (0.2 mL; groups 1 and 2) or TNBS (80 mg/kg in 0.2 mL 50% ethanol; groups 3 and 4) was administered intracolonicly (IC). The animals were weighed on the day of TNBS administration and 4 days later. In the first series of experiments, the animals were killed on day 19 and the proximal colon was removed for macroscopic evaluation of damage. Myeloperoxidase (MPO) activity and cytokine (IL-1 β and IL-10) mucosal levels were determined in two adjacent colonic segments (1 cm) situated at 3 cm from the caeco-colonic region. In the second series, the animals were also killed on day 19 and a sample of the caudate lobe of liver, spleen, mesenteric lymph nodes, luminal content collected from the proximal colon and a piece of proximal colon were taken for determination of luminal bacterial species levels, number of bacteria adhering to or invading the colonic tissue and bacterial translocation. In the third series, colonic paracellular permeability was evaluated on day 19.

In the absence of TNBS-induced colitis, four groups of 10 rats received orally *L. farciminis* (10^{12} CFU/day). On the 5th (group 1), 10th (group 2), 15th (group 3) and 19th day of

treatment (group 4), faeces were collected and the animals were killed. A sample of colonic content and a piece of proximal colon were collected to determine the ability of *L. farciminis* to survive along the gastrointestinal tract and to colonize the colonic mucosa.

Macroscopic damage scores (MDS)

Immediately after the animals were killed, the colon was removed, opened longitudinally and rinsed with saline. Intestinal damage was scored according to a modified Wallace et al. scale (26), detailed in Table I, which takes into account the severity and the extent of macroscopically visible damage, the presence and the severity of adhesion and the presence of liquid faeces in the colon. Scores were given in a blind manner.

Myeloperoxidase activity assay

The activity of the enzyme MPO, a marker of polymorphonuclear neutrophil primary granules, was determined in proximal colon tissue according to Bradley et al. (27). Immediately after the animals were killed, a colonic sample (1 cm long) was taken at 3 cm from the caeco-colonic junction. Samples were suspended in a potassium phosphate buffer (50 mmol/L, pH 6.0) and homogenized in ice using a polytron. Three cycles of freezing and thawing were undertaken. Suspensions were then centrifuged at 10000 g for 15 min at 4°C . Supernatants were discarded and pellets were resuspended in hexadecyl trimethylammonium bromide buffer (HTAB 0.5%, w/v, in 50 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 6.0), a detergent inducing release of MPO from the polymorphonuclear neutrophil primary granules. These suspensions were sonicated on ice, and again centrifuged at 10000 g for 15 min at 4°C . Supernatants obtained were

Table I. Criteria for macroscopic scoring of proximal colonic damage (modified from Wallace et al. 1992)

Feature	Score
Ulceration	
Normal appearance	0
Focal hyperaemia, no ulcers	1
Ulceration without hyperaemia of bowel wall thickening	2
Ulceration with inflammation at 1 site	3
> = 2 sites of ulceration and inflammation	4
Major sites of damage extending >1 cm along the length of the colon	5
When an area of damage extends >2 cm along the length of the colon, the score is increased by 1 for each additional centimetre of involvement	6–10
	Plus
Adhesion	
No adhesion	0
Minor adhesions	1
Major adhesions	2
Diarrhoea	
No	0
Yes	1
	Total score

diluted in potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.167 mg/mL *O*-dianisidine dihydrochloride and 0.0005% hydrogen peroxide (H₂O₂). MPO from human neutrophils (0.1 U/100 µL) was used as a standard. Changes in absorbance at 450 nm, every 10 s over 2 min, were recorded with a spectrophotometer (Uvikon 860, Kontron Instruments, St. Quentin en Yvelines, France). One unit of MPO activity was defined as the quantity of MPO degrading 1 µmol hydrogen peroxide/min/mL at 25 °C. Protein concentration (g/mL) was determined with a commercial kit of the modified method of Lowry (Detergent Compatible Assay, Biorad, Ivry, Seine, France) and the MPO activity was expressed as MPO units per gram of protein.

L. farciminis isolation and identification

In order to determine the ability of *L. farciminis* to survive in the gut and to colonize the colonic mucosa, faeces, colonic content and a piece of proximal colon were removed aseptically, washed thoroughly in sterile saline and placed into sterile tubes containing 5 mL transport medium (Tryp-case soja). Samples were plated on a Man Rogosa Shape (MRS) agar and incubated for 24 h at 37 °C. After serial cultures, the colonies were isolated and purified in the same medium. The purified colonies were identified by using the API50CH system.

Colonic bacteria levels

To examine levels of luminal bacterial species, content of the proximal colon was collected under sterile conditions and placed into sterile tubes containing 5 mL transport medium (Tryp-case soja for aerobic counts and Schaedler for anaerobic counts). To evaluate the number of bacteria adhering to or invading the colonic tissue, a piece of proximal colon was also removed aseptically, washed thoroughly in sterile saline and placed into sterile tubes containing 5 mL transport medium, as previously described. Samples were weighed, sonicated for 5 min and vortexed vigorously for 2 min for optimal dispersion. Following homogenization, five serial 10-fold dilutions were made in the same transport medium and 0.1 mL of each dilution was plated on appropriate selective culture media and incubated at 37 °C for 1 or 3 days. Standard Methods agar was used for total aerobic bacterial counts, Man Rogosa Shape (MRS) agar for *Lactobacillus* quantification, Drigalski agar for Enterobacteria and other Gram-negative bacilli counts. Total anaerobic bacterial counts and Gram-negative anaerobic bacterial counts were made in the same way plated on Schaedler +5% blood sheep agar and Schaedler neomycine-vancomycine +5% blood sheep agar, respectively, and incubated at 37 °C under anaerobic conditions into an anaerobic box for 3 days. Bacterial counts are reported as log₁₀ CFU per gram of pellets, colonic content or tissue.

Bacterial translocation

Mesenteric lymph nodes, caudate lobe of liver and spleen

were aseptically removed, placed in sterile tubes containing transport medium, weighed and then homogenized, as previously described. Three serial 10-fold dilutions were made of each sample, and 0.1 mL of each undiluted and diluted sample was plated onto Standard Methods agar and Schaedler +5% blood sheep agar plates. Following incubation at 37 °C, total colonic aerobic and anaerobic bacterial levels were determined and expressed in CFU/g of tissue.

Mucosal cytokines

Mucosal levels of cytokines were measured using a colonic sample (1 cm long) taken at 4 cm from the caeco-colonic junction. Segments of colon were removed and washed in ice-cold phosphate buffered saline (PBS); the mucosa was scraped from the underlying muscularis with glass slides and placed in 2 mL ice-cold Tris-EDTA (TE, 10 mmol/L Tris-HCl, and 1 mmol/L EDTA, pH 7.4) buffer containing 0.05% sodium azide, 1% Tween-80, 2 mmol/L PMSF and 1 µg/mL of each of the protease inhibitors aprotinin, leupeptine and pepstatin A. The mucosa was then homogenized (20 s) and centrifuged (11000 g, 10 min at 4 °C) and the supernatants were collected. IL-1β and IL-10 levels were assayed using a commercial ELISA immunoassay kit (Clinisciences, France). Protein concentration was determined with a commercial kit of the modified method of Lowry (Detergent Compatible Assay, Biorad, France) and the cytokine level was expressed as picogram per gram of protein.

Colonic permeability

To assess colonic permeability 90000 cpm of ⁵¹CrEDTA was injected in a volume of 250 µL through the catheter inserted in the proximal colon. Animals were placed in individual metabolic cages, permitting separate collection of urine. The radioactivity of the urine collected for 24 h was counted using a gamma counter (Cobra II, Packard, Meriden, Conn., USA). Paracellular colonic permeability was expressed as the percentage of the administered radioactivity recovered in urine.

Chemicals

TNBS, potassium phosphate, HTAB, H₂O₂, ODHC, MPO, were purchased from Sigma, Saint Quentin Fallavier, France. Lowry (Detergent Compatible Assay) was purchased from Biorad, Ivry, France. Tryp-case soja medium culture, API50CH, Schaedler medium culture, Standard Methods agar, Man Rogosa Shape agar, Drigalski, Schaedler +5% blood sheep agar and Schaedler neomycine-vancomycine +5% blood sheep agar were purchased from Biomerieux, Craponne, France. ELISA immunoassay kits were purchased from Clinisciences, Montrouge, France.

Statistical analysis

Continuous data were expressed as the mean ± s_x (standard error of the mean) and comparisons between the different treatments were performed using an analysis of variance

Table II. Body weight (% change, 4 days after saline or TNBS administration)

	Saline	TNBS
Saline	4.2 ± 0.4	-7.6 ± 1.8 ^a
<i>L. farciminis</i>	5.5 ± 0.8	3.8 ± 1.2 ^b

TNBS = trinitrobenzene sulphonic acid; CFU = colony-forming units.

L. farciminis was given orally for 15 days before and 4 days after saline or TNBS administration, at a dose of 10¹² CFU/day.

^a*P* < 0.05 versus saline/saline.

^b*P* < 0.05 versus TNBS/saline.

(ANOVA), followed by Tukey's Multiple Comparison test for unpaired data. Discontinuous data were expressed as median ± IQ and comparisons between the different treatments were made using a non-parametric test (Mann-Whitney test). Statistical significance was set at *P* < 0.05.

Results

Reduction of TNBS-induced colitis severity

As previously shown (25), *L. farciminis* treatment had an effect on the severity of TNBS-induced colitis by reducing the different inflammatory parameters studied. The TNBS-induced loss in body weight was suppressed by *L. farciminis* treatment (Table II).

TNBS induced macroscopic damage in the colonic wall which consisted of mucosal necrosis of over 1–5 cm, a dark red brown colour, and apparent hyperaemia and ulcers, and a strong increase in colonic MPO activity. *L. farciminis* given orally at a dose of 10¹² CFU/day for 15 days before and 4 days after IC administration of TNBS reduced the macroscopic damage score by 62% and the MPO activity associated with TNBS by 74% (Fig. 1).

L. farciminis survival and colonization, colonic bacterial profile and bacterial translocation

In the absence of inflammation (control rats), *L. farciminis* treatment had no effect on the concentration of resident bacteria, except for a 12-fold increase of lactobacilli counts in colonic content (Fig. 2). *L. farciminis* was identified (API50 CH patterns) in faecal samples, showing its ability to survive through the gastrointestinal tract. It was also identified in colonic content and colonic mucosa from the 5th to the 19th days of treatment, indicating that it was able to persist into the gut.

Four days after TNBS administration, we observed, in comparison with controls, a 12-fold and 15-fold increase in the number of total aerobic bacterial and total Gram-negative bacterial levels, respectively (Fig. 2). Concerning the number of bacteria adhering to or invading the colonic tissue, we also observed a significant increase in total aerobic and Gram-negative aerobic bacterial levels (24-fold) and total anaerobic Gram-negative bacteria counts (16-fold) in colitic rats compared to control rats (Fig. 2). After *L. farciminis* treatment in TNBS rats the bacterial levels were not significantly (*P* > 0.05) different from those of controls (Fig. 2).

In the absence of colonic inflammation, aerobic and anaerobic bacterial cultures were negative in controls and *L. farciminis*-treated rats, suggesting an absence of bacterial translocation. Aerobic and anaerobic bacterial translocation to the mesenteric lymph nodes, liver or spleen was observed in all rats 4 days after TNBS administration (Table III). In colitic rats, *L. farciminis* treatment significantly (*P* < 0.05) reduced or abolished bacterial translocation to all tissues, particularly the liver and spleen. In these organs, the number of CFUs was between 5 and 80. These values are lower than Log₁₀, which is the classical threshold used to state that a bacterial translocation has occurred.

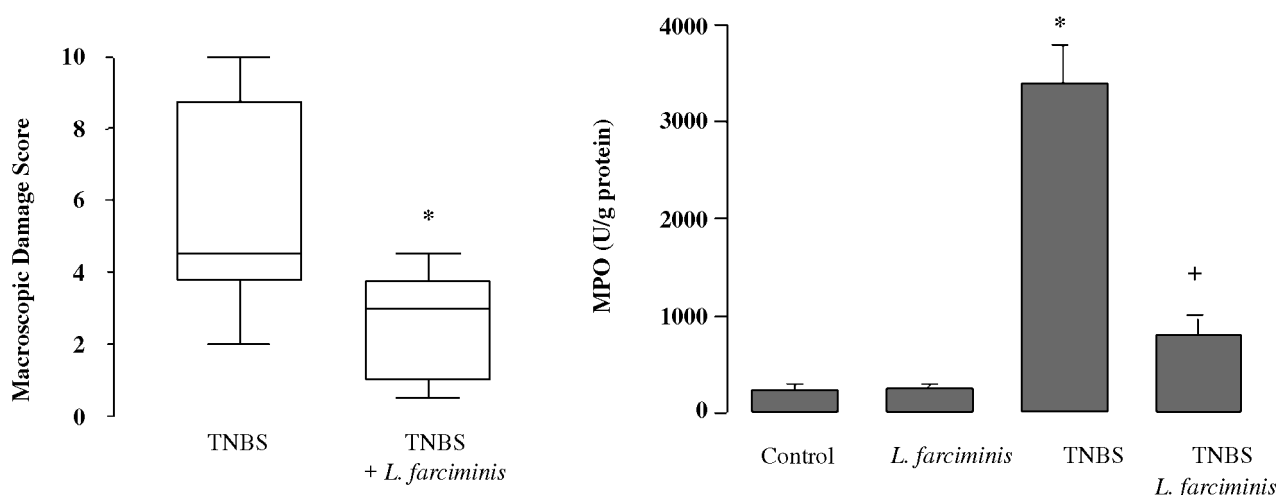


Fig. 1. Effect of *Lactobacillus farciminis* (10¹² CFU/day) treatment on macroscopic damage score and MPO activity in TNBS/ethanol-induced colitis. *Significantly different *P* < 0.05 from controls; + significantly different *P* < 0.05 from TNBS. CFU = colony-forming units; MPO = myeloperoxidase; TNBS = trinitrobenzene sulphonic acid.

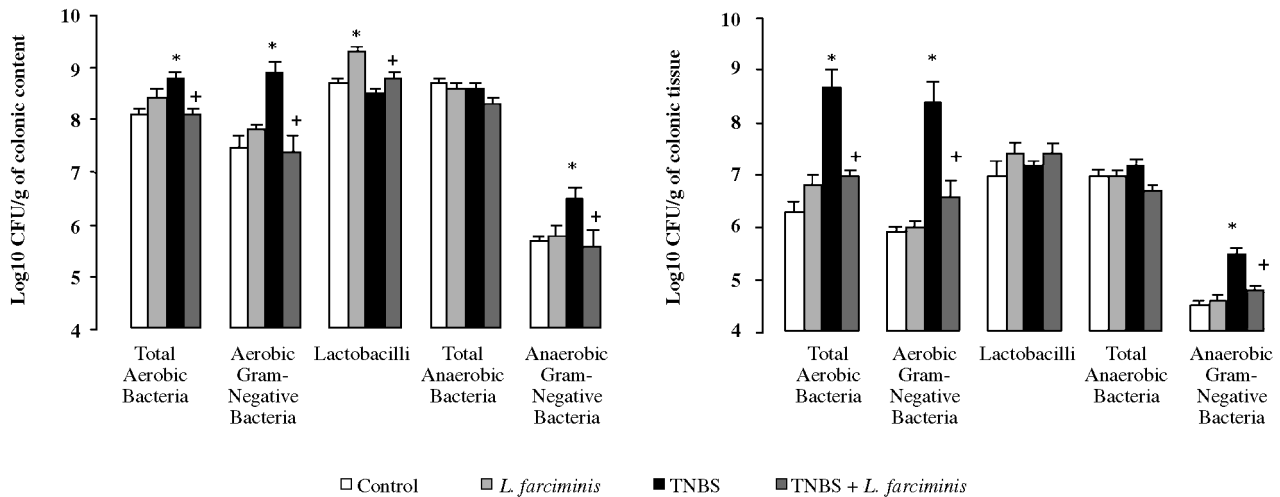


Fig. 2. Effect of *Lactobacillus farciminis* (10^{12} CFU/day) treatment on bacterial level in colonic content and tissue in TNBS/ethanol-induced colitis. *Significantly different $P < 0.05$ from controls; + significantly different $P < 0.05$ from TNBS. CFU = colony-forming units; TNBS = trinitrobenzene sulphonic acid.

Mucosal cytokine levels

Colonic tissue responded to TNBS injury with a 90% increase in mucosal IL-1 β level and a 75% decrease in mucosal IL-10 level, compared to controls. Treatment with *L. farciminis* restored these levels to basal values (Fig. 3). Interestingly, after 19 days of *L. farciminis* treatment without TNBS administration, we observed, a significant ($P < 0.05$) increase in mucosal IL-10 level in comparison with controls (Fig. 3).

Colonic permeability

TNBS administration induced a significant increase ($P < 0.05$) in colonic permeability compared to controls (Fig. 4). *L. farciminis* treatment significantly reduced ($P < 0.05$) the

recovery of $^{51}\text{CrEDTA}$ in urine samples 4 days post-TNBS administration. Furthermore, *L. farciminis* administered during 19 days without TNBS significantly ($P < 0.05$) reduced colonic permeability in comparison with controls (Fig. 4).

Discussion

The present study shows that *L. farciminis* treatment normalizes enteric microflora, mucosal permeability and cytokines mucosal levels altered by colonic inflammation. These effects, in addition to the beneficial effect of nitric oxide released by this bacterial strain, shown in a previous study (25), highlight the mechanisms of the anti-inflammatory

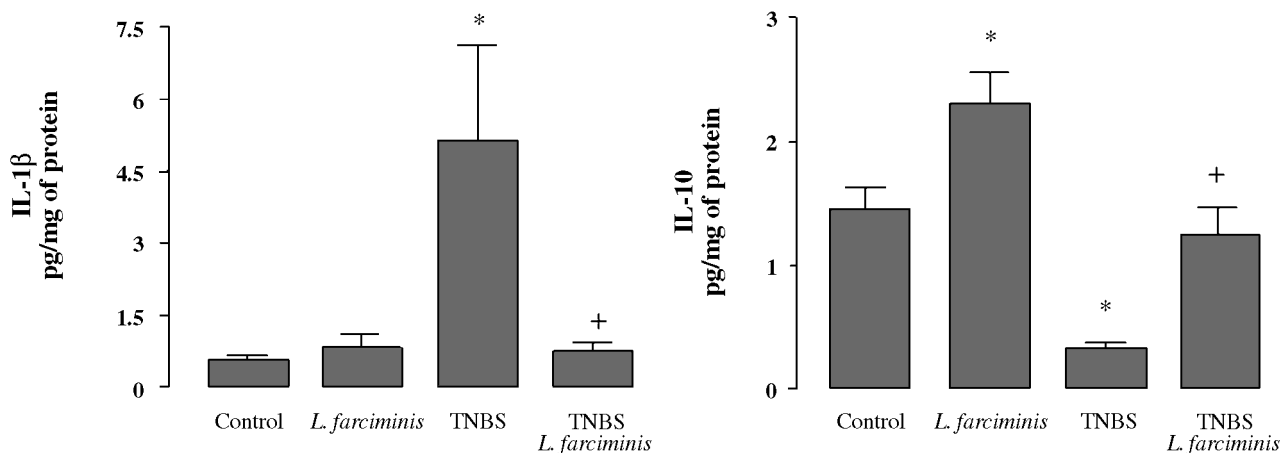


Fig. 3. Effect of *Lactobacillus farciminis* (10^{12} CFU/day) treatment on IL-1 β and IL-10 mucosal level production in TNBS/ethanol-induced colitis. *Significantly different $P < 0.05$ from controls; + significantly different $P < 0.05$ from TNBS. CFU = colony-forming units; TNBS = trinitrobenzene sulphonic acid.

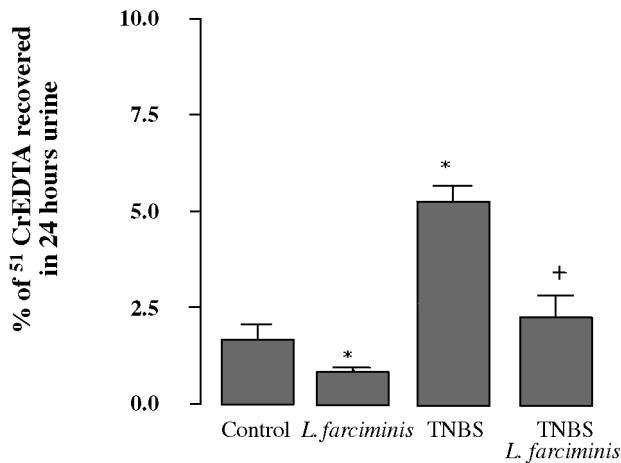


Fig. 4. Effect of *Lactobacillus farciminis* (10^{12} CFU/day) treatment on urinary recovery of $^{51}\text{CrEDTA}$ instilled into the colonic lumen in TNBS/ethanol-induced colitis. *Significantly different $P < 0.05$ from controls; + significantly different $P < 0.05$ from TNBS. CFU = colony-forming units; TNBS = trinitrobenzene sulphonic acid.

action of this probiotic in TNBS-induced colitis. These general mechanisms by which this probiotic exert its anti-inflammatory effect are in agreement with those proposed in the literature for probiotics reported to have beneficial effects in IBD (4–8) and experimental colitis (9–11). Although the pathogenesis of IBD is not fully understood, enteric bacteria (13, 16, 28), alterations in colonic permeability (19) and pro-inflammatory mediators (22, 23) play a crucial role in the onset and/or the chronicity of this disease.

To adhere to a probiotic status, microorganisms must fulfil a number of criteria including the ability to survive and to have a metabolic activity in the gut (29). Moreover, the ability of probiotic to adhere to intestinal cells is considered as a desirable quality, as this is the first step in colonization and may enable modification of the host immune system (30, 31). In this study, the presence of viable *L. farciminis* bacteria, observed by identification of this strain in faeces, shows its ability to survive in the gut. The production of NO in the lumen observed in a previous study indicates that the metabolic activity of this strain persists in the gut (25). Finally, its identification in the mucosa of the proximal colon

shows that *L. farciminis* is able to adhere to and consequently to colonize the gut.

According to the literature, the most attractive potential use of probiotics seems to be a fight against abnormal growth of pathogenic intestinal microorganisms. Garcia-Lafuente et al. (15) emphasize the importance of some anaerobic bacterial species of the common microflora in TNBS-induced inflammation. TNBS colitis has also been found to be associated with a significant increase in colonic Gram-negative aerobic bacilli count (16), and this finding has been confirmed in this study. Furthermore, *L. farciminis* treatment in colitic rats resulted in the normalization of colonic microflora, as reflected by a decrease in several bacterial species including Gram-negative aerobic and anaerobic counts in the colonic content and tissue.

Several probiotics have been found to exert a protective action through an enhancement of the intestinal barrier function (31–33) by strengthening a tight junction between enterocytes (21) and thereby preventing bacterial translocation, which is considered as an index of intestinal barrier failure (34). In this study, as well as others, it has been shown that TNBS-induced colitis is associated with a significant increase in intestinal permeability (35, 36) and bacterial translocation to extra-intestinal sites (16). Alteration in colonic permeability has been reported as a result of direct contact of some commensal bacteria on the mucosa (37). Our data demonstrate that *L. farciminis* treatment reduces colonic permeability in both basal and inflammatory conditions. The reduction of colonic permeability observed in colitic rats treated with *L. farciminis* may be due to an indirect effect of *L. farciminis* through the normalization of colonic microflora. However, since *L. farciminis* reduced permeability in basal conditions, without modifications of the colonic bacterial profile, a direct action on the epithelial barrier can be proposed. This later hypothesis is reinforced by recent data showing that in vitro live *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus* in basal conditions increased transepithelial resistance. This effect on resistance was accompanied by maintenance (actin, ZO-1) or enhancement (actinin, occludin) of cytoskeletal and tight junctional protein (38).

Another mechanism often suggested for the anti-inflammatory effect of a probiotic is immunomodulation. Recent

Table III. Bacterial translocation levels (Log_{10} CFU/g)

Group	Total aerobic bacteria			Total anaerobic bacteria		
	MLN	Liver	Spleen	MLN	Liver	Spleen
TNBS	4.8 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.5 ± 0.2	4.4 ± 0.3	3.6 ± 0.2	3.3 ± 0.1
TNBS + <i>L. farciminis</i>	$3.1 \pm 0.3^*$	$0.7 \pm 0.4^*$	$1.1 \pm 0.5^*$	$2.8 \pm 0.5^*$	$1.1 \pm 0.5^*$	$1.3 \pm 0.6^*$

TNBS = trinitrobenzene sulphonic acid; CFU = colony-forming units.

L. farciminis was given orally for 15 days before and 4 days after saline or TNBS administration, at a dose of 10^{12} CFU/day. MLN: mesenteric lymph nodes.

* $P < 0.05$ versus TNBS.

studies suggest a possible shift from a Th1-mediated immune response towards a Th2 profile after the administration of some probiotic agents (39, 40). On the other hand, it has been widely suggested that the balance between Th1 and Th2 profiles, as well as Th3 profile, is pivotally controlled by stimulating dendritic cells (41, 42). Intestinal dendritic cells can be either tolerogenic or immunogenic, depending on their type and state of activation (43, 44). Activated dendritic cells have been observed in mucosa of IBD patients (45, 46) and in the lymph nodes in animal models of colitis (47), where they seem to play an early role in this disease. Probiotics may act partly by modulating the function of the gut dendritic cells (48, 49). In fact, lactobacilli species exert different and even opposing effects on dendritic cell activation, indicating that they may differentially determine whether a dendritic cell favours a Th1, Th2 or Th3 immune response (50).

Increased production of IL-1 β has been observed in TNBS colitis (51) and this study confirms these data. Additionally, in this model we also observed a decreased in IL-10 concentration. Administration of *L. farciminis* in colitic rats restores these levels to basal values. The ability to decrease pro-inflammatory cytokines has also been noted for other probiotics as reflected by TNF- α and INF- γ reduction in IL-10-deficient colitic mice (12, 33, 52). On the other hand, *L. farciminis* treatment in non-colitic rats significantly increased mucosal IL-10 production. We can suggest that IL-10 may down-regulate pro-inflammatory cytokines (53, 54) and therefore may down-regulate epithelium permeability by reducing IL-1 β or by acting directly on the epithelium (see review 55). Furthermore, it has been shown that probiotic can alter cell surface antigen expression and cytokine production in bone marrow-derived, dendritic cell-enriched populations, contributing to immunomodulation (56). For instance, VSL#3 is able to up-regulate IL-10 production in human gut and blood dendritic cells (57). Substantial enhancement of IL-10 release has been also observed in dendritic cell-enriched culture supernatants after 3 days of probiotic stimulation (56). In contrast, T cells generated from *Lactobacillus rhamnosus* matured dendritic cells did not produce high amounts of IL-10 (58).

We have shown in a previous study (25) that *L. farciminis* treatment reduced the severity of TNBS-induced colitis through a release of NO, since this anti-inflammatory action was reversed by an NO scavenger and reproduced by an NO donor. The question arises whether the colonic responses to *L. farciminis* treatment in TNBS-induced colitis, reported in this study, are also mediated through a release of NO. The data do not permit the hypothesis of a role of NO in the normalization of the bacterial flora altered in TNBS-induced colitis. Similarly, we cannot postulate a role of NO in the increased production of IL-10 and the decrease in IL-1 β . On the contrary, it has been shown that IL-1 β can be produced in colonic epithelial cells through an NO-dependent pathway (59) and that an NO donor augments the secretion of the IL-1 β in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis (60).

Concerning paracellular permeability, NO seems to play an ambiguous role. For example, NO donors have been found to have increased permeability (61) and to ameliorate permeability disturbed by a bacterial antigen (62).

In conclusion, this study indicates that *L. farciminis* shares the general mechanisms involved in the beneficial effects of probiotic treatment. It is likely that *L. farciminis* exerts an anti-inflammatory effect on TNBS-induced colitis, through the association of different pathways such as the ability of this probiotic strain to normalize colonic microflora and prevent bacterial translocation, to enhance barrier integrity, to decrease the mucosal level of IL-1 β and also to release NO in the colonic lumen, as previously shown (25). Taken together, all these data suggest that *L. farciminis* could be considered as a promising therapeutic agent in IBD.

Acknowledgements

This work was supported in part by the ATC Nutrition grant from INRA and INSERM and a grant from the Food and Health Network of the Midi-Pyrénées Région.

References

1. Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut* 2002;51:405-9.
2. Kuisma J, Mentula S, Jarvinen H, Kahri A, Saxelin M, Farkkila M. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:509-15.
3. Campieri M, Gionchetti P. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? *Gastroenterology* 1999;116:1246-9.
4. Malin M, Suomalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. *Ann Nutr Metab* 1996; 40:137-45.
5. Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:853-8.
6. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354:635-9.
7. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1462-4.
8. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:305-9.
9. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Willen R, Andersson R, Molin G, et al. The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:155-62.
10. Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Molin G, et al. The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996;111: 334-44.
11. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999;116:1107-14.

12. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, et al. *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:71–80.
13. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;102:448–55.
14. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996;38:365–75.
15. Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, et al. Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol* 1997;272:G10–5.
16. Gardiner KR, Erwin PJ, Anderson NH, Barr JG, Halliday MI, Rowlands BJ. Colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis. *Br J Surg* 1993;80:512–6.
17. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986;105:883–5.
18. Pironi L, Miglioli M, Ruggeri E, Levorato M, Dallasta MA, Corbelli C, et al. Relationship between intestinal permeability to [51Cr]EDTA and inflammatory activity in asymptomatic patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1990;35:582–8.
19. Gardiner KR, Anderson NH, Rowlands BJ, Barbul A. Colitis and colonic mucosal barrier dysfunction. *Gut* 1995;37:530–5.
20. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979;23:403–11.
21. Lu L, Walker WA. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1124–30.
22. Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, Witt C, Lochs H, Schreiber S. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut* 1998;42:470–6.
23. Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, et al. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992;37:818–26.
24. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289:1352–5.
25. Lamine F, Fioramonti J, Bueno L, Nepveu F, Cauquil E, Ilobysheva, et al. Nitric oxide released by *Lactobacillus farciminis* improves TNBS-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:37–45.
26. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, et al. Exacerbation of experimental colitis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is not related to elevated leukotriene B₄ synthesis. *Gastroenterology* 1992;102:18–27.
27. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78:206–9.
28. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997;92:5–11.
29. Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1052–7.
30. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365–78.
31. Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996;70:347–58.
32. Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 1993;105:1643–50.
33. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001;121:580–91.
34. Deitch EA, Berg R, Specian R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987;122:185–90.
35. Stein J, Ries J, Barrett KE. Disruption of intestinal barrier function associated with experimental colitis possible role of mast cells. *Am J Physiol* 1998;274:G203–9.
36. Asfaha S, MacNaughton WK, Appleyard CB, Chadee K, Wallace JL. Persistent epithelial dysfunction and bacterial translocation after resolution of intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G635–44.
37. Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E, Malagelada JR. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut* 2001;48:503–7.
38. Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 2003;52:988–97.
39. Schultz M, Linde HJ, Lehn N, Zimmermann K, Grossmann J, Falk W, et al. Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. *J Dairy Res* 2003;70:165–73.
40. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001;73:444–50.
41. Kronin V, Hochrein H, Shortman K, Kelso A. Regulation of T cell cytokine production by dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2000;78:214–23.
42. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;20:561–7.
43. Williamson E, Westrich GM, Viney JL. Modulating dendritic cells to optimize mucosal immunization protocols. *J Immunol* 1999;163:3668–75.
44. Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA. Expanding dendritic cells in vivo enhance the induction of oral tolerance. *J Immunol* 1998;160:5815–25.
45. Vuckovic S, Florin TH, Khalil D, Zhang MF, Patel K, Hamilton I, et al. CD40 and CD86 upregulation with divergent CMRF44 expression on blood dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2946–56.
46. Ikeda Y, Akbar F, Matsui H, Onji M. Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:841–50.
47. Malmstrom V, Shipton D, Singh B, Al-Shamkhani A, Puklavec MJ, Barclay AN, et al. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol* 2001;166:6972–81.
48. Iwasaki A, Kelsall BL. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:4884–90.
49. Hart AL, Stagg AJ, Frame M, Graffner H, Glise H, Falk P, et al. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1383–93.
50. Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002;168:171–8.
51. Togawa J, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Umezawa T, Nakajima A, et al. Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G187–95.
52. McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N, et al. Double-blind, placebo-controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 2003;52:975–80.
53. Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994;56:1–26.
54. Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;108:1434–44.
55. Perdue MH. Mucosal immunity and inflammation. III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol* 1999;277:G1–5.

56. Drakes M, Blanchard T, Czinn S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun* 2004;72:3299–309.
57. Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. Microbial-gut interactions in health and disease. Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:255–70.
58. Braat H, de Jong EC, van den Brande JM, Kapsenberg ML, Peppelenbosch MP, van Tol EA, et al. Dichotomy between *Lactobacillus rhamnosus* and *Klebsiella pneumoniae* on dendritic cell phenotype and function. *J Mol Med* 2004;82:197–205.
59. Vallette G, Jarry A, Lemarre P, Branka JE, Laboisie CL. NO-dependent and NO-independent IL-1 production by a human colonic epithelial cell line under inflammatory stress. *Br J Pharmacol* 1997;121:187–92.
60. Kankuri E, Hamalainen M, Hukkanen M, Salmenpera P, Kivilaakso E, Vapaatalo H, et al. Suppression of pro-inflammatory cytokine release by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in mucosal explants from patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:186–92.
61. Yamamoto A, Tatsumi H, Maruyama M, Uchiyama T, Okada N, Fujita T. Modulation of intestinal permeability by nitric oxide donors: implications in intestinal delivery of poorly absorbable drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:84–90.
62. Rachlis A, Watson JL, Lu J, McKay DM. Nitric oxide reduces bacterial superantigen-immune cell activation and consequent epithelial abnormalities. *J Leukoc Biol* 2002;72:339–46.

Received 16 February 2004

Accepted 9 June 2004

RESULTAT 3

Influence d'un traitement oral par *Lactobacillus farciminis*
sur l'hypersensibilité colo-rectale induite
par une colite au TNBS chez le rat

Influence d'un traitement oral par *Lactobacillus farciminis*
sur l'hypersensibilité colo-rectale induite
par une colite au TNBS chez le rat

A. SITUATION DU SUJET

L'inflammation digestive induit un état d'hyperalgésie viscérale correspondant à une activation exagérée des voies sensibles en réponse à des stimuli douloureux ou non, (Fioramonti *et al.*, 2001). Ainsi, une hypersensibilité du rectum se traduisant par un abaissement du seuil de douleur en réponse à la distension intra-luminale rectale a été rapportée chez les patients souffrant de RCH (Rao *et al.*, 1987, 1988) et lors d'inflammation colique induite par le TNBS chez le rat (Morteau *et al.*, 1994). Cependant peu de données sont disponibles dans la littérature concernant l'influence d'un traitement probiotique sur la sensibilité viscérale. Nous avons préalablement montré qu'un traitement par *Lactobacillus farciminis* réduit la sévérité d'une colite induite par le TNBS via l'implication du NO libéré dans la lumière colique par cette souche. Concernant le rôle du NO dans la douleur viscérale peu de données sont également disponibles. Toutefois, il a été montré qu'en conditions basales un traitement par le SNP réduit la réponse nociceptive à la distension gastrique chez le rat, évaluée par la réponse cardio-vasculaire (Rouzade *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'implication du NO dans l'hyperalgésie somatique d'origine inflammatoire a fait l'objet de nombreux travaux lui attribuant pour la plupart un effet anti-nociceptif (Ferreira *et al.*, 1991 ; Fidecka & Lalewick, 1997). Par conséquent, dans cette étude nous nous proposons d'évaluer l'influence d'un traitement oral par *Lactobacillus farciminis* sur l'hypersensibilité colo-rectale à la distension induite par une colite au TNBS chez le rat et de mettre en évidence un mécanisme d'action impliquant le NO.

B. METHODOLOGIE

I. Animaux

Huit lots de 10 rats mâles Wistar (200 - 250 g) ont été utilisés. Les animaux ont été placés dans des cages individuelles en polypropylène dans une pièce à 21 ± 1 °C et ont reçu une alimentation standard (UAR, Epinay, France) et de l'eau à volonté.

II. Chirurgie

Sous anesthésie générale [acepromazine 0,5 mg/kg par voie intraperitonéale (Calmivet, Vetoquinol, Lure) et ketamine 100 mg/kg par voie intramusculaire (Imalgène, Rhône Merieux, Toulouse)] les animaux ont été équipés (i) d'un cathéter intra-colique pour l'instillation du TNBS ou son solvant et la perfusion d'hémoglobine ou de NaCl, (ii) d'électrodes pour des enregistrements électromyographiques chroniques selon la technique de Ruckebusch et Fioramonti, 1975.

Un cathéter en polypropylène (diamètre externe : 0,7 mm ; diamètre interne : 0,3 mm ; longueur : 60 cm) a été utilisé. Après incision ponctuelle de la paroi du côlon proximal à 2 cm de la jonction cæco-colique, le cathéter a été introduit dans la lumière colique et solidarisé avec la paroi colique. Après suture des plans musculaires, le cathéter a été fixé par nœud simple sur le muscle strié de l'abdomen et extériorisé en région dorso-scapulaire.

Trois groupes de trois électrodes constituées d'un alliage de nickel (80%) et de chrome (20%) (longueur : 60 cm; diamètre : 80 µm) ont été implantés dans le muscle strié de l'abdomen (muscle oblique) à 2 cm latéralement à la ligne blanche. Les extrémités libres des électrodes ont été extériorisées en région dorsoscapulaire.

Le cathéter et les électrodes ont été introduits dans un tube en verre afin de les protéger et de les solidariser au niveau de la peau.

Cinq jours après la chirurgie, la colite a été induite. Les enregistrements électromyographiques (EMG) ont été effectués 4 jours après l'induction de la colite.

III. Enregistrement de l'activité électromyographique

L'activité EMG a été enregistrée en connectant les électrodes à un polygraphe (Mini VIII, Alvar, Paris, France) en dérivation bipolaire avec une courbe constante de temps (0,03 sec) permettant le recueil préférentiel de l'activité rapide de potentiels correspondant aux contractions de l'abdomen.

IV. Induction de la colite

Après anesthésie générale des animaux, une solution d'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS ; 80 mg / kg dans 0,2 ml d'éthanol) a été instillée par voie intra-colique au moyen du cathéter préalablement inséré dans la lumière colique.

V. Distension colo-rectale

La distension de différentes parties du tube digestif est le stimulus le plus souvent utilisé dans les modèles mis en œuvre pour étudier la douleur viscérale. Parmi ces modèles on distingue la distension colo-rectale chez le rat éveillé qui engendre deux réponses : un réflexe recto-colique inhibiteur et une douleur viscérale caractérisée par une augmentation des crampes abdominales (Morteau *et al.*, 1994).

Afin d'éviter des artefacts dus aux mouvements des animaux pendant la distension, les rats ont été habitués à séjourner dans des tunnels en polypropylène (longueur : 20 cm ; largeur : 7 cm) pendant 3 jours avant l'expérimentation.

La session de distensions colo-rectales a été réalisée à l'aide d'un ballonnet en latex (longueur: 4 cm) fixé l'une des extrémités d'un cathéter de 80 cm. Le ballonnet a été introduit à 1 cm de la marge anale, puis fixé à la base de la queue avec du ruban adhésif, afin d'éviter son expulsion. L'autre extrémité du cathéter permettant d'appliquer des pressions de distension est

connectée à un capteur de pression électronique (Barostat, INRA, Toulouse, France). Les distensions colo-rectales ont été réalisées par paliers de 5 min pour des pressions croissantes allant de 0 à 60 mm de mercure (Hg) (incrément de 15 mm Hg). L'utilisation du barostat électronique permet d'une part de réaliser des distensions parfaitement reproductibles et à une vitesse constante d'insufflation d'air, et d'autre part de mesurer précisément, et en même temps, le volume et la pression du ballonnet de distension. Cette mesure simultanée de la pression et du volume du ballonnet à chaque distension permet de construire une courbe pression-volume, dont la pente reflète la compliance du côlon ; la compliance étant une mesure du tonus de la paroi de l'organe creux étudié.

La douleur viscérale induite par la session des distensions colo-rectales a été évaluée par mesure du nombre des crampes abdominales enregistrées par électromyographie.

VI. Protocole

Les animaux (repartis en huit lots de 10 individus) ont reçu une administration orale journalière de NaCl (0,09 % ; 0,5 ml) (lots 1, 2, 5, 6) ou de *Lactobacillus farciminis* à la dose de 10^{12} unités formant colonies (ufc) (lots 3, 4, 7, 8) pendant les 15 jours qui ont précédé et les 4 jours qui ont suivi l'induction de la colite. Quatre heures après l'instillation du TNBS (lots 5-8) ou du NaCl (lots 1-4), les animaux ont été perfusés en continu (24 heures / 24 ; débit : 250 μ l / h, pendant les 4 jours de la colite) avec du NaCl (lots 1, 3, 5, 7) ou de l'hémoglobine (Hb, 200 mg / kg / j) un piègeur de monoxyde d'azote (NO) (lots 2, 4, 6, 8).

La chirurgie des animaux a eu lieu 10 jours après le début des traitements. Les distensions colo-rectales ont eu lieu au 19^{ème} jour afin d'évaluer l'incidence des traitements sur l'hypersensibilité liée au TNBS (Figure 17).

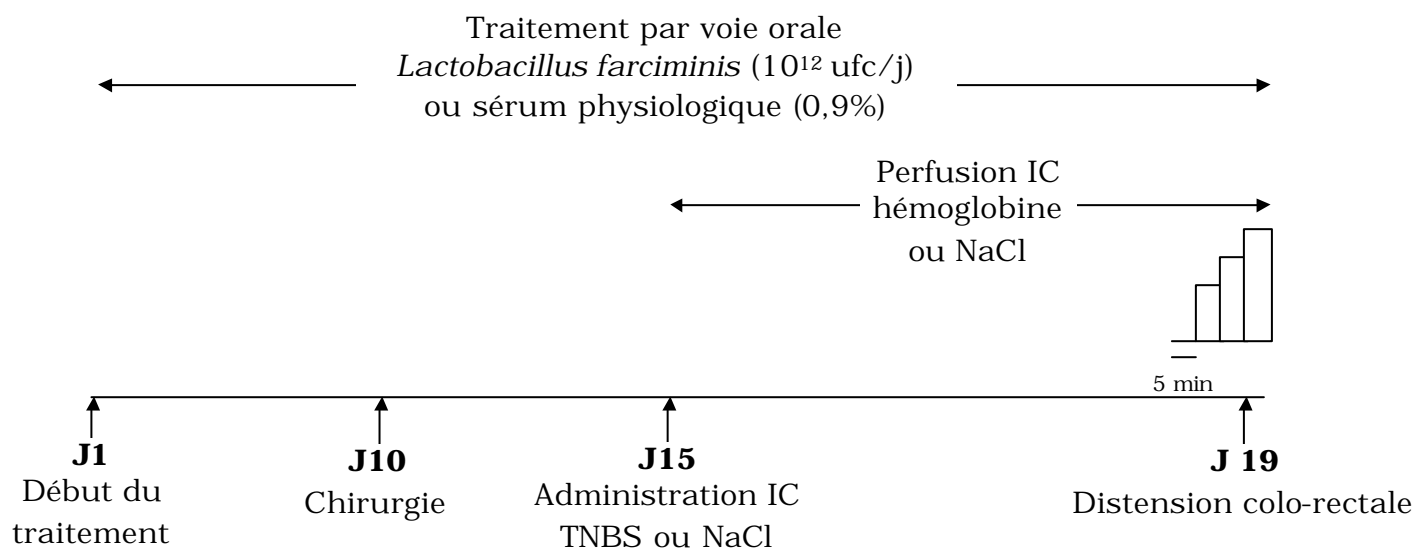


Figure 17 : Protocole expérimental relatif à l'étude de l'effet d'un traitement par *Lactobacillus farciminis* sur l'hypersensibilité colo-rectale à la distension induite par une colite au TNBS.

VII. Analyses statistiques

Les comparaisons du nombre de contractions abdominales, entre les différents lots, pour chaque période de 5min de distension colo-rectale ont été effectuées après une analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de Tukey à comparaisons multiples pour valeurs non appariées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (ESM). Les différences sont considérées significatives pour les valeurs de $P < 0,05$.

VIII. Résultats

1. Effet d'un traitement oral par *Lactobacillus farciminis* sur la réponse abdominale liée à la distension colo-rectale : implication du NO.

En conditions basales, les distensions colo-rectales progressives ont induit une augmentation du nombre de contractions abdominales de manière pression-dépendante chez tous les animaux (figure 18).

Un traitement oral de 19 jours par *L. farciminis* augmente le seuil de sensibilité à la distension. Ainsi, le seuil de pression pour induire une augmentation significative du nombre de contractions abdominales se situe à 15 mm Hg chez les animaux témoins et à 30 mm Hg chez les animaux traités par *L. farciminis* (figure 18). L'apparition de ce seuil dès le premier pallier de pression de distension chez les animaux témoins s'explique par le fait que tous les animaux utilisés dans cette expérimentation sont des animaux naïfs, c'est-à-dire n'ayant pas été entraînés au préalable à la distension colo-rectale. Une diminution significative ($P < 0,05$) de l'intensité de la réponse nociceptive a également été observée chez les animaux traités par *L. farciminis* par rapport aux animaux témoins. Cela se traduit en réponse à chaque pression de distension appliquée par une diminution du nombre de contractions abdominales (Figure 18). Cet effet analgésique de *L. farciminis* a été aboli par la perfusion d'hémoglobine, mettant en évidence l'implication du NO dans cet effet.

Aucune différence dans la réponse nociceptive n'a en revanche été observée, en l'absence de traitement par *L. farciminis*, entre les lots d'animaux témoins recevant une perfusion de NaCl et ceux recevant une perfusion d'hémoglobine et ce pour chaque pression de distension appliquée. Ce résultat souligne que l'hémoglobine n'a pas d'effet propre sur la perception nociceptive.

La mesure simultanée de la pression et du volume du ballon à chaque distension appliquée montre qu'aucun des traitements ne modifie le tonus de la paroi du côlon (Figure 19).

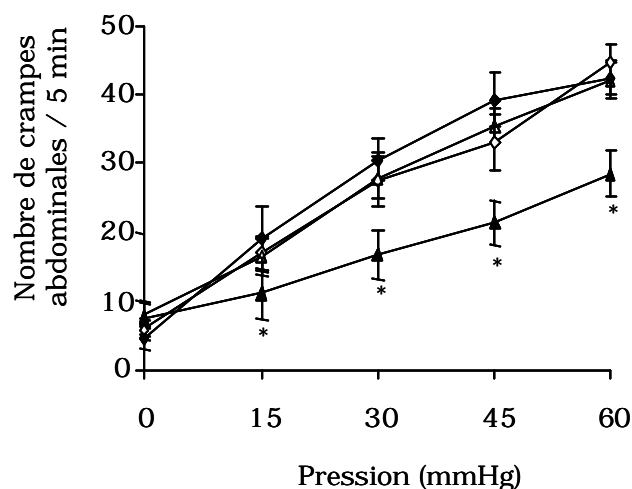


Figure 18 : Effet d'un traitement par *L. farciminis* (10^{12} ufc/j) sur la réponse abdominale liée à la distension colo-rectale et réversion par l'hémoglobine (Hb 200 mg/kg/j).

* P < 0,05 significativement différent du lot témoin

◆ Témoins (NaCl) ◊ Témoins + Hb
 ▲ *L. farciminis* ◀ *L.farciminis* + Hb

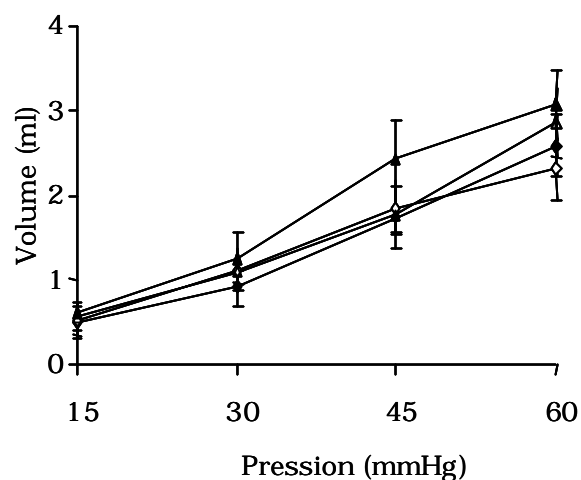


Figure 19 : Effet d'un traitement par *L. farciminis* (10^{12} ufc/j) en présence ou non d'hémoglobine Hb 200 mg/kg/j sur le tonus musculaire en réponse à la distension colo-rectale.

◆ Témoins (NaCl) ◊ Témoins + Hb
 ▲ *L. farciminis* ◀ *L.farciminis* + Hb

2. Effet d'un traitement oral par *Lactobacillus farciminis* sur l'hypersensibilité viscérale induite par la colite au TNBS en réponse à la distension colo-rectale : implication du NO.

Par rapport au lot témoin recevant uniquement le NaCl, l'administration du TNBS a induit une augmentation significative ($P < 0,05$) du nombre de crampes abdominales à partir de la pression de distension 15 mmHg. Cette réponse nociceptive exacerbée à toutes les pressions de distension traduit une hypersensibilité viscérale (tableau VI). A l'inverse, chez les animaux traités par *L. farciminis* l'administration du TNBS n'a pas induit de modifications dans la réponse nociceptive liée à la distension par rapport aux animaux traités par *L. farciminis* et ayant reçu une administration de NaCl (Tableau VI).

	Pression de distension colo-rectale (mmHg)				
	0	15	30	45	60
Témoins (NaCl)	4,7 ± 1,7	19,0 ± 4,5	30,5 ± 2,9	39,3 ± 4,0	42,5 ± 2,5
TNBS	8,3 ± 1,7*	38,7 ± 3,9*	61,5 ± 3,2*	74,7 ± 3,8*	81,2 ± 3,6*
<i>L. farciminis</i>	7,4 ± 2,3	11,0 ± 3,7	16,6 ± 3,6	21,2 ± 3,2	28,4 ± 3,4
TNBS + <i>L. farciminis</i>	7,2 ± 2,2 ⁺	11,5 ± 3,5 ⁺	19,8 ± 4,6 ⁺	28,2 ± 5,7 ⁺	32,8 ± 6,0 ⁺

Tableau VI : Effet du TNBS sur la sensibilité viscérale en réponse à la distension colo-rectale et influence d'un traitement par *L. farciminis* (10^{12} ufc/j) sur la réponse abdominale à la distension en conditions inflammatoires

Les valeurs reportées représentent le nombre de contractions abdominales sur la période de 5 minutes de distension (moyenne ± ESM).

* P < 0,05 significativement différent du lot témoins NaCl ; + P < 0,05 significativement différent du lot TNBS

Les changements dans la sensibilité colo-rectale à la distension induits par le TNBS sont modifiés par le traitement par *Lactobacillus farciminis*. Ces animaux présentent un nombre de contractions abdominales significativement réduit par rapport aux animaux TNBS recevant le NaCl et ce pour toutes les pressions de distension appliquées (Figure 20). Une perfusion d'hémoglobine en continu pendant les 4 jours de la colite chez les animaux traités par le TNBS et recevant *L. farciminis*, a inversé les effets antinociceptifs de *L. farciminis* sur l'hypersensibilité à la distension induite par le TNBS. Ce résultat montre l'implication du NO dans l'effet analgésique par *L. farciminis*. En revanche, aucune différence significative dans la réponse abdominale, liée aux distensions colo-rectales progressives, n'a été observée entre les animaux ayant reçu la colite au TNBS, traités avec le NaCl et perfusés en continu pendant les 4 jours de la colite avec de l'hémoglobine par rapport aux animaux TNBS traités et perfusés par le NaCl.

Dans ces conditions inflammatoires, la mesure de la compliance n'est pas modifiée et ce pour aucun des traitements appliqués (Figure 21)

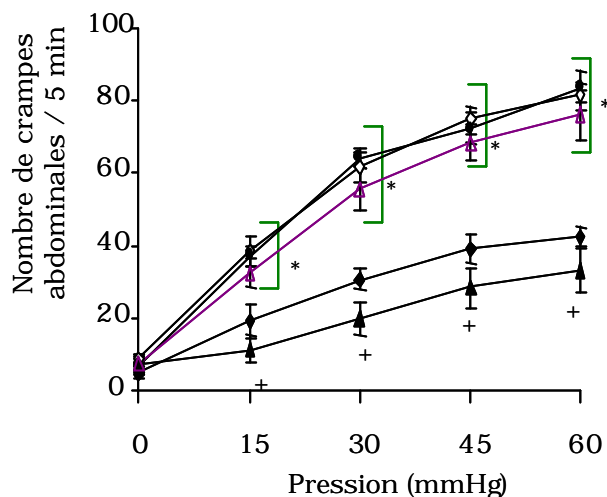


Figure 20 : Effet d'un traitement par *L. farciminis* (10^{12} ufc/j) sur l'hypersensibilité viscérale induite par le TNBS en réponse à la distension colo-rectale et réversion par l'hémoglobine (Hb 200 mg/kg/j).

* P < 0,05 significativement différent du lot témoin :

+ P < 0,05 significativement différent du lot TNBS

◆ Témoins (NaCl) ◇ TNBS ● TNBS + Hb
 ▲ TNBS + *L. farciminis* ▲ TNBS + *L. farciminis* + Hb

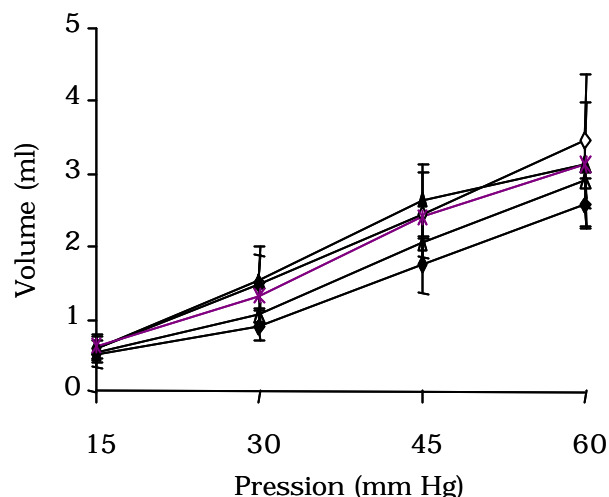


Figure 21 : Effet d'un traitement par *L. farciminis* (10^{12} ufc/j) en présence ou non d'hémoglobine (Hb 200 mg/kg/j) sur le tonus musculaire en réponse à la distension colo-rectale dans la colite induite par le TNBS.

◆ Témoins (NaCl) ◇ TNBS
 ● TNBS + Hb ▲ TNBS + *L. farciminis*
 ▲ TNBS + *L. farciminis* + Hb

En résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'influence d'un traitement oral par *L. farciminis* sur la sensibilité rectale à la distension et l'hypersensibilité induite par une colite au TNBS chez le rat et de déterminer l'implication du monoxyde d'azote délivré dans la lumière colique par cette souche.

Les résultats obtenus montrent qu'en conditions basales *L. farciminis* a un effet à la fois sur le seuil nociceptif qui est augmenté et sur l'intensité de la réponse nociceptive induite par les distensions colo-rectales qui est diminuée. Cet effet analgésique de *L. farciminis* implique le NO.

En conditions d'hypersensibilité viscérale induite par la colite au TNBS, *L. farciminis* s'est montré efficace dans la réduction du nombre de crampes abdominales en réponse à la distension colo-rectale. La réversion de cet effet

par l'hémoglobine met en évidence l'implication du NO dans la réduction de l'hypersensibilité viscérale d'origine inflammatoire.

De plus, le tonus musculaire du côlon n'est affecté par aucuns des traitements et ce aussi bien en conditions basales qu'en conditions inflammatoires.

Partie 3

*Discussion générale
et perspectives*

Les études conduites chez l'animal et chez l'homme depuis ces vingt dernières années montrent des potentialités thérapeutiques de certains probiotiques aussi bien vis-à-vis de pathologies digestives (infection et inflammation intestinale, troubles fonctionnels intestinaux, cancers colo-rectaux), qu'extra-digestives (allergie cutanée, respiratoire). Les cibles potentielles des probiotiques décrites à ce jour dans la littérature sont la prévention et le traitement de maladies aiguës ou chroniques. Dans ce contexte d'applications thérapeutiques possibles, un effort considérable reste à faire dans la compréhension et dans la détermination des mécanismes d'action impliqués dans les effets exercés par ces agents microbiens. Aussi, une approche plus rationnelle dans la sélection des probiotiques pourrait être proposée afin de préjuger des potentialités thérapeutiques de ces derniers. Par exemple, dans l'objectif d'une application thérapeutique dans les pathologies d'origine inflammatoire, cette approche pourrait être basée sur le choix préalable d'une bactérie dont un des métabolites serait susceptible d'exercer un pouvoir anti-inflammatoire.

C'est dans cette démarche que se situe ce travail. Ainsi, notre hypothèse de départ était que du monoxyde d'azote (NO) apporté de manière exogène dans la lumière colique, pourrait réduire la sévérité d'une colite expérimentale. Si cette hypothèse se vérifiait, notre objectif était de confirmer les propriétés anti-inflammatoires du NO exogène, vis-à-vis de cette colite expérimentale, apporté par une souche bactérienne (*Lactobacillus farciminis*) susceptible de libérer du NO dans la lumière colique.

Ce travail s'est par conséquent déroulé en trois temps. Dans un premier temps, nous avons étudié à l'aide d'un donneur chimique de NO, le nitroprussiate de sodium (SNP), les effets d'un apport de NO exogène au cours d'une colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) chez le rat. Ensuite, après avoir mis en évidence la capacité de *L. farciminis* de libérer du NO *in vivo*, nous avons déterminé les effets de ce lactobacille sur la colite induite par le TNBS et l'implication du NO ainsi apporté dans ces effets. Dans un deuxième temps, dans l'objectif d'attribuer le statut de probiotique à

L. farciminis, nous avons également évalué les mécanismes anti-inflammatoires généralement partagés par les probiotiques tels que la "normalisation" de la flore colique, la prévention de la translocation bactérienne et le renforcement de la barrière intestinale, ainsi que la modulation du profil des cytokines. Enfin, nous avons étudié l'influence d'un traitement oral par *Lactobacillus farciminis* sur l'hypersensibilité viscérale induite par la colite au TNBS en réponse à une distension colo-rectale.

1. Considérations méthodologiques

Le choix de la souche bactérienne a constitué une des premières étapes de notre travail. Le critère "capacité de production de NO" en tant que métabolite bactérien a principalement orienté notre choix. Plusieurs souches bactériennes sont décrites dans la littérature comme productrice de NO *in vitro* à partir de la réduction des nitrates en nitrites sous l'action de nitrate réductase et des nitrites en NO sous l'action d'une nitrite réductase dénitrifiante (Avice *et al.*, 1999 ; Xu *et al.*, 2001). *Lactobacillus farciminis* figure parmi ces souches (Wolf *et al.*, 1990). Ce choix a été largement motivé par la suite du fait de la disponibilité de ce lactobacille dans la collection de l'Institut Pasteur (CIP 103136 ; facilité d'accès), sa présence naturelle dans les denrées alimentaires (Reuter, 1970) et son utilisation dans l'industrie agro-alimentaire (Bioacarna®). Ces éléments nous ont paru prometteurs en tant qu'indices d'innocuité pour une application thérapeutique future par *Lactobacillus farciminis*.

En conditions physiologiques, le taux de nitrates et nitrites présents au niveau colique est très faible chez l'homme (Wagner *et al.*, 1983). Chez le rat, il semblerait qu'après réduction des nitrates par la flore commensale, les nitrites sont à leur tour dégradés au fur et à mesure (Fritsch & de Saint-Blanquat, 1976).

Dans notre étude, la question relative à la présence et en concentration suffisante de nitrites dans la lumière colique, en tant que substrat pour

L. farciminis, s'est posée en termes d'éventuel facteur limitant. Le dosage des nitrates et des nitrites au niveau du contenu colique, en utilisant la technique classique de la réaction de Greiss, ne s'est pas révélée concluante. Ainsi, nous avons opté pour la quantification de NO directement dans le contenu colique par une méthode mise au point par le laboratoire Pharmacophores Redox⁽¹⁾ utilisant la résonance électroparamagnétique. Une augmentation de la teneur de NO endoluminal a été mise en évidence après traitement par *L. farciminis*, montrant que ce lactobacille était capable de libérer du NO *in vivo*. Ce résultat plaide en faveur de la présence d'une teneur en nitrites dans la lumière colique suffisante à l'expression métabolique de cette souche bactérienne.

Une autre source possible de NO dosé dans le contenu colique pourrait être du NO produit par l'activation de la NO synthase inductible (iNOS) dans les cellules épithéliales et immunitaires et ayant diffusé dans la lumière colique après traitement par *L. farciminis*. En effet, d'autres souches bactériennes telles que *L. acidophilus* (Tejada-Simon *et al.*, 1999) et *Lactobacillus* GG (Korhonen *et al.*, 2001) stimulent *in vitro* l'activation de la iNOS dans ces cellules. Cette possibilité paraît peu probable dans ce travail, puisque aucune augmentation de la iNOS tissulaire n'a été observée après traitement par *L. farciminis*.

La durée du traitement par *L. farciminis* (15 jours avant et 4 jours après l'induction de la colite) a été choisie de façon arbitraire. Un traitement préventif de 7 jours est généralement adopté pour l'évaluation des différentes souches bactériennes dans des modèles de colites expérimentales (Shibolet *et al.*, 2002 ; Osman *et al.*, 2004). *L. farciminis* n'appartenant pas à la flore commensale du rat, nous avons par conséquent opté pour un traitement préventif plus long afin de permettre l'adaptation de ce lactobacille dans un biotope inconnu. Ce traitement préventif ainsi que le traitement curatif de 4 jours (post-induction de la colite) ont également été choisis afin de se placer dans des conditions de libération constante de NO dans la lumière colique.

⁽¹⁾ Laboratoire Pharmacophores Redox, Université Paul Sabatier, Toulouse 3

Enfin, la dose de 10^{12} ufc/j a été choisie suite à des expériences préliminaires conduites avec l'administration d'une dose inférieure (10^8 ufc/j) qui s'est révélée inefficace vis-à-vis de la réduction de la colite induite par TNBS.

Un autre paramètre expérimental qui a été choisi dans ce travail concerne l'induction de la colite au TNBS. Ce modèle classique de colite expérimentale initialement proposé par Morris *et al.*, (1989) consiste en l'instillation de TNBS par voie intra-rectale. Dans notre étude, nous avons choisi d'instiller le TNBS dans le côlon proximal plutôt que dans un segment plus distal, compte tenu des particularités physiologiques coliques chez le rat. Le côlon distal est en effet caractérisé par la présence de fécès à haute teneur en matières sèches alors que le contenu du côlon proximal est semi-liquide. Nous avons donc considéré que l'activité de *L. farciminis* et par conséquent la libération du NO par cette souche seraient optimisées dans un milieu plutôt liquide soumis à un brassage permanent.

2. NO exogène et colite induite par le TNBS

Comme nous l'avons déjà précisé, le premier volet de ce travail visait à étudier le rôle du NO exogène dans les processus d'inflammation colique. Pour ce faire nous avons utilisé, dans un premier temps, le nitroprussiate de sodium (SNP) utilisé en tant que donneur de NO pour ses propriétés vasodilatatrices artérielles en thérapeutique humaine, et en expérimentation animale *in vivo* (Mariotto *et al.*, 1995 ; Larauche *et al.*, 2003). Dans un second temps, nous avons utilisé une bactérie, *Lactobacillus farciminis*, connue pour produire du NO *in vitro*.

L'apport exogène de NO, par une perfusion intra-colique continue de SNP pendant les 4 jours après l'induction de la colite par le TNBS, réduit la sévérité de cette colite. La voie intra-colique d'administration du SNP a été choisie dans notre étude en accord avec d'autres travaux montrant des effets protecteurs du NO délivré localement aussi bien au niveau gastrique que

colique. En effet au niveau gastrique, l'application locale des donneurs de NO contribue à une résolution efficace des lésions provoquées par différents agents agresseurs (MacNaughton *et al.*, 1989 ; Kitagawa *et al.*, 1990 ; Larauche *et al.*, 2003). Au niveau colique, un effet protecteur du NO a également été montré après administration intra-colique de NO-mésalamine vis-à-vis d'une colite induite par le TNBS (Wallace *et al.*, 1999). De plus, cet effet était plus prononcé que celui obtenu après administration de mésalamine seule. En revanche, dans la même étude l'administration du SNP n'a pas conduit à des résultats concluants. L'inefficacité du SNP obtenue dans ce cas pourrait s'expliquer par (i) la voie d'administration utilisée (*bolus* par voie orale), (ii) la dose élevée de SNP choisie (100 mg/kg) qui s'est avérée toxique.

C'est pourquoi, outre la voie locale d'administration, nous avons également tenu compte du paramètre dose à administrer. Ainsi dans notre étude, le SNP a été utilisé à la dose de 1mg/kg/j qui représente une dose 100 fois inférieure à celle utilisée par Wallace *et al.* (1999) et 2 fois plus faible que celle utilisée pour la résolution d'une gastrite induite par l'iodoacétamide (Larauche *et al.*, 2003). L'administration du SNP directement dans la lumière colique à la dose de 1mg/kg/j s'est avérée efficace dans la réduction de la colite induite par le TNBS. De plus dans ces conditions, la teneur en NO mesurée dans le contenu colique a été multipliée par 2,5. Ces résultats confortent donc l'idée que le choix aussi bien de la voie d'administration du NO exogène que celui de la dose administrée est important en fonction de l'inflammation digestive considérée.

La transformation du SNP en NO dans les systèmes biologiques est une réaction connue (Feelish, 1998). Toutefois, afin d'apporter la preuve pharmacologique que les effets anti-inflammatoires du SNP que nous avons observé impliquaient bien le NO libéré par ce dernier, nous avons choisi d'utiliser l'hémoglobine pour son aptitude à piéger le NO (Doyle & Hoekstra, 1981 ; Feelish, 1998). Ainsi, l'hémoglobine a été perfusée en continu dans la lumière colique de manière concomitante au SNP. Les résultats obtenus lors du dosage du NO par résonance électroparamagnétique a montré que la dose d'hémoglobine utilisée piégeait la totalité du NO libéré par le SNP.

La réversion par l'hémoglobine de l'effet protecteur du SNP vis-à-vis de la colite induite par le TNBS, montre que du NO apporté seul dans la lumière colique est efficace dans la résolution de la sévérité d'une colite au TNBS. Par ailleurs l'apport de NO, non plus par l'intermédiaire d'un donneur chimique, mais en tant que métabolite bactérien s'est également révélé efficace dans la réduction de cette colite. Le traitement oral par *L. farciminis* s'est également traduit par une augmentation de la teneur en NO dans le contenu colique. De plus, l'effet anti-inflammatoire de ce traitement a été reversé par la perfusion continue d'hémoglobine pendant 4 jours.

Ces résultats mettent en évidence (i) la capacité de *L. farciminis* à produire du NO dans la lumière colique, ce qui jusqu'à présent n'avait été montré qu'*in vitro*, (ii) un mécanisme d'action de cette bactérie dans la réduction d'une inflammation colique à travers l'un de ses métabolites bactériens, ce qui jusqu'à présent n'avait pas encore été montré.

Le NO apporté lors de la perfusion de SNP ou du traitement oral par *L. farciminis* réduit la sévérité de la colite induite par le TNBS. Cet effet du NO exogène se traduit par une réduction des paramètres ou indices inflammatoires évalués au terme des 4 jours de cette colite (scores des lésionnels macroscopiques, activité de la myéloperoxydase (MPO) et activité de la NO synthase inductible (iNOS)).

Ainsi, la question des voies par lesquelles le NO exogène pourrait agir se pose. Nous n'avons pas entrepris d'études spécifiques afin de répondre à cette question. Toutefois trois hypothèses d'action peuvent être émises et concerneraient (i) l'adhésion des leucocytes, (ii) la régulation de l'expression de la iNOS et (iii) la formation de peroxy-nitrite.

Les donneurs de NO réduisent en effet l'adhésion (Kubes *et al.*, 1991) et l'agrégation des leucocytes au niveau des veinules post-capillaires mésentériques (Gaboury *et al.*, 1993 ; Wallace *et al.*, 1999), à travers notamment la réduction de l'expression des molécules d'adhésion (Khan *et al.*, 1996). Par conséquent, nous pouvons suggérer que la diminution de l'infiltration neutrophilaire reflétée par la diminution de l'activité MPO, soit

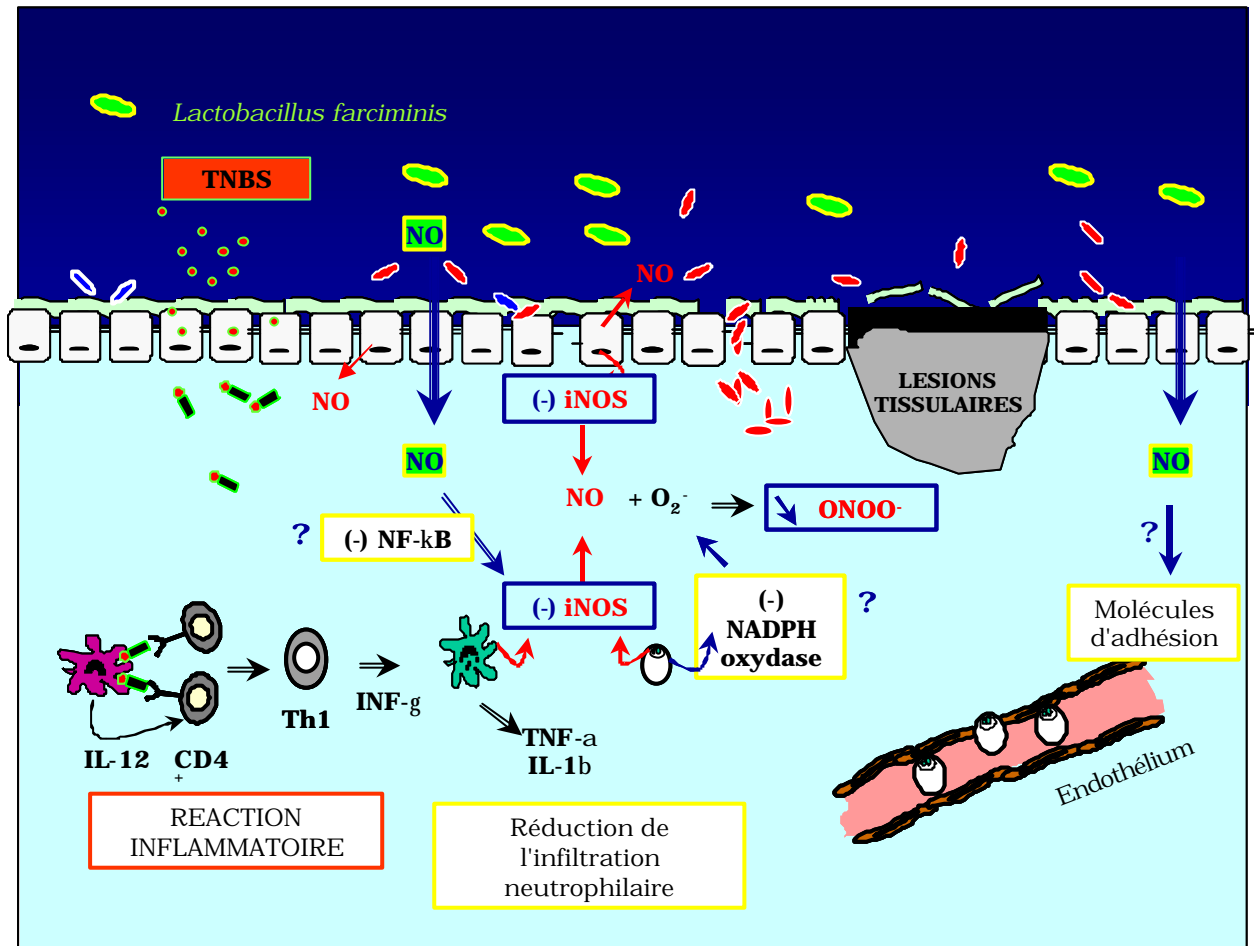


Figure 22 : Hypothèses d'action du NO exogène dans la réduction de la sévérité de la colite induite par le TNBS

le résultat d'une inhibition de l'expression des molécules d'adhésion vasculaires.

Les donneurs de NO sont également des inhibiteurs des fonctions neutrophilaires (Moilanen *et al.*, 1993). Par exemple, le SNP inhibe l'expression de la iNOS dans ces cellules (Mariotto *et al.*, 1995), en exerçant un rétrocontrôle négatif direct sur l'expression de cette enzyme (Ravichandran *et al.*, 1995). Dans notre étude, l'importante augmentation de l'activité iNOS tissulaire observée après l'induction de la colite par le TNBS, est significativement réduite lors de l'apport de NO dans la lumière colique. Par conséquent, nous pouvons envisager que le NO exogène par un mécanisme de rétrocontrôle, maintient l'inhibition de l'activation du NF- κ B et de ce fait empêche l'induction de l'expression de la iNOS dans les cellules épithéliales et immunitaires.

L'implication du peroxy-nitrite dans les lésions tissulaires a été largement décrite notamment dans la colite induite par le TNBS (Zingarelli *et al.*, 1998 ; McCafferty *et al.*, 1999 ; Miampamba & Sharkey, 1999). La formation de ce dernier est contrôlée par les flux relatifs de NO et d'O₂⁻, et il n'est généré que lorsque ces deux radicaux sont produits en quantité égale (Miles *et al.*, 1996 ; Wink *et al.*, 1997). Par conséquent, nous pouvons supposer que l'atténuation des lésions macroscopiques que nous avons observée, serait le résultat de l'apport de NO exogène induisant un déséquilibre dans les concentrations relatives de ces deux radicaux en faveur d'une augmentation de celle du NO se traduisant *in fine* par une diminution de la formation de peroxy-nitrite. Par ailleurs, les donneurs de NO ont également la capacité de réduire la production du radical O₂⁻ en inhibant l'auto-assemblage de la NADPH oxydase (Fujii *et al.*, 1997 ; Bloodsworth *et al.*, 2000). Cette voie d'action pourrait également être envisagée dans notre étude.

Ce travail a donc contribué par le biais d'une approche basée sur l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires d'un métabolite bactérien, à sélectionner une souche bactérienne aux potentialités thérapeutiques intéressantes en l'occurrence dans le traitement de l'inflammatoire digestive. L'ensemble des

résultats de la première partie de notre étude nous a en effet permis de mettre en évidence un mécanisme d'action dépendant d'un métabolite bactérien (NO) dans l'effet anti-inflammatoire exercé par *L. farciminis* administré par voie orale. Les voies d'action du NO impliquées dans cet effet demanderaient cependant de plus amples investigations afin de mieux comprendre et de déterminer les éléments cellulaires et intracellulaires intervenant dans les interactions hôte-NO libéré par *L. farciminis*. Toutefois, cette bactérie répond d'ores et déjà à la définition d'un probiotique à savoir "un micro-organisme dont l'ingestion exerce des effets positifs sur la prévention ou le traitement d'une pathologie spécifique". Aussi, une évaluation plus approfondie des propriétés anti-inflammatoires de *L. farciminis* a été conduite afin de valider dans la deuxième partie de notre travail le statut de probiotique de cette souche.

3. Réponses coliques au traitement par *Lactobacillus farciminis* dans la colite induite par le TNBS

Nous avons recherché si les effets protecteurs d'un traitement par *L. farciminis* vis-à-vis de la colite induite par le TNBS faisaient partie de ceux partagés par la plupart des probiotiques, à savoir la normalisation de la flore endogène, le renforcement de la barrière intestinale et la modulation du profil des cytokines.

Nos résultats montrent qu'un traitement par ce lactobacille se traduit en conditions inflammatoires par un rétablissement de l'équilibre de la microflore, une réduction de la translocation bactérienne, une diminution de la perméabilité paracellulaire colique, une diminution de la production de l'IL-1 β et une augmentation de l'IL-10.

Nous avons également noté que ce traitement avait aussi un effet sur ces paramètres en conditions basales. En effet, nous avons observé que l'administration journalière de *L. farciminis* s'est traduite par une augmentation de la population des lactobacilles au niveau du contenu

colique, une diminution de la perméabilité paracellulaire colique et une augmentation de l'expression tissulaire de l'IL-10. Par conséquent, on pourrait envisager que l'effet anti-inflammatoire de *L. farciminis* résulte d'un renforcement préalable des défenses des barrières microbiologique, muqueuse et immunitaire de l'hôte, qui serait alors plus résistant à d'éventuelles agressions telles que celles occasionnées par l'instillation du TNBS.

En conditions inflammatoires, la "normalisation" des populations bactériennes s'est traduite par une diminution du nombre de bactéries Gram négative aérobies et anaérobies au 4^{ème} jour de la colite induite par le TNBS. Nous avons également noté dans ces conditions une réduction importante de la translocation bactérienne. Ces paramètres ne sont pas systématiquement évalués dans les études relatives à l'influence des probiotiques dans le traitement ou la prévention de colite expérimentale. Cette évaluation nous est apparue nécessaire dans la mesure où l'inflammation transmurale caractérisant la colite induite par le TNBS est le résultat de l'invasion bactérienne de la muqueuse qui survient dans les 24 heures qui suivent le challenge inflammatoire (Garcia-Lafuente *et al.*, 1997). Toutefois, nous n'avons pas entrepris d'étude cinétique qui aurait pu nous renseigner à la fois sur le degré de l'invasion bactérienne de la muqueuse initiant la cascade inflammatoire, et à partir de quel moment *L. farciminis* limite l'invasion et la pullulation des bactéries entéroinvasives et/ou entéropathogènes. Nous pouvons toutefois supposer que l'effet protecteur exercé par ce lactobacille pourrait résulter (i) d'une inhibition de la croissance des bactéries entériques potentiellement pathogènes par compétition du substrat nitrite ou à travers le NO qu'il libère, connu pour ses propriétés microbicides, (ii) d'une inhibition de l'invasion bactérienne à travers la production de mucines extracellulaires comme c'est le cas pour d'autres probiotiques (Mack *et al.*, 1999 ; Mack *et al.*, 2003) et pouvant également impliquer le NO libéré (Brown *et al.*, 1992).

Le renforcement de la barrière colique s'est traduit en conditions inflammatoires par une diminution de l'augmentation de la perméabilité

paracellulaire colique induite par l'instillation de TNBS chez les animaux traités par *L. farciminis*. Nous avons également montré que cet effet est partiellement reversé par la perfusion d'hémoglobine, mettant en évidence l'implication du NO libéré par cette souche dans la diminution de la perméabilité colique. La rupture de l'intégrité de la barrière colique, initialement induite par l'instillation du TNBS, est largement entretenue par l'invasion bactérienne (Gardiner *et al.*, 1993 ; Garcia-Lafuente *et al.*, 1997). Par conséquent, il aurait été intéressant de mener des études *in vitro* afin de nous renseigner si ce traitement (i) prévient la diminution de la résistance transépithéliale occasionnée par les bactéries entéropathogènes et/ou entéroinvasives, (ii) prévient les modifications des protéines de jonction et du cytosquelette induites par ces dernières, par exemple en évitant la déphosphorylation et la redistribution de l'actine, de l'occludine et de la ZO-1 tel que c'est le cas pour d'autres probiotiques (Resta-Lenert & Barret, 2003 ; Trivedi *et al.*, 2003).

Le renforcement de la barrière immunitaire par le traitement de *L. farciminis* dans la colite induite par le TNBS a été mis en évidence à travers la diminution de la sécrétion de l'IL-1 β et l'augmentation de la sécrétion de l'IL-10 au niveau tissulaire. Cet effet immunomodulateur est une propriété partagée par de nombreux probiotiques (Madsen *et al.*, 2001 ; Schultz *et al.*, 2002 ; Konrad *et al.*, 2003 ; MacCarthy *et al.*, 2003). Compte tenu des propriétés anti-inflammatoires de l'IL-10, nous pouvons supposer que cette cytokine joue un rôle dans l'effet protecteur observé lors du traitement par *L. farciminis*. En effet, une administration par voie sous-cutanée d'IL-10 pendant les 5 jours qui suivent l'induction d'une colite au TNBS se traduit par une réduction de cette colite (Ribbons *et al.*, 1997). Toutefois, nous ne savons pas si la sécrétion de l'IL-10 que nous avons également observé en conditions basales provient de la stimulation par *L. farciminis* des cellules épithéliales ou des cellules immunitaires. En se basant sur d'autres études, nous pouvons envisager qu'elle pourrait être issue de la stimulation des cellules dendritiques à l'instar d'autres probiotiques (Christensen *et al.*, 2002; Rigby *et al.*, 2002 ; Drakes *et al.*, 2004). Ainsi, l'implication des cellules

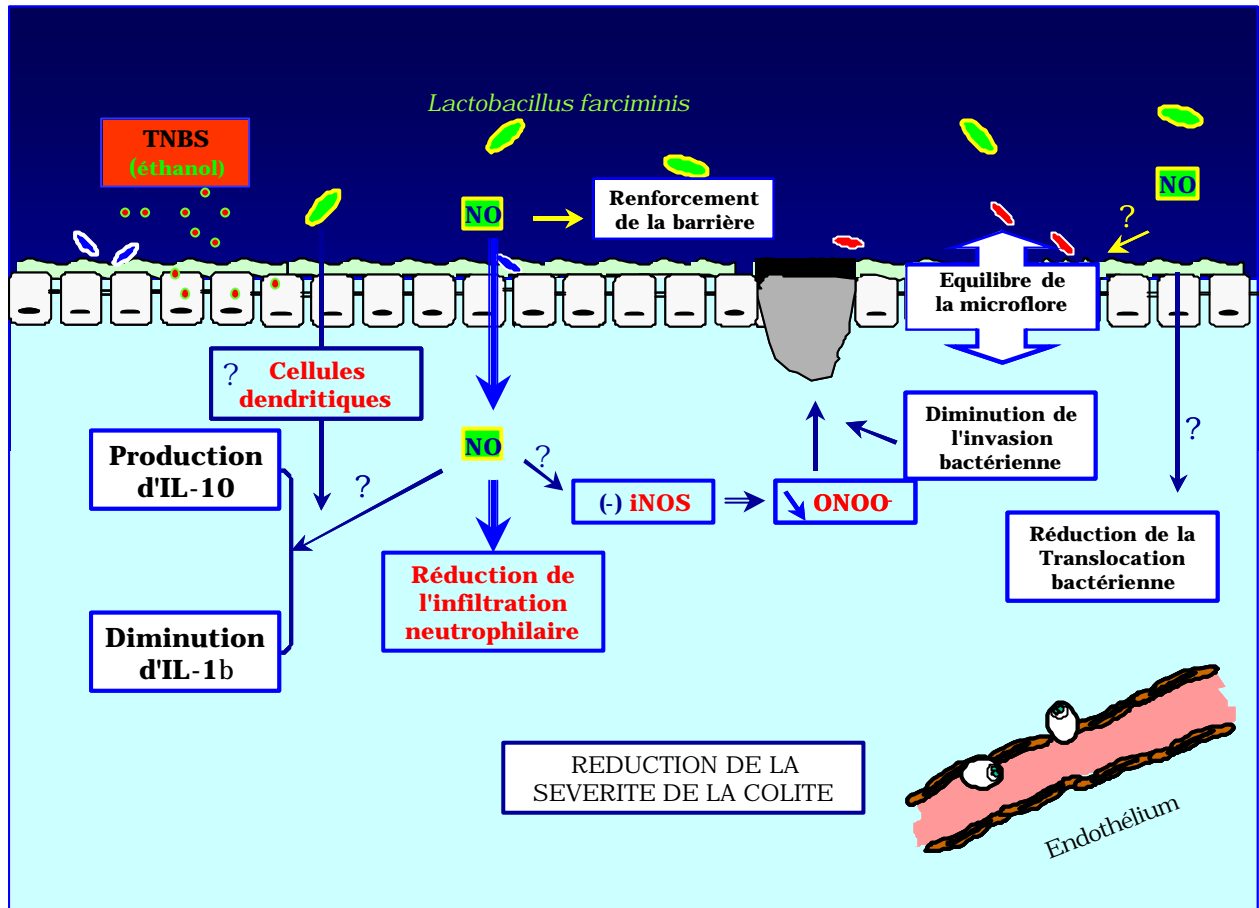


Figure 23 : Synthèse des hypothèses d'action de *Lactobacillus farciminis* dans la réduction de la sévérité de la colite induite par le TNBS

dendritiques dans l'effet immunomodulateur de *L. farciminis* pourrait être envisagée au sens où en favorisant la production de l'IL-10 par ces cellules, *L. farciminis* pourrait favoriser l'induction des cellules T régulatrices (Steinbrink *et al.*, 1997 ; Steinbrink *et al.*, 2002 ; Muller *et al.*, 2002). Nous pouvons également envisager que *L. farciminis* pourrait limiter la cascade inflammatoire en diminuant l'expression des récepteurs CD14 et TLR4 à la surface des cellules dendritiques, mais aussi de celle des neutrophiles, des macrophages et des cellules épithéliales. En effet, une augmentation de l'expression du TLR4 sur les cellules épithéliales a été observé au cours des MICI (Cario & Podosky, 2000) et dans le modèle de colite induite par le DSS chez la souris (Ortega-Cava *et al.*, 2003). De plus, le TLR4 est impliqué dans l'induction du stress oxydatif dans les neutrophiles en réponse au LPS (Remer *et al.*, 2003). L'effet immunomodulateur du traitement par *Lactobacillus farciminis* pourrait alors être le résultat d'une action directe de ce lactobacille sur les cellules épithéliales et immunitaires ou pourrait s'effectuer *via* le NO qu'il libère. En effet, les donneurs de NO peuvent inhiber l'expression de l'IL-12 et l'activation du NF- κ B dans les cellules dendritiques et les macrophages à travers la désactivation de la voie de signalisation des TLRs (Xiong *et al.*, 2004). Des études complémentaires mériteraient toutefois d'être entreprise afin (i) d'évaluer l'implication du NO libéré par cette souche dans les effets sur la modulation du profil des cytokines, (ii) de caractériser ces effets de manière plus approfondie au moyen d'études *in vitro*.

L'ensemble des résultats de la deuxième partie de notre étude nous a permis de montrer que *Lactobacillus farciminis* partage les mécanismes anti-inflammatoires généralement attribués aux probiotiques. Ce constat renforce son statut d'agent probiotique et ses potentialités thérapeutiques dans les pathologies inflammatoires digestives. Ces dernières étant généralement associées à des modifications de la sensibilité viscérale, nous nous sommes donc demandés si le traitement par cette souche bactérienne pouvait également atténuer la douleur à une distension colo-rectale dans la colite induite par le TNBS.

4. Influence d'un traitement oral par *Lactobacillus farciminis* sur l'hypersensibilité colo-rectale à la distension induite par une colite au TNBS

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons évalué les propriétés anti-nociceptives de *L. farciminis* sur l'hypersensibilité viscérale d'origine inflammatoire, associée à la colite au TNBS, en réponse à une distension colo-rectale.

La réponse abdominale à une distension colo-rectale étant directement liée à la perception de la douleur, les contractions abdominales sont de ce fait utilisées en tant que critère de douleur en réponse à un stimulus nociceptif (Ness *et al.*, 1991).

En conditions physiologiques et en conditions inflammatoires le traitement oral par *L. farciminis* s'est traduit par une diminution du nombre de contractions abdominales en réponse à toutes les pressions de distension appliquées montrant un effet analgésique de cette souche sur la sensibilité viscérale basale et l'hypersensibilité viscérale d'origine inflammatoire. Ce traitement agit en effet à la fois sur le seuil de sensibilité à une distension qui est augmenté et sur l'intensité de la réponse nociceptive qui est diminuée.

Quatre jours après l'induction de la colite, une augmentation de la douleur abdominale en réponse à toutes les pressions de distension a en effet été observée chez les animaux traités par le TNBS. Par ailleurs, cette hypersensibilité viscérale induite par le TNBS n'est pas associée avec un changement du tonus de la paroi colique. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature concernant l'abaissement du seuil de douleur sans modification du tonus pariétal dans une colite induite par le TNBS (Morteau *et al.*, 1994). Cependant dans cette étude, l'instillation du TNBS par voie intra-rectale a induit une allodynie rectale, reflétée par l'absence de modification de la réponse nociceptive aux plus forts volume de distension, et non une hypersensibilité colo-rectale comme nous avons pu l'observer dans notre étude où le TNBS a été administré voie intra-colique.

Dans des conditions inflammatoires, les terminaisons nerveuses peuvent être lésées aussi bien dans le cas d'une colite expérimentale induite par le TNBS chez le rat (Jacobson *et al.*, 1995), que chez des patients atteints de la maladie de Crohn (Dvorak *et al.*, 1979). L'inflammation est en effet responsable de modifications des fonctions nerveuses, incluant des altérations des plexus myentériques ainsi qu'une hypertrophie et une hyperplasie des fibres sensibles (Geboes et Collins, 1998). De plus, ces modifications ne sont pas restreintes au site inflammatoire et ont également été observées dans les zones non-enflammées chez des patients souffrant de maladie de Crohn (Dvorak *et al.*, 1979) suggérant une altération des réflexes viscéro-viscéraux. Cependant, l'implication de l'altération de l'innervation nitreurgique dans le contrôle de la fonction sensitive digestive n'est pas encore élucidée. A l'heure actuelle, très peu de données relatives à l'évaluation de l'effet du NO sur la douleur viscérale en général et sur l'hyperalgésie viscérale d'origine inflammatoire en particulier n'est disponible dans la littérature. Toutefois, il a été montré qu'en conditions basales un traitement par le SNP réduit la réponse nociceptive à la distension gastrique chez le rat, évaluée par la réponse cardio-vasculaire (Rouzade *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'implication du NO dans l'hyperalgésie somatique d'origine inflammatoire a fait l'objet de nombreux travaux lui attribuant pour la plupart un effet anti-nociceptif (Ferreira *et al.*, 1991 ; Fidecka & Lalewick, 1997).

Dans notre étude nous avons montré que l'effet anti-nociceptif exercé par le traitement oral par *L. farciminis*, tant en conditions basales qu'en conditions inflammatoires, était NO-dépendant. L'atténuation de la douleur induite par une distension colo-rectale est en effet reversée par la perfusion en continu d'hémoglobine. De même, dans la première partie de ce travail nous avons mis en évidence que l'effet du traitement par *L. farciminis* sur la diminution de la perméabilité colique était NO-dépendante. Récemment des travaux de notre laboratoire ont montré une relation de cause à effet entre l'augmentation de la perméabilité intestinale et l'augmentation de la réponse abdominale induites par un stress aigu chez le rat (Ait Belgnaoui *et al.*, 2003). Par conséquent, nous pouvons supposer que l'effet analgésique que

nous observons peut résulter en partie de l'effet du traitement par *L. farciminis* sur la barrière intestinale à travers notamment le NO libéré par cette souche. Toutefois, la diminution de l'intensité de la réponse nociceptive ainsi que la diminution de la perméabilité colique que nous observons en conditions basales pourraient être liées à la dose de *L. farciminis* administrée qui s'avère plus importante que celle classiquement utilisée.

L'effet analgésique observé dans ce modèle pourrait s'expliquer en grande partie par l'effet anti-inflammatoire du traitement par *L. farciminis*. Il est en effet maintenant clairement établi qu'après un endommagement local des tissus, tel que l'on peut l'observer après un challenge par le TNBS, la libération de médiateurs inflammatoires déclenche la libération de médiateurs algogènes au niveau des nerfs afférents et des cellules immunitaires se traduisant *in fine* par une sensibilisation des terminaisons des fibres afférentes nerveuses (Tracey & Walker, 1995), et dont résulte l'augmentation de la réponse aux stimuli douloureux (Bueno et Fioramonti, 1999). Les données chez l'animal montrent qu'en conditions inflammatoires les mécanorécepteurs de bas et haut seuils de la paroi intestinale sont activés par des faibles pressions intra-luminales qui n'entraînent pas de perception de douleur en conditions basales (pour revue voir Bueno *et al.*, 2000). Par conséquent, les changements de la sensibilité viscérale observés dans le modèle de colite induite par le TNBS peuvent être dus à l'activation des nocicepteurs par des médiateurs pro-inflammatoires et/ou pro-nociceptifs (Reeh, 1994). Le TNBS stimule en effet l'expression de nombreuses cytokines et particulièrement l'IL-1 β qui peut agir directement sur les récepteurs présents sur les neurones ou indirectement en stimulant la libération de substances pro-nociceptives (Safieh-Garabedian *et al.*, 1995). Il a été montré que l'IL-1 β sensibilise les nocicepteurs des afférences primaires et augmente l'excitabilité des afférences sensorielles (Dray, 1995).

Dans notre étude, nous pouvons suggérer que l'effet anti-nociceptif du traitement par *Lactobacillus farciminis* peut être en relation avec la diminution du niveau tissulaire de l'IL-1 β .

Par ailleurs, l'IL-10 peut également jouer un rôle dans la régulation des messages nociceptifs périphériques. Une diminution de l'IL-10 a été observée dans notre étude chez les animaux ayant reçu le TNBS. La diminution de cette cytokine anti-inflammatoire a également été décrite chez des patients souffrant de troubles fonctionnels intestinaux (TFI) (Gonsalkorale *et al.*, 2003), caractérisés par une douleur viscérale associée à une hypersensibilité de la paroi digestive à la distension (Whitehead *et al.*, 1997). A l'inverse, les prostatites chroniques et le syndrome de douleurs pelviennes chroniques chez l'homme sont directement corrélés avec une augmentation de l'IL-10 dans le plasma séminal chez ces sujets (Miller *et al.*, 2002). De même, chez la souris l'utilisation de modèles de douleur somatique montre que les souris sauvages sont plus sensibles à un stimulus thermique que les souris IL-10 déficientes (Tu *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que l'IL-10 endogène contribue à augmenter la nociception. A l'inverse, un effet anti-nociceptif de l'IL-10 apporté de manière exogène a été rapporté dans des modèles de douleur somatique tels que l'hyperalgésie induite par une endotoxine (Kanaan *et al.*, 1998) et l'allodynie induite par la dynorphine (Laughlin *et al.*, 2000). De même, un pré-traitement par l'IL-10 prévient de manière dose-dépendante l'hyperalgésie somatique induite par les UVB (Saadé *et al.*, 2000). Dans ces études, l'effet anti-nociceptif de l'IL-10 est directement corrélé avec une diminution du niveau de l'IL-1 β . Ces résultats montrent des différences entre l'IL-10 endogène et l'IL-10 exogène dans l'implication de cette cytokine dans la perception de la douleur somatique et indiquent que les mécanismes directs ou indirects de l'IL-10 dans la nociception sont complexes. Aussi, la détermination du rôle de l'IL-10 endogène et exogène dans la douleur viscérale demanderait de plus amples investigations. L'augmentation du niveau tissulaire de IL-10 que nous avons observé en conditions basales pourrait expliquer l'atténuation de la douleur induite par une distension colorectale que nous avons observé après traitement par *Lactobacillus farciminis*. De plus la restauration des niveaux proches des conditions basales de l'IL-10 tissulaire ainsi que la diminution de l'expression de l'IL-1 β tissulaire que nous avons observé en conditions inflammatoires sont également des arguments plaidant en faveur de l'implication éventuelle de l'IL-10 dans la

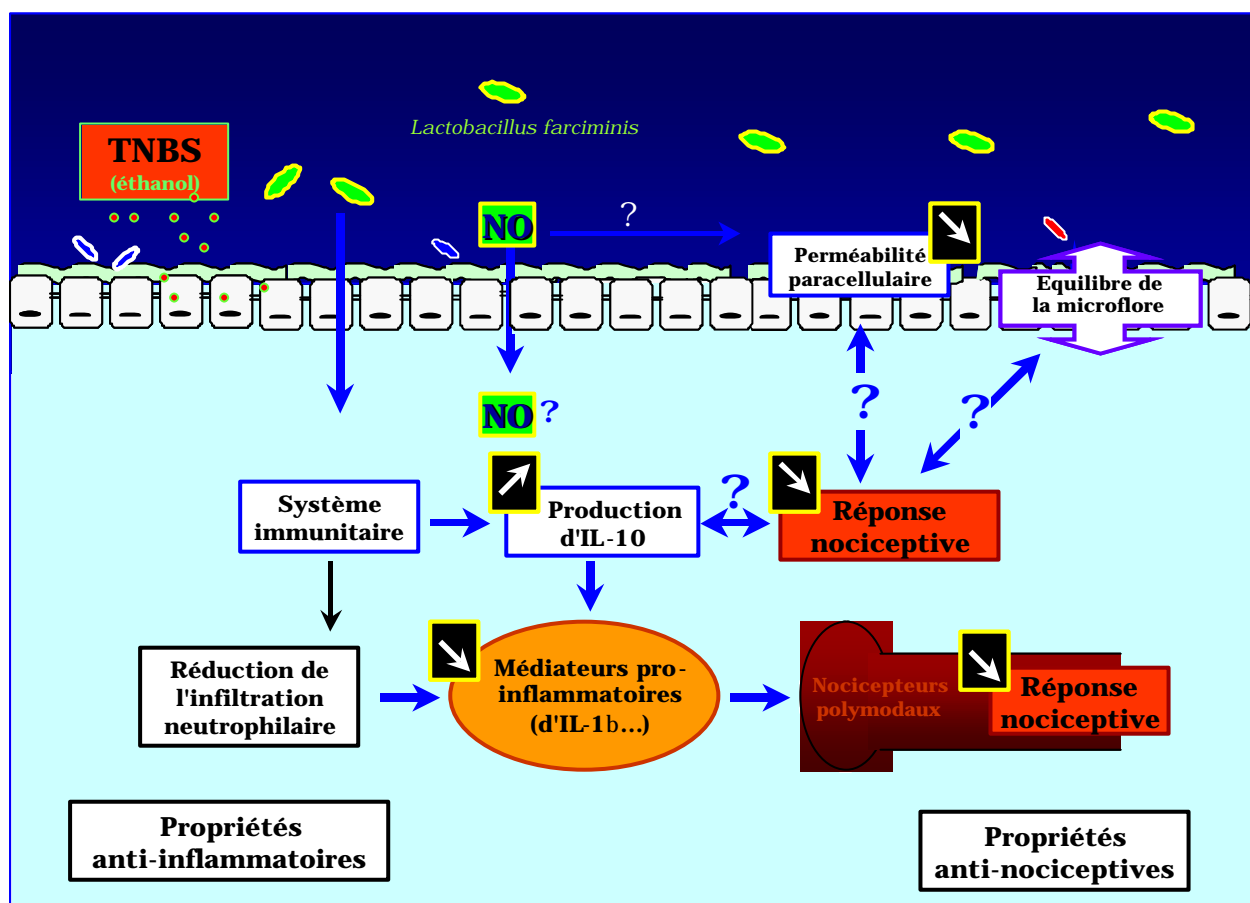


Figure 24 : Hypothèses d'action de *Lactobacillus farciminis* dans la modulation de l'hypersensibilité colo-rectale à la distension induite par le TNBS.

réduction de l'hypersensibilité colo-rectale induite par la colite au TNBS en réponse à une distension.

Enfin, la colite induite par le TNBS est associée à des modifications de la microflore se traduisant par une augmentation des espèces aéro-anaérobie Gram négatif et plus particulièrement des entérobactéries. Par ailleurs, il a été montré qu'une administration sous-cutanée de LPS induit un abaissement du seuil de sensibilité à la distension colo-rectale (Coelho *et al.*, 2000). Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'hypersensibilité viscérale induite par une distension colo-rectale que nous avons observée dans la colite au TNBS peut être liée aux modifications de la microflore et donc à l'augmentation de la concentration en LPS luminal. Par conséquent, l'effet analgésique exercé par le traitement par *L. farciminis* peut également résulter de la diminution des populations bactériennes Gram négatif de la microflore par cette souche *via* son action anti-bactérienne pouvant impliquer les propriétés microbicides du NO libéré par cette souche.

L'ensemble des résultats de la troisième partie de ce travail montre qu'un traitement par *L. farciminis* diminue l'hypersensibilité colo-rectale à une distension induite par la colite au TNBS. Toutefois, un rôle anti-nociceptif *sensu stricto* de ce traitement ne peut être mis en évidence à cause de l'effet anti-inflammatoire exercé par cette souche. L'atténuation de la douleur à une distension observée en conditions basales ouvre cependant des perspectives afin d'évaluer cette propriété sur d'autres modèles de douleur viscérale d'origine non-inflammatoire.

5. Conclusion et perspectives

L'ensemble de ce travail montre que chez le rat le traitement par *Lactobacillus farciminis* diminue la sévérité d'une colite induite par le TNBS et atténue la douleur à une distension colo-rectale qui lui est associée. De plus, il met en

évidence un mécanisme d'action impliquant le NO libéré dans la lumière colique par cette souche.

Lactobacillus farciminis possèdent des potentialités thérapeutiques pouvant s'inscrire dans le traitement de certaines pathologies digestives impliquant un dysfonctionnement des réponses immunes où les bactéries de la flore intestinale interviennent tel que c'est le cas dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Lactobacillus farciminis pourrait également s'avérer prometteur dans le traitement de pathologies digestives à caractères "non-inflammatoire" ou "micro-inflammatoire" tels que les troubles fonctionnels intestinaux (TFI) dont les causes restent mal connues et les traitements décevants. L'extension du potentiel thérapeutique d'un traitement par *Lactobacillus farciminis* vers les TFI qui ne sont pas des pathologies graves mais des pathologies à forte prévalence, est motivée par trois raisons majeures :

(i) l'hypersensibilité viscérale est le dénominateur commun de ces troubles,

(ii) bien que le rôle de la microflore ou de ses métabolites et leurs relations avec les anomalies sensibles aient été très peu étudiés, l'existence d'une relation entre infection intestinale et TFI a été confirmée par plusieurs études. Aussi, *Lactobacillus farciminis* en palliant notamment aux déficiences d'une flore résidente mal équilibrée, pourrait prévenir l'apparition des TFI et la douleur viscérale associée,

(iii) compte tenu de la relation de causalité entre l'augmentation de la perméabilité intestinale et l'augmentation de la douleur viscérale récemment observée dans un modèle de stress aigu chez le rat et du fait de l'augmentation de la perméabilité intestinale observée chez des patients atteints de TFI d'origine post-infectieuse (Spiller *et al.*, 2000). Ainsi, *Lactobacillus farciminis* en renforçant la barrière intestinale pourrait prévenir l'apparition de douleur viscérale chez ces sujets.

Partie 4

*Références
Bibliographiques*

- A.F.S.S.A.** 2003. Rapport du groupe de travail : "Alimentation infantile et modification de la flore intestinale".
- Abu-Soud, H.M., Wang, J., Rousseau, D.L., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., and Stuehr, D.J.** 1995. Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. *J Biol Chem* 270:22997-23006.
- Adak, S., Crooks, C., Wang, Q., Crane, B.R., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., and Stuehr, D.J.** 1999. Tryptophan 409 controls the activity of neuronal nitric-oxide synthase by regulating nitric oxide feedback inhibition. *J Biol Chem* 274:26907-26911.
- Aderem, A., and Ulevitch, R.J.** 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782-787.
- Ahluwalia, A., and Perretti, M.** 1999. B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B the 1? *Trends Pharmacol Sci* 20:100-104.
- Ait Belgnaoui, A., Bradesi, S., Theodorou, V., Fioramonri, J., Bueno, L.** 2003. Acute stress-induced hypersensitivity is linked to an increase of colonic paracellular permeability: role of MLCK. *International Symposium of Gastroenterology and Motility, Barcelone.*
- Albanese, C.T., Smith, S.D., Watkins, S., Kurkchubasche, A., Simmons, R.L., and Rowe, M.I.** 1994. Effect of secretory IgA on transepithelial passage of bacteria across the intact ileum in vitro. *J Am Coll Surg* 179:679-688.
- Alexander, J.W., Gianotti, L., Pyles, T., Carey, M.A., and Babcock, G.F.** 1991. Distribution and survival of *Escherichia coli* translocating from the intestine after thermal injury. *Ann Surg* 213:558-566; discussion 566-557.
- Alican, I., and Kubes, P.** 1996. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol* 270:G225-237.
- Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., and Zychlinsky, A.** 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736-739.
- Allen, R.C.** 1979. Reduced, radical, and excited state oxygen in leukocyte microbicidal activity. *Front Biol* 48:197-233.
- al-Swayeh, O.A., Futter, L.E., Clifford, R.H., and Moore, P.K.** 2000. Nitroparacetamol exhibits anti-inflammatory and anti-nociceptive activity. *Br J Pharmacol* 130:1453-1456.
- Alverdy, J.C., and Aoys, E.** 1992. The effect of dexamethasone and endotoxin administration on biliary IgA and bacterial adherence. *J Surg Res* 53:450-454.
- Ambrose, N.S., Johnson, M., Burdon, D.W., and Keighley, M.R.** 1984. Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery. *Br J Surg* 71:623-625.

- Andoh, A., Fujiyama, Y., Bamba, T., and Hosoda, S.** 1993. Differential cytokine regulation of complement C3, C4, and factor B synthesis in human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *J Immunol* 151:4239-4247.
- Andrews, P.J., and Borody, T.J.** 1993. "Putting back the bugs": bacterial treatment relieves chronic constipation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Med J Aust* 159:633-634.
- Angel, J., Berenbaum, F., Le Denmat, C., Nevalainen, T., Masliah, J., and Fournier, C.** 1994. Interleukin-1-induced prostaglandin E2 biosynthesis in human synovial cells involves the activation of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2. *Eur J Biochem* 226:125-131.
- Anton, P.A., Targan, S.R., and Shanahan, F.** 1989. Increased neutrophil receptors for and response to the proinflammatory bacterial peptide formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in Crohn's disease. *Gastroenterology* 97:20-28.
- Apperloo-Renkema, H.Z., Jagt, T.G., Tonk, R.H., and van der Waaij, D.** 1993. Healthy individuals possess circulating antibodies against their indigenous faecal microflora as well as against allogeneous faecal microflora: an immunomorphometrical study. *Epidemiol Infect* 111:273-285.
- Araki, Y., Andoh, A., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., and Bamba, T.** 2001. Alterations in intestinal microflora, faecal bile acids and short chain fatty acids in dextran sulphate sodium-induced experimental acute colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:107-112.
- Armstrong, A.M., Campbell, G.R., Gannon, C., Kirk, S.J., and Gardiner, K.R.** 2000. Oral administration of inducible nitric oxide synthase inhibitors reduces nitric oxide synthesis but has no effect on the severity of experimental colitis. *Scand J Gastroenterol* 35:832-838.
- Atkinson, T.P., and Kaliner, M.A.** 1992. Anaphylaxis. *Med Clin North Am* 76:841-855.
- Avice, J.C., Ourry, A., Laine, P., Roland, N., Louahlia, S., Roussel, E., Brookes, S., and Boucaud, J.** 1999. A rapid and reliable method for NO quantification and 15NO/14NO determination using isotope ratio mass spectrometry: an application for the detection of NO synthesis in propionibacteria. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13:1197-1200.
- Babbedge, R.C., Hart, S.L., and Moore, P.K.** 1993. Anti-nociceptive activity of nitric oxide synthase inhibitors in the mouse: dissociation between the effect of L-NAME and L-NMMA. *J Pharm Pharmacol* 45:77-79.
- Baeuerle, P.A., and Henkel, T.** 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141-179.
- Balazs, M., Illyes, G., and Vadasz, G.** 1989. [Mast cells in ulcerative colitis]. *Morphol Igazsagugyi Orv Sz* 29:161-169.
- Banan, A., Fields, J.Z., Zhang, Y., and Keshavarzian, A.** 2001. iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1234-1246.
- Banan, A., Zhang, Y., Losurdo, J., and Keshavarzian, A.** 2000. Carbonylation and disassembly of the F-actin cytoskeleton in oxidant induced barrier dysfunction and its prevention by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in a human colonic cell line. *Gut* 46:830-837.

- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
- Banks, C., Bateman, A., Payne, R., Johnson, P., and Sheron, N.** 2003. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol* 199:28-35.
- Bauer, S., Kirschning, C.J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., and Lipford, G.B.** 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9237-9242.
- Beachey, E.H.** 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis* 143:325-345.
- Beatty, W.L., Meresse, S., Gounon, P., Davoust, J., Mounier, J., Sansonetti, P.J., and Gorvel, J.P.** 1999. Trafficking of Shigella lipopolysaccharide in polarized intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 145:689-698.
- Befus, A.D., Pearce, F.L., Gauldie, J., Horsewood, P., and Bienenstock, J.** 1982. Mucosal mast cells. I. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. *J Immunol* 128:2475-2480.
- Belai, A., Schmidt, H.H., Hoyle, C.H., Hassall, C.J., Saffrey, M.J., Moss, J., Forstermann, U., Murad, F., and Burnstock, G.** 1992. Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the myenteric plexus of the rat gut. *Neurosci Lett* 143:60-64.
- Berg, R.D.** 1995. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* 3:149-154.
- Berg, R.D.** 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4:430-435.
- Berg, R.D., and Savage, D.C.** 1975. Immune responses of specific pathogen-free and gnotobiotic mice to antigens of indigenous and nonindigenous microorganisms. *Infect Immun* 11:320-329.
- Bernet-Camard, M.F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L., and Hudault, S.** 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl Environ Microbiol* 63:2747-2753.
- Bertin, J., Nir, W.J., Fischer, C.M., Tayber, O.V., Errada, P.R., Grant, J.R., Keilty, J.J., Gosselin, M.L., Robison, K.E., Wong, G.H., et al.** 1999. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 274:12955-12958.
- Beutler, B., Hoebe, K., Du, X., and Ulevitch, R.J.** 2003. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 74:479-485.
- Bjarnason, I., MacPherson, A., and Hollander, D** 1995. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 108:1566-1581.

- Bloodsworth, A., O'Donnell, V.B., and Freeman, B.A.** 2000. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1707-1715.
- Blum, S., and Schiffrin, E.J.** 2003. Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotic bacteria? *Curr Issues Intest Microbiol* 4:53-60.
- Bocker, U., Damiao, A., Holt, L., Han, D.S., Jobin, C., Panja, A., Mayer, L., and Sartor, R.B.** 1998. Differential expression of interleukin 1 receptor antagonist isoforms in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 115:1426-1438.
- Boczowski, J., Lanone, S., Ungureanu-Longrois, D., Danialou, G., Fournier, T., and Aubier, M.** 1996. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin administration in rats: role on diaphragmatic contractile dysfunction. *J Clin Invest* 98:1550-1559.
- Bogdan, C.** 2000. The function of nitric oxide in the immune system. In *Handbook of experimental Pharmacology. Volume : Nitric Oxide* (ed. Mayer, B.) (Springer, Heidelberg) 443-492.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., and Diefenbach, A.** 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12:64-76.
- Bogdan, C., Vodovotz, Y., and Nathan, C.** 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174:1549-1555.
- Borruel, N., Casellas, F., Antolin, M., Llopis, M., Carol, M., Espiin, E., Naval, J., Guarner, F., and Malagelada, J.R.** 2003. Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa. *Am J Gastroenterol* 98:865-870.
- Bos, N.A., Bun, J.C., Popma, S.H., Cebra, E.R., Deenen, G.J., van der Cammen, M.J., Kroese, F.G., and Cebra, J.J.** 1996. Monoclonal immunoglobulin A derived from peritoneal B cells is encoded by both germ line and somatically mutated VH genes and is reactive with commensal bacteria. *Infect Immun* 64:616-623.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A.** 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 67:4499-4509.
- Boughton-Smith, N.K., Evans, S.M., Hawkey, C.J., Cole, A.T., Balsitis, M., Whittle, B.J., and Moncada, S.** 1993. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 342:338-340.
- Braat, H., de Jong, E.C., van den Brande, J.M., Kapsenberg, M.L., Peppelenbosch, M.P., van Tol, E.A., and van Deventer, S.J.** 2004. Dichotomy between *Lactobacillus rhamnosus* and *Klebsiella pneumoniae* on dendritic cell phenotype and function. *J Mol Med* 82:197-205.
- Brade, V.** 1980. [Mediators of inflammation and of antimicrobial activity secreted by macrophages (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriologie A* 247:259-275.
- Brandtzaeg, P., Halstensen, T.S., Kett, K., Krajci, P., Kvale, D., Rognum, T.O., Scott, H., and Sollid, L.M.** 1989. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 97:1562-1584.

- Bredt, D.S., and Snyder, S.H.** 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:682-685.
- Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., et al.** 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285:732-736.
- Brigidi, P., Vitali, B., Swennen, E., Bazzocchi, G., and Matteuzzi, D.** 2001. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res Microbiol* 152:735-741.
- Brown, J.F., Hanson, P.J., and Whittle, B.J.** 1992. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. *Eur J Pharmacol* 223:103-104.
- Bryk, T., and Mryglod, I.I.** 2000. Generalized hydrodynamics of binary liquids: transverse collective modes. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 62:2188-2199.
- Bueno, L., and Fioramonti, J.** 1999. Effects of inflammatory mediators on gut sensitivity. *Can J Gastroenterol* 13 Suppl A:42A-46A.
- Bueno, L., Fioramonti, J., and Garcia-Villar, R** 2000. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications. III. Visceral afferent pathways: a source of new therapeutic targets for abdominal pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G670-676.
- Bueno, L., Fioramonti, J., Delvaux, M., and Frexinos, J.** 1997. Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. *Gastroenterology* 112:1714-1743.
- Buffinton, G.D., and Doe, W.F.** 1995. Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 19:911-918.
- Buga, G.M., Griscavage, J.M., Rogers, N.E., and Ignarro, L.J.** 1993. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ Res* 73:808-812.
- Bulois, P., Lederman, E., Desreumaux, P., Cortot, A., and Colombel, J.F.** 1999. [Role of antibiotics in Crohn's disease]. *Gastroenterol Clin Biol* 23:B189-194.
- Butler, A.R., Flitney, F.W., and Williams, D.L.** 1995. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 16:18-22.
- Bylund-Fellenius, A.C., Landstrom, E., Axelsson, L. G., Midtveldt, T.** 1994. Experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in normal and germ-free mice. *Microbial ecology in health and disease* 7; 207-215
- Caradonna, L., Amati, L., Magrone, T., Pellegrino, N.M., Jirillo, E., and Caccavo, D.** 2000. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* 6:205-214.
- Cario, E., and Podolsky, D.K.** 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68:7010-7017.

- Cario, E., Brown, D., McKee, M., Lynch-Devaney, K., Gerken, G., and Podolsky, D.K.** 2002. Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol* 160:165-173.
- Casellas, F., Aguade, S., Soriano, B., Accarino, A., Molero, J., and Guarner, L.** 1986. Intestinal permeability to 99mTc-diethylenetriaminopentaacetic acid in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 81:767-770.
- Cavaillon, J.M.** 1993. [Contribution of cytokines to inflammatory mechanisms]. *Pathol Biol (Paris)* 41:799-811.
- Cebra, J.J.** 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* 69:1046S-1051S.
- Cebra, J.J., Periwal, S.B., Lee, G., Lee, F., and Shroff, K.E.** 1998. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol* 6:13-18.
- Chang, C.I., Liao, J.C., and Kuo, L.** 1998. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 274:H342-348.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., and Collins, J.K.** 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int J Food Microbiol* 35:1-27.
- Chartrain, N.A., Geller, D.A., Koty, P.P., Sitrin, N.F., Nussler, A.K., Hoffman, E.P., Billiar, T.R., Hutchinson, N.I., and Mudgett, J.S.** 1994. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 269:6765-6772.
- Chen, L.Y., and Mehta, J.L.** 1996. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 27:154-158.
- Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., and Nathan, C.** 1992. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176:599-604.
- Christensen, G., Simpson, W. and Beachey, E.** 1985. Adhesion of bacteria to animal tissues. Bacteria adhesion: mechanism and physiological significance. Eds. Savage D.C. and Fletcher M. Plenum Press, New York.; 279-306.
- Christensen, H.R., Frokiaer, H., and Pestka, J.J.** 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 168:171-178.
- Clancy, R.M., Leszczynska-Piziak, J., and Abramson, S.B.** 1992. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 90:1116-1121.
- Closs, E.I., Scheld, J.S., Sharafi, M., and Forstermann, U.** 2000. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol* 57:68-74.

- Cocconnier, M.H., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F., Hudault, S., and Servin, A.L.** 1997. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1046-1052.
- Coelho, A.M., Fioramonti, J., and Bueno, L.** 2000. Systemic lipopolysaccharide influences rectal sensitivity in rats: role of mast cells, cytokines, and vagus nerve. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G781-790.
- Colasanti, M., and Suzuki, H.** 2000. The dual personality of NO. *Trends Pharmacol Sci* 21:249-252.
- Colasanti, M., Cavalieri, E., Persichini, T., Mollace, V., Mariotto, S., Suzuki, H., and Lauro, G.M.** 1997. Bacterial lipopolysaccharide plus interferon-gamma elicit a very fast inhibition of a Ca²⁺-dependent nitric-oxide synthase activity in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 272:7582-7585.
- Colasanti, M., Persichini, T., Cavalieri, E., Fabrizi, C., Mariotto, S., Menegazzi, M., Lauro, G.M., and Suzuki, H.** 1999. Rapid inactivation of NOS-I by lipopolysaccharide plus interferon-gamma-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 274:9915-9917.
- Collins, S** 1993. Inflammation and irritable bowel syndrome. In : Basic and clinical aspect of chronic abdominal pain, E. A. Mayer and H. E. Raybould, eds., Elsevier, Amsterdam, 62-70.
- Conner, E. M., Chen, Y., and Grisham M. B.** 1995. Effect of nitric oxide synthase (NOS) inhibition on dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in rat and mice. [Abstract] *Gastroenterology*; 108:A801.
- Cooperstock, M.S. and Zedd, A.J.** 1983. Intestinal flora of infants. In *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Hentges, D.J. (ed.). New York: Academic Press, 79-100.
- Corsetti, M., Vos, R., Janssens, J., Tack, J.** 2003. Role of nitric oxide in the modulation of colonic sensitivity and motility in healthy subjects. [Abstract] *Gastroenterology*;535: A62.
- Crunkhorn, P., and Willis, A.L.** 1969. Actions and interactions of prostaglandins administered intradermally in rat and in man. *Br J Pharmacol* 36:216P.
- Cummings, J.H., and Macfarlane, G.T.** 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 70:443-459.
- Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B., and Rampal, P.** 2000. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Infect Immun* 68:5998-6004.
- Da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S., and Ulevitch, R.J.** 2001. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 276:21129-21135.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F.** 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115:1405-1413.

- Darius, H., Grodzinska, L., and Meyer, J.** 1992. The effects of the nitric oxide donors molsidomine and SIN-I on human polymorphonuclear leucocyte function in vitro and ex vivo. *Eur J Clin Pharmacol* 43:629-633.
- Dawson, T.M., Sasaki, M., Gonzalez-Zulueta, M., and Dawson, V.L.** 1998. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res* 118:3-11.
- De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.B., Thannickal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone, M.A., Jr., Shin, W.S., and Liao, J.K.** 1995. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96:60-68.
- De Groote, M.A., and Fang, F.C.** 1995. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin Infect Dis* 21 Suppl 2:S162-165.
- De Jong, E.C., Vieira, P.L., Kalinski, P., Schuitemaker, J.H., Tanaka, Y., Wierenga, E.A., Yazdanbakhsh, M., and Kapsenberg, M.L.** 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol* 168:1704-1709.
- De Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., and de Vries, J.E.** 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220.
- Deitch, E.A.** 1994. Role of bacterial translocation in necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl* 396:33-36.
- Deitch, E.A., Berg, R., and Specian, R.** 1987. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 122:185-190.
- DelaTorre, A., Schroeder, R.A., Punzalan, C., and Kuo, P.C.** 1999. Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages. *J Immunol* 162:4101-4108.
- Devillier, P., Renoux, M., Giroud, J.P., and Regoli, D.** 1985. Peptides and histamine release from rat peritoneal mast cells. *Eur J Pharmacol* 117:89-96.
- DeWitt, R.C., and Kudsk, K.A.** 1999. The gut's role in metabolism, mucosal barrier function, and gut immunology. *Infect Dis Clin North Am* 13:465-481, x.
- Diebel, L.N., Liberati, D.M., Dulchavsky, S.A., Myers, T.A., Diglio, C.A., Painter, T., and Brown, W.** 1997. An in vitro model to assess mucosal immune function and bacterial translocation. *J Surg Res* 69:178-182.
- Dieleman, L.A., Goerres, M.S., Arends, A., Sprengers, D., Torrice, C., Hoentjen, F., Grenther, W.B., and Sartor, R.B.** 2003. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 52:370-376.
- Dijkstra, G., Moshage, H., van Dullemen, H.M., de Jager-Krikken, A., Tiebosch, A.T., Kleibeuker, J.H., Jansen, P.L., and van Goor, H.** 1998. Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 186:416-421.

- Dikopoulos, N., Nussler, A.K., Liptay, S., Bachem, M., Reinshagen, M., Stiegler, M., Schmid, R.M., Adler, G., and Weidenbach, H.** 2001. Inhibition of nitric oxide synthesis by aminoguanidine increases intestinal damage in the acute phase of rat TNBS-colitis. *Eur J Clin Invest* 31:234-239.
- Dinerman, J.L., Steiner, J.P., Dawson, T.M., Dawson, V., and Snyder, S.H.** 1994. Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology* 33:1245-1251.
- Donnelly, R.P., Fenton, M.J., Finbloom, D.S., and Gerrard, T.L.** 1990. Differential regulation of IL-1 production in human monocytes by IFN-gamma and IL-4. *J Immunol* 145:569-575.
- D'Ostiani, C.F., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P., and Romani, L.** 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* 191:1661-1674.
- Doyle, M.P., and Hoekstra, J.W.** 1981. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem* 14:351-358.
- Drakes, M., Blanchard, T., and Czinn, S.** 2004. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun* 72:3299-3309.
- Dray, A.** 1995. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 75:125-131.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., and Lipsky, P.E.** 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J* 12:1063-1073.
- Dubos, R., Schaedler, R.W., Costello, R., and Hoet, P.** 1965. Indigenous, Normal, and Autochthonous Flora of the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med* 122:67-76.
- Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K., and Meyer zum Buschenfelde, K.H.** 1995. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102:448-455.
- Ducluzeau, R.** 1994. Ecologie microbienne du tube digestif et flores de barrière. *Cah. Nutr. Diét.*: 29, 351-356.
- Ducluzeau, R., and Raibau, P.** 1979. Ecologie microbienne du tube digestif. *Actualités scientifiques de l'INRA*. Masson.
- Duffy, L.C.** 2000. Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine. *J Nutr* 130:432S-436S.
- Duffy, L.C., Zielezny, M.A., Carrion, V., Griffiths, E., Dryja, D., Hilty, M., Rook, C., and Morin, F., 3rd.** 1997. Concordance of bacterial cultures with endotoxin and interleukin-6 in necrotizing enterocolitis. *Dig Dis Sci* 42:359-365.
- Duffy, L.C., Zielezny, M.A., Riepenhoff-Talty, M., Dryja, D., Sayahthaheri-Altaie, S., Griffiths, E., Ruffin, D., Barrett, H., and Ogra, P.L.** 1994. Reduction of virus shedding by *B. bifidum* in experimentally induced MRV infection. Statistical application for ELISA. *Dig Dis Sci* 39:2334-2340.
- Duncan, H.E., and Edberg, S.C.** 1995. Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. *Crit Rev Microbiol* 21:85-100.

- Durate, I.D., Lorenzetti, B.B., and Ferreira, S.H.** 1990. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 186:289-293.
- Dvorak, A.M., Connell, A.B., and Dickersin, G.R.** 1979. Crohn's disease: a scanning electron microscopic study. *Hum Pathol* 10:165-177.
- Dvorak, A.M., Monahan, R.A., Osage, J.E., and Dickersin, G.R.** 1980. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. *Hum Pathol* 11:606-619.
- Eade, M.N., and Brooke, B.N.** 1969. Portal bacteraemia in cases of ulcerative colitis submitted to colectomy. *Lancet* 1:1008-1009.
- Eaves-Pyles, T., and Alexander, J.W.** 1996. Granulocyte colony-stimulating factor enhances killing of translocated bacteria but does not affect barrier function in a burn mouse model. *J Trauma* 41:1013-1017.
- Eckmann, L., Jung, H.C., Schurer-Maly, C., Panja, A., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M.F.** 1993. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 105:1689-1697.
- Ellis-Pegler, R.B., Crabtree, C., and Lambert, H.P.** 1975. The faecal flora of children in the United Kingdom. *J Hyg (Lond)* 75:135-142.
- Elson, C.O., Cong, Y., Iqbal, N., and Weaver, C.T.** 2001. Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma. *Semin Immunol* 13:187-194.
- Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S., and Riddell, R.H.** 1995. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109:1344-1367.
- Esser, R.E., Eyerman, M.C., Port, C.D., and Anderson, W.** 1989. Proinflammatory effects of interleukin 1 in the rat air pouch. *Int J Tissue React* 11:291-300.
- Ewer, A.K.** 2002. Role of platelet-activating factor in the pathophysiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl* 91:2-5.
- Fabia, R., Ar'Rajab, A., Johansson, M.L., Willen, R., Andersson, R., Molin, G., and Bengmark, S.** 1993. The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 28:155-162.
- Fagarasan, S., and Honjo, T.** 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 3:63-72.
- Fagarasan, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Ikuta, K., and Honjo, T.** 2001. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 413:639-643.
- Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T., and Gordon, J.I.** 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1157-1170.
- Fang, F.C.** 1997. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 99:2818-2825.
- FAO/WHO.** 2001; Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Argentina. (October 2001).

- Farthing, M.J., and Lennard-jones, J.E.** 1978. Sensibility of the rectum to distension and the anorectal distension reflex in ulcerative colitis. *Gut* 19:64-69.
- Favier, C., Neut, C., Mizon, C., Cortot, A., Colombel, J.F., and Mizon, J.** 1997. Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 42:817-822.
- Fazal, N., Shamim, M., Khan, S.S., Gamelli, R.L., and Sayeed, M.M.** 2000. Neutrophil depletion in rats reduces burn-injury induced intestinal bacterial translocation. *Crit Care Med* 28:1550-1555.
- Feelisch, M. & Stamler J. S.** 1996. Donors of nitrogen Oxides. In: *Methods in Nitric Oxide Research*. Stamler J. S., John Wiley & Sons Ltd,
- Feelisch, M.** 1998. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:113-122.
- Ferrante, A., Nandoskar, M., Walz, A., Goh, D.H., and Kowanko, I.C.** 1988. Effects of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha and beta on human neutrophil migration, respiratory burst and degranulation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 86:82-91.
- Ferreira, S.H., Duarte, I.D., and Lorenzetti, B.B.** 1991. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 201:121-122.
- Fidecka, S., and Lalewicz, S.** 1997. Studies on the antinociceptive effects of sodium nitroprusside and molsidomine in mice. *Pol J Pharmacol* 49:395-400.
- Fiocchi, C.** 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115:182-205.
- Fioramonti, J., Bueno, L., Delvaux, M., and Frexinos, J. 2001. [Old and new physiopathological concepts of irritable bowel syndrome]. *Gastroenterol Clin Biol* 25:C34-41.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., and O'Garra, A** 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146:3444-3451.
- Ford Bainton, D.** 1992 *Developmental biology of neutrophils and eosinophils*. In: *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Raven Press, New York.
- Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., and Smith, M.J.** 1980. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286:264-265.
- Forstermann, U., Boissel, J.P., and Kleinert, H** 1998. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Faseb J* 12:773-790.
- Forstermann, U., Pollock, J.S., Schmidt, H.H., Heller, M., and Murad, F** 1991. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1788-1792.

- Forsythe, R.M., Xu, D.Z., Lu, Q., and Deitch, E.A.** 2002. Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion. *Shock* 17:180-184.
- Fritsch, P., and de Saint-Blanquat, G.** 1976. [Formation of nitrites from nitrates in the digestive tract]. *Ann Nutr Aliment* 30:793-804.
- Fujii, H., Ichimori, K., Hoshiai, K., and Nakazawa, H** 1997. Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process. *J Biol Chem* 272:32773-32778.
- Fujiwara, M., Kaneko, T., Iwana, H., Taketomo, N., Tsunoo, H., Kanno, J., Ohkusa, T., and Okayasu, I.** 2003. Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* on experimental ulcerative colitis induced in mice by synthetic dextran sulfate sodium. *Digestion* 67:90-95.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T., and Forstner, J.F.** 1997. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliosylceramide. *Appl Environ Microbiol* 63:506-512.
- Fukushima, R., Gianotti, L., and Alexander, J.W.** 1994. The primary site of bacterial translocation. *Arch Surg* 129:53-58.
- Fukushima, Y., Kawata, Y., Mizumachi, K., Kurisaki, J., and Mitsuoka, T** 1999. Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. *Int J Food Microbiol* 46:193-197.
- Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365-378.
- Funda, D.P., Tuckova, L., Farre, M.A., Iwase, T., Moro, I., and Tlaskalova-Hogenova, H.** 2001. CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells in vitro: lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. *Infect Immun* 69:3772-3781.
- Furgal, A., and Litwin, J.A.** 1998. Distribution of mast cells along and across successive segments of the rat digestive tract: a quantitative study. *Folia Histochem Cytobiol* 36:19-27.
- Futter, L.E., al-Swayeh, O.A., and Moore, P.K.** 2001. A comparison of the effect of nitroparacetamol and paracetamol on liver injury. *Br J Pharmacol* 132:10-12.
- Gaboury, J., Woodman, R.C., Granger, D.N., Reinhardt, P., and Kubes, P.** 1993. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol* 265:H862-867.
- Gade, J., and Thorn, P.** 1989. Paraghurt for patients with irritable bowel syndrome. A controlled clinical investigation from general practice. *Scand J Prim Health Care* 7:23-26.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Stern, D.F., Liu, J., and Sessa, W.C.** 1996a. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 271:27237-27240.

- Garcia-Cardena, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J.E., and Sessa, W.C.** 1996b. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6448-6453.
- Garcia-Lafuente, A., Antolin, M., Guarner, F., Crespo, E., and Malagelada, J.R.** 2001. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut* 48:503-507.
- Garcia-Lafuente, A., Antolin, M., Guarner, F., Crespo, E., Salas, A., Forcada, P., Laguarda, M., Gavaldà, J., Baena, J.A., Vilaseca, J., et al.** 1997. Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol* 272:G10-15.
- Gardiner, K.R., Erwin, P.J., Anderson, N.H., Barr, J.G., Halliday, M.I., and Rowlands, B.J.** 1993. Colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis. *Br J Surg* 80:512-516.
- Gardiner, K.R., Anderson, N.H., Rowlands, and Barbul A** 1995. Colitis and colonic mucosal barrier dysfunction. *Gut* 37:530-535.
- Gath, U., Hakvoort, A., Wegener, J., Decker, S., and Galla, H.J.** 1997. Porcine choroid plexus cells in culture: expression of polarized phenotype, maintenance of barrier properties and apical secretion of CSF-components. *Eur J Cell Biol* 74:68-78.
- Gautreaux, M.D., Deitch, E.A., and Berg, R.D.** 1994. T lymphocytes in host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 62:2874-2884.
- Geboes, K., and Collins, S.** 1998. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil* 10:189-202.
- Geerling, B.J., v Houwelingen, A.C., Badart-Smook, A., Stockbrugger, R.W., and Brummer, R.J.** 1999. The relation between antioxidant status and alterations in fatty acid profile in patients with Crohn disease and controls. *Scand J Gastroenterol* 34:1108-1116.
- Gennari, R., Alexander, J.W., Gianotti, L., Eaves-Pyles, T., and Hartmann, S.** 1994. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor improves survival in two models of gut-derived sepsis by improving gut barrier function and modulating bacterial clearance. *Ann Surg* 220:68-76.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B.** 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
- Giaffer, M.H., Holdsworth, C.D., and Duerden, B.I.** 1991. The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. *J Med Microbiol* 35:238-243.
- Giaffer, M.H., Holdsworth, C.D., and Duerden, B.I.** 1992. Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 33:646-650.

- Gionchetti, P., Amadini, C., Rizzello, F., Venturi, A., Poggioli, G., and Campieri, M.** 2003. Probiotics for the treatment of postoperative complications following intestinal surgery. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:821-831.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M., and Campieri, M.** 2000. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119: 305-309.
- Gitter, A.H., Wullstein, F., Fromm, M., and Schulzke, J.D.** 2001. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology* 121:1320-1328.
- Gonsalkorale, W.M., Perrey, C., Pravica, V., Whorwell, P.J., and Hutchinson, I.V.** 2003. Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component? *Gut* 52 : 91-93.
- Gotoh, T., and Mori, M.** 1999. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol* 144:427-434.
- Granados-Soto, V., Rufino, M.O., Gomes Lopes, L.D., and Ferreira, S.H.** 1997. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 340:177-180.
- Granger, D.L., Hibbs, J.B., Jr., Perfect, J.R., and Durack, D.T.** 1988. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J Clin Invest* 81:1129-1136.
- Gregg, G.J., Adamski, S.W., and Dobbins, D.E.** 1986. Physiological and pharmacological evidence for the regulation of permeability. *Fed Proc* 45:96-100.
- Grimm, M.C., Pavli, P., Van de Pol, E., and Doe, W.F.** 1995. Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 100:291-297.
- Griscavage, J.M., Rogers, N.E., Sherman, M.P., and Ignarro, L.J.** 1993. Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J Immunol* 151:6329-6337.
- Grisham, M.B.** 1994. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 344:859-861.
- Grisham, M.B., and Granger, D.N.** 1988. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci* 33:6S-15S.
- Grisham, M.B., Granger, D.N., and Lefer, D.J.** 1998. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med* 25:404-433.
- Grisham, M.B., Jour'd'Heuil, D., and Wink, D.A.** 1999. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 276:G315-321.
- Grisham, M.B., Specian, R.D., and Zimmerman, T.E.** 1994. Effects of nitric oxide synthase inhibition on the pathophysiology observed in a model of chronic granulomatous colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 271:1114-1121.

- Groux, H., and Powrie, F.** 1999. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol Today* 20:442-445.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G.** 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
- Guo, F.H., Comhair, S.A., Zheng, S., Dweik, R.A., Eissa, N.T., Thomassen, M.J., Calhoun, W., and Erzurum, S.C.** 2000. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J Immunol* 164:5970-5980.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., and Testoni, P.A.** 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 45:1462-1464.
- Haebler, H. L., Jaenig, W. and Koltzenburg, M.** 1990. Activation of unmyelinated afferents by mechanical stimuli and inflammation of urinary bladder. *J Physiol*; 425: 545-563.
- Hall, A.V., Antoniou, H., Wang, Y., Cheung, A.H., Arbus, A.M., Olson, S.L., Lu, W.C., Kau, C.L., and Marsden, P.A.** 1994. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem* 269:33082-33090.
- Haller, D., Bode, C., Hammes, W.P., Pfeifer, A.M., Schiffrin, E.J., and Blum, S.** 2000. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47:79-87.
- Haller, D., Serrant, P., Peruisseau, G., Bode, C., Hammes, W.P., Schiffrin, E., and Blum, S.** 2002. IL-10 producing CD14^{low} monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *Microbiol Immunol* 46:195-205.
- Halpern, G.M., Prindiville, T., Blankenburg, M., Hsia, T., and Gershwin, M.E.** 1996. Treatment of irritable bowel syndrome with Lacteol Fort: a randomized, double-blind, cross-over trial. *Am J Gastroenterol* 91:1579-1585.
- Hans, W., Scholmerich, J., Gross, V., and Falk, W.** 2000. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12:267-273.
- Harper, P.H., Lee, E.C., Kettlewell, M.G., Bennett, M.K., and Jewell, D.P.** 1985. Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut* 26:279-284.
- Hart, A.L., Stagg, A.J., Frame, M., Graffner, H., Glise, H., Falk, P., and Kamm, M.A.** 2002. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 16:1383-1393.
- Hattori, Y., Campbell, E.B., and Gross, S.S.** 1994. Argininosuccinate synthetase mRNA and activity are induced by immunostimulants in vascular smooth muscle. Role in the regeneration or arginine for nitric oxide synthesis. *J Biol Chem* 269 : 9405-9408.
- Havenaar, R. and Huis In't Veld, M.J.H.** 1992. Probiotics: a general view. In: B.J.B. Wood, Editor, *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease* vol. 1, Elsevier Applied Science, Amsterdam pp. 151-170.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A.** 2001. The innate immune

response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.

Hayashi, Y., Nishio, M., Naito, Y., Yokokura, H., Nimura, Y., Hidaka, H., and Watanabe, Y 1999. Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J Biol Chem* 274:20597-20602.

Heinemann, C., van Hylckama Vlieg, J.E., Janssen, D.B., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., and Reid, G. 2000. Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS Microbiol Lett* 190:177-180.

Helgeland, L., Vaage, J.T., Rolstad, B., Midtvedt, T., and Brandtzaeg, P. 1996. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 89:494-501.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.

Hershberg, R.M., Cho, D.H., Youakim, A., Bradley, M.B., Lee, J.S., Framson, P.E., and Nepom, G.T. 1998. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 102:792-803.

Herzenberg, L.A. 2000. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev* 175:9-22.

Hevel, J.M., White, K.A., and Marletta, M.A. 1991. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 266:22789-22791.

Hierholzer, C., Harbrecht, B., Menezes, J.M., Kane, J., MacMicking, J., Nathan, C.F., Peitzman, A.B., Billiar, T.R., and Twardy, D.J. 1998. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* 187:917-928.

Hill, M.J., and Drasar, B.S. 1975. The normal colonic bacterial flora. *Gut* 16:318-323.

Hirano, J., Yoshida, T., Sugiyama, T., Koide, N., Mori, I., and Yokochi, T. 2003. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiol Immunol* 47:405-409.

Hogaboam, C.M., Jacobson, K., Collins, S.M., and Blennerhassett, M.G. 1995. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. *Am J Physiol* 268:G673-684.

Hollander, D. 1988. Crohn's disease--a permeability disorder of the tight junction? *Gut* 29:1621-1624.

Holma, R., Salmenpera, P., Lohi, J., Vapaatalo, H., and Korpela, R. 2001. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus reuteri* R2LC on acetic acid-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 36:630-635.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., and Huis in't Veld, J.H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 41:85-101.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162:3749-3752.

- Hosoda, K., Takahashi, T., Fujino, M.A., and Owyang, C.** 1998. Inhibitory effects of nitric oxide donors on nitric oxide synthesis in rat gastric myenteric plexus. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1222-1230.
- Hosoi, T., Goto, H., Arisawa, T., Niwa, Y., Okada, N., Ohmiya, N., and Hayakawa, T.** 2001. Role of nitric oxide synthase inhibitor in experimental colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:9-12.
- Hudault, S., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F., and Servin, A.L.** 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl Environ Microbiol* 63:513-518.
- Hulkower, K.I., Wertheimer, S.J., Levin, W., Coffey, J.W., Anderson, C.M., Chen, T., DeWitt, D.L., Crowl, R.M., Hope, W.C., and Morgan, D.W.** 1994. Interleukin-1 beta induces cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin H synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. Evidence for their roles in the production of prostaglandin E2. *Arthritis Rheum* 37:653-661.
- Hutcheson, I.R., Whittle, B.J., and Boughton-Smith, N.K.** 1990. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol* 101:815-820.
- Ikeda, I., Kasajima, T., Ishiyama, S., Shimojo, T., Takeo, Y., Nishikawa, T., Kameoka, S., Hiroe, M., and Mitsunaga, A.** 1997. Distribution of inducible nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 92:1339-1341.
- Ikeda, Y., Akbar, F., Matsui, H., and Onji, M.** 2001. Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:841-850.
- Ishikawa, H., Akedo, I., Umesaki, Y., Tanaka, R., Imaoka, A., and Otani, T.** 2003. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 22:56-63.
- Issekutz, A.C.** 1984. Role of polymorphonuclear leukocytes in the vascular responses of acute inflammation. *Lab Invest* 50:605-607.
- Iwasaki, A., and Kelsall, B.L.** 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 190:229-239.
- Iwashita, E., Iwai, A., Sawazaki, Y., Matsuda, K., Miyahara, T., and Itoh, K.** 1998. Activation of microvascular endothelial cells in active ulcerative colitis and detection of inducible nitric oxide synthase. *J Clin Gastroenterol* 27 Suppl 1:S74-79.
- Jacobson, K., McHugh, K., and Collins, S.M.** 1995. Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat. *Gastroenterology* 109:718-722.
- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A.** 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31:3388-3393.
- Jenkins, R.T., Goodacre, R.L., Rooney, P.J., Bienenstock, J., Sivakumaran, T., and Walker, W.H.** 1986. Studies of intestinal permeability in inflammatory diseases using polyethylene glycol 400. *Clin Biochem* 19:298-302.

- Jijon, H., Backer, J., Diaz, H., Yeung, H., Thiel, D., McKaigney, C., De Simone, C., and Madsen, K** 2004. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 126:1358-1373.
- Johnston, B., Kanwar, S., and Kubes, P.** 1996. Hydrogen peroxide induces leukocyte rolling: modulation by endogenous antioxidant mechanisms including NO. *Am J Physiol* 271:H614-621.
- Jourd'heuil, D., Morise, Z., Conner, E.M., and Grisham, M.B.** 1997. Oxidants, transcription factors, and intestinal inflammation. *J Clin Gastroenterol* 25 Suppl 1:S61-72.
- Julia, V., Mezzasalma, T., and Bueno, L.** 1995. Influence of bradykinin in gastrointestinal disorders and visceral pain induced by acute or chronic inflammation in rats. *Dig Dis Sci* 40:1913-1921.
- Jun, C.D., Choi, B.M., Kim, S.U., Lee, S.Y., Kim, H.M., and Chung, H.T.** 1995. Down-regulation of transforming growth factor-beta gene expression by antisense oligodeoxynucleotides increases recombinant interferon-gamma-induced nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Immunology* 85:114-119.
- Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S.K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M.F.** 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95:55-65.
- Jungi, T.W., Brcic, M., Sager, H., Dobbelaere, D.A., Furger, A., and Roditi, I** 1997. Antagonistic effects of IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) on inducible nitric oxide synthase expression in bovine macrophages exposed to gram-positive bacteria. *Clin Exp Immunol* 109:431-438.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F., and Liu, Y.J.** 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194:863-869.
- Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., and Arvilommi, H** 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 32:141-144.
- Kanaan, S.A., Poole, S., Saade, N.E., Jabbur, S., and Safieh-Garabedian, B** 1998. Interleukin-10 reduces the endotoxin-induced hyperalgesia in mice. *J Neuroimmunol* 86:142-150.
- Kanwar, S., Wallace, J.L., Befus, D., and Kubes, P.** 1994. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am J Physiol* 266:G222-229.
- Karlsson, H., Larsson, P., Wold, A.E., and Rudin, A.** 2004. Pattern of cytokine responses to gram-positive and gram-negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells. *Infect Immun* 72:2671-2678.
- Katayama, M., Xu, D., Specian, R.D., and Deitch, E.A.** 1997. Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: effects of protein malnutrition and endotoxin in rats. *Ann Surg* 225:317-326.
- Katsuyama, K., Shichiri, M., Marumo, F., and Hirata, Y.** 1998. NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with

phosphorylation and degradation of IkappaB-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1796-1802.

- Kaul, N., & Foreman, H. J.** 2000. Reactive oxygen species in physiology and toxicology. Chapter 16. In: *Toxicology of human environment*, C. J. Rhodes, ed., Taylor and Francis, Klondon, 311-336.
- Kawabata, A., Fukuzumi, Y., Fukushima, Y., and Takagi, H** 1992. Antinociceptive effect of L-arginine on the carrageenin-induced hyperalgesia of the rat: possible involvement of central opioidergic systems. *Eur J Pharmacol* 218:153-158.
- Keighley, M.R., Arabi, Y., Dimock, F., Burdon, D.W., Allan, R.N., and Alexander-Williams, J.** 1978. Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut* 19:1099-1104.
- Kelleher, P., Maroof, A., and Knight, S.C.** 1999. Retrovirally induced switch from production of IL-12 to IL-4 in dendritic cells. *Eur J Immunol* 29:2309-2318.
- Kennedy, R.J., Hoper, M., Deodhar, K., Kirk, S.J., and Gardiner, K.R.** 2000. Probiotic therapy fails to improve gut permeability in a hapten model of colitis. *Scand J Gastroenterol* 35:1266-1271.
- Keshavarzian, A., Sedghi, S., Kanofsky, J., List, T., Robinson, C., Ibrahim, C., and Winship, D.** 1992. Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology* 103:177-185.
- Kett, K., Baklien, K., Bakken, A., Kral, J.G., Fausa, O., and Brandtzaeg, P.** 1995. Intestinal B-cell isotype response in relation to local bacterial load: evidence for immunoglobulin A subclass adaptation. *Gastroenterology* 109:819-825.
- Khaled, Z., Gunadalini, S., Kirschner, B. S. and Hendrickson, B** 2003. Filtered of lactobacillus Ggprevents Crohn's disease. [Abstract] *Gastreterology*;T1058 : A473.
- Khan, B.V., Harrison, D.G., Olbrych, M.T., Alexander, R.W., and Medford, R.M.** 1996. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 9114-9119.
- Khoo, U.Y., Proctor, I.E., and Macpherson, A.J.** 1997. CD4+ T cell down-regulation in human intestinal mucosa: evidence for intestinal tolerance to luminal bacterial antigens. *J Immunol* 158:3626-3634.
- Kimura, H., Hokari, R., Miura, S., Shigematsu, T., Hirokawa, M., Akiba, Y., Kurose, I., Higuchi, H., Fujimori, H., Tsuzuki, Y., et al.** 1998. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 42:180-187.
- Kishimoto, S., Kobatashi, H., Machino, H., Tari, A., Kajiyama, G. and Miyoshi, A** 1994. High concentrations of substance P as possible transmission of abdominal pain in rats with chemical induced ulcerative colitis. *Biomed Res*; 15:133-140.
- Kiss, J., Lamarque, D., Delchier, J.C., and Whittle, B.J.** 1997. Time-dependent actions of nitric oxide synthase inhibition on colonic inflammation induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Eur J Pharmacol* 336:219-224.
- Kitagawa, H., Takeda, F., and Kohei, H** 1990. Effect of endothelium-derived relaxing factor on the gastric lesion induced by HCl in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 253:1133-1137.

- Kolios, G., Rooney, N., Murphy, C.T., Robertson, D.A., and Westwick, J.** 1998. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* 43:56-63.
- Konrad, A., Mahler, M., Flogerzi, B., Kalousek, M.B., Lange, J., Varga, L., and Seibold, F.** 2003. Amelioration of murine colitis by feeding a solution of lysed *Escherichia coli*. *Scand J Gastroenterol* 38:172-179.
- Kopp, E.B., and Medzhitov, R.** 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11:13-18.
- Korhonen, R., Korpela, R., Saxelin, M., Maki, M., Kankaanranta, H., and Moilanen, E.** 2001. Induction of nitric oxide synthesis by probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in J774 macrophages and human T84 intestinal epithelial cells. *Inflammation* 25:223-232.
- Krieg, A.M.** 1995. CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J Clin Immunol* 15:284-292.
- Krieg, A.M.** 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20:709-760.
- Kroese, F.G., Butcher, E.C., Stall, A.M., Lalor, P.A., Adams, S., and Herzenberg, L.A.** 1989. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol* 1:75-84.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M., et al.** 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31:3026-3037.
- Kruis, W., Schutz, E., Fric, P., Fixa, B., Judmaier, G., and Stolte, M.** 1997. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 11:853-858.
- Kubes, P.** 1992. Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *Am J Physiol* 262:G1138-1142.
- Kubes, P.** 1993. Nitric oxide-induced microvascular permeability alterations: a regulatory role for cGMP. *Am J Physiol* 265:H1909-1915.
- Kubes, P., and Granger, D. N.** 1992. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 262:H611-615.
- Kubes, P., Kanwar, S., Niu, X.F., and Gaboury, J.P.** 1993. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *Faseb J* 7:1293-1299.
- Kubes, P., Kurose, I., and Granger, D.N.** 1994. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. *Am J Physiol* 267:H931-937.
- Kubes, P., Reinhardt, P.H., Payne, D., and Woodman, R.C.** 1995. Excess nitric oxide does not cause cellular, vascular, or mucosal dysfunction in the cat small intestine. *Am J Physiol* 269:G34-41.

- Kubes, P., Suzuki, M., and Granger, D.N.** 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4651-4655.
- Kühn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. and Muller, W.** 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.
- Kuisma, J., Mentula, S., Jarvinen, H., Kahri, A., Saxelin, M., and Farkkila, M.** 2003. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Aliment Pharmacol Ther* 17:509-515.
- Kurjak, M., Koppitz, P., Schusdziarra, V., and Allescher, H.D.** 1999. Evidence for a feedback inhibition of NO synthesis in enteric synaptosomes via a nitrosothiol intermediate. *Am J Physiol* 277:G875-884.
- Laffineur, G., Lescut, D., Vincent, P., Quandalle, P., Wurtz, A., and Colombel, J.F.** 1992. [Bacterial translocation in Crohn disease]. *Gastroenterol Clin Biol* 16:777-781.
- Lambert, J. and Hull, R.** 1996. Upper gastrointestinal tract disease and probiotics. *Asia J Clin Nutr*; 5: 31-35.
- Lambert, J.R.** 1996. Pharmacology of the gastric mucosa: a rational approach to *Helicobacter* polytherapy. *Gastroenterology* 111:521-523.
- Lammers, K.M., Helwig, U., Swennen, E., Rizzello, F., Venturi, A., Caramelli, E., Kamm, M.A., Brigidi, P., Gionchetti, P., and Campieri, M.** 2002. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am J Gastroenterol* 97:1182-1186.
- Lancaster, J.R., Jr.** 1994. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8137-8141.
- Lancaster, J.R., Jr.** 1996. Diffusion of free nitric oxide. *Methods Enzymol* 268:31-50.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F.** 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1:311-316.
- Larauche, M., Anton, P.M., Garcia-Villar, R., Theodorou, V., Frexinos, J., Bueno, L., and Fioramonti, J.** 2003. Protective effect of dietary nitrate on experimental gastritis in rats. *Br J Nutr* 89:777-786.
- Laughlin, T.M., Bethea, J.R., Yeziarski, R.P., and Wilcox, G.L.** 2000. Cytokine involvement in dynorphin-induced allodynia. *Pain* 84:159-167.
- Le Bars, D., and Adam, F.** 2002. [Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain]. *Ann Fr Anesth Reanim* 21:315-335.
- Lebman, D.A., and Edmiston, J.S.** 1999. The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect* 1:1297-1304.
- Leclerc, H., and Moriamez, J.C.** 1980. [Quantitative study of the faecal flora in adult and baby artificially fed from birth (author's transl)]. *Pathol Biol (Paris)* 28:217-226.
- Lee, Y.K., and Puong, K.Y.** 2002. Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate. *Br J Nutr* 88 Suppl 1:S101-108.

- Lefer, D.J., Nakanishi, K., Johnston, W.E., and Vinten-Johansen, J.** 1993. Antineutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor after acute myocardial ischemia and reperfusion of dogs. *Circulation* 88:2337-2350.
- Levine, J.D., Fields, H.L., and Basbaum, A.I.** 1993. Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosci* 13:2273-2286.
- Li, D.S., Raybould, H.E., Quintero, E., and Guth, P.H.** 1992. Calcitonin gene-related peptide mediates the gastric hyperemic response to acid back-diffusion. *Gastroenterology* 102:1124-1128.
- Lievín, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J.R., and Servin, A.L.** 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47:646-652.
- Ligumsky, M., Simon, P.L., Karmeli, F., and Rachmilewitz, D.** 1990. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. *Gut* 31:686-689.
- Lih-Brody, L., Powell, S.R., Collier, K.P., Reddy, G.M., Cerchia, R., Kahn, E., Weissman, G.S., Katz, S., Floyd, R.A., McKinley, M.J., et al.** 1996. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 41:2078-2086.
- Lilly, D.M., and Stillwell, R.H.** 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* 147:747-748.
- Linskens, R.K., Huijsdens, X.W., Savelkoul, P.H., Vandenbroucke-Grauls, C.M., and Meuwissen, S.G.** 2001. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl*:29-40.
- Liu, J., Garcia-Cardena, G., and Sessa, W.C.** 1996. Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry* 35:13277-13281.
- Liu, S.M., and Sundqvist, T.** 1997. Nitric oxide and cGMP regulate endothelial permeability and F-actin distribution in hydrogen peroxide-treated endothelial cells. *Exp Cell Res* 235:238-244.
- Lloyd, A.R., and Oppenheim, J.J.** 1992. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 13:169-172.
- Lobo, A.J., Sagar, P.M., Rothwell, J., Quirke, P., Godwin, P., Johnston, D., and Axon, A.T.** 1993. Carriage of adhesive *Escherichia coli* after restorative proctocolectomy and pouch anal anastomosis: relation with functional outcome and inflammation. *Gut* 34:1379-1383.
- Lotz, M., Vaughan, J.H., and Carson, D.A.** 1988. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 241:1218-1221.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O'Garra, A.** 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154:5071-5079.

- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., and Hollingsworth, M.A.** 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52:827-833.
- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M.A.** 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 276:G941-950.
- MacKendrick, W., Caplan, M., and Hsueh, W.** 1993. Endogenous nitric oxide protects against platelet-activating factor-induced bowel injury in the rat. *Pediatr Res* 34:222-228.
- Mackie, R.I., Sghir, A., and Gaskins, H.R.** 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69:1035S-1045S.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C.** 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-350.
- MacNaughton, W.K., Cirino, G., and Wallace, J.L.** 1989. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. *Life Sci* 45:1869-1876.
- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M.** 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288:2222-2226.
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., and De Simone, C.** 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121:580-591.
- Madsen, K., Jijon, H., Yeung, H., McKaigney, C. and De Simone, C.** 2002. DNA from probiotic *Bacteria* exerts anti-inflammatory action on intestinal epithelial cells by inhibition of NF- κ B. [Abstract] *Gastroenterology*; 546 : A64.
- Madsen, K.L., Doyle, J.S., Jewell, L.D., Tavernini, M.M., and Fedorak, R.N.** 1999. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 116:1107-1114.
- Mahida, Y.R., Wu, K., and Jewell, DP.** 1989. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 30:835-838.
- Malchow, H.A.** 1997. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 25:653-658.
- Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M., and Isolauri, E** 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Ann Nutr Metab* 40:137-145.
- Malmberg, A.B., and Yaksh, T.L.** 1993. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain* 54:291-300.
- Malmstrom, V., Shipton, D., Singh, B, Al-Shamkhani, A., Puklavec, M.J., Barclay, A.N., and Powrie, F.** 2001. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol* 166:6972-6981.

- Mangell, P., Nejdfor, P., Wang, M., Ahrne, S., Westrom, B., Thorlaci, H., and Jeppsson, B.** 2002. Lactobacillus plantarum 299v inhibits Escherichia coli-induced intestinal permeability. *Dig Dis Sci* 47:511-516.
- Mao, Y., Nobaek, S., Kasravi, B., Adawi, D., Stenram, U., Molin, G., and Jeppsson, B.** 1996. The effects of Lactobacillus strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 111:334-344.
- Marin, M.L., Geller, S.A., Greenstein, A.J., Marin, R.H., Gordon, R.E., and Aufses, A.H., Jr.** 1983. Ultrastructural pathology of Crohn's disease: correlated transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and freeze fracture studies. *Am J Gastroenterol* 78:355-364.
- Mariotto, S., Cuzzolin, L., Adami, A., Del Soldato, P., Suzuki, H., and Benoni, G.** 1995. Inhibition by sodium nitroprusside of the expression of inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils. *Br J Pharmacol* 114:1105-1106.
- Marletta, M.A.** 1988. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol* 1:249-257.
- Marteau, P., Seksik, P., and Shanahan, F.** 2003. Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:47-61.
- Mashimo, H., and Goyal, R.K.** 1999. Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am J Physiol* 277:G745-750.
- Matsunaga, T., and Rahman, A.** 1998. What brought the adaptive immune system to vertebrates?--The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunol Rev* 166:177-186.
- Mattar, A.F., Drongowski, R.A., Coran, A.G., and Harmon, C.M.** 2001. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. *Pediatr Surg Int* 17:265-268.
- Mattar, A.F., Teitelbaum, D.H., Drongowski, R.A., Yongyi, F., Harmon, C.M., and Coran, A.G.** 2002. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatr Surg Int* 18:586-590.
- Matthews, J.R., Botting, C.H., Panico, M., Morris, H.R., and Hay, R.T.** 1996. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 24:2236-2242.
- Matzinger, P.** 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045.
- May, M.J., and Ghosh, S.** 1998. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19:80-88.
- Mayer, B., John, M., and Bohme, E.** 1990. Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* 277:215-219.
- Mayer, E.A., and Gebhart, G.F.** 1994. Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. *Gastroenterology* 107:271-293.
- Mayer, L.** 1998. Current concepts in mucosal immunity. I. Antigen presentation in the intestine: new rules and regulations. *Am J Physiol* 274:G7-9.

- McCafferty, D., Muscara, M. and Wallace, J. L.** 1999b. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice. [Abstract] *Gastroenterology*;116 : A 773.
- McCafferty, D.M., Miampamba, M., Sihota, E., Sharkey, K.A., and Kubes, P.** 1999a. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. *Gut* 45:864-873.
- McCafferty, D.M., Mudgett, J.S., Swain, M.G., and Kubes, P.** 1997. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology* 112:1022-1027.
- McCarthy, J., O'Mahony, L., O'Callaghan, L., Sheil, B., Vaughan, E.E., Fitzsimons, N., Fitzgibbon, J., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., et al.** 2003. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 52:975-980.
- McCracken, V.J., and Lorenz, R.G.** 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol* 3:1-11.
- McKay, D.M., and Bienenstock, J.** 1994. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol Today* 15:533-538.
- Means, T.K., Golenbock, D.T., and Fenton, M.J.** 2000. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:219-232.
- Medzhitov, R.** 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr.** 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173:89-97.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr.** 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr.** 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Mehta, A.M., Patel, K.A., and Dave, P.J.** 1983. Purification and properties of the inhibitory protein isolated from *Lactobacillus acidophilus* AC1. *Microbios* 38:73-81.
- Meier, B., Radeke, H.H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K., and Habermehl, G.G.** 1989. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J* 263:539-545.
- Menconi, M.J., Unno, N., Smith, M., Aguirre, D.E., and Fink, M.P.** 1998. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxyxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1425:189-203.
- Mestecky, J., Russell, M.W., and Elson, C.O.** 1999. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* 44:2-5.

- Metcalf, D.D., Baram, D., and Mekori, Y.A.** 1997. Mast cells. *Physiol Rev* 77:1033-1079.
- Miampamba, M., and Sharkey, K.A.** 1999. Temporal distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 11:193-206.
- Miles, A.M., Bohle, D.S., Glassbrenner, P.A., Hansert, B., Wink, D.A., and Grisham, M.B.** 1996. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem* 271:40-47.
- Miller, L.J., Fischer, K.A., Goralnick, S.J., Litt, M., Burleson, J.A., Albertsen, P., and Kreutzer, D.L.** 2002. Interleukin-10 levels in seminal plasma: implications for chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome. *J Urol* 167:753-756.
- Miller, M.J., and Sandoval, M.** 1999. Nitric Oxide. III. A molecular prelude to intestinal inflammation. *Am J Physiol* 276:G795-799.
- Miller, M.J., Munshi, U.K., Sadowska-Krowicka, H., Kakkis, J.L., Zhang, X.J., Eloby-Childress, S., and Clark, D.A.** 1994. Inhibition of calcium-dependent nitric oxide synthase causes ileitis and leukocytosis in guinea pigs. *Dig Dis Sci* 39:1185-1192.
- Miller, M.J., Sadowska-Krowicka, H., Chotinaruemol, S., Kakkis, J.L., and Clark, D.A.** 1993. Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 264:11-16.
- Miller, M.J., Thompson, J.H., Zhang, X.J., Sadowska-Krowicka, H., Kakkis, J.L., Munshi, U.K., Sandoval, M., Rossi, J.L., Eloby-Childress, S., Beckman, J.S., et al.** 1995. Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 109:1475-1483.
- Mimura, T., Rizzello, F., Helwig, U., Poggioli, G., Schreiber, S., Talbot, I.C., Nicholls, R.J., Gionchetti, P., Campieri, M., and Kamm, M.A.** 2004. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 53:108-114.
- Mishima, S., Xu, D., Lu, Q., and Deitch, E.A.** 1997. Bacterial translocation is inhibited in inducible nitric oxide synthase knockout mice after endotoxin challenge but not in a model of bacterial overgrowth. *Arch Surg* 132:1190-1195.
- Mitchell, J.A., and Warner, T.D.** 1999. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 128:1121-1132.
- Miyake, K., Yamashita, Y., Ogata, M., Sudo, T., and Kimoto, M.** 1995. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J Immunol* 154:3333-3340.
- Mizuno, H., Sakamoto, C., Matsuda, K., Wada, K., Uchida, T., Noguchi, H., Akamatsu, T., and Kasuga, M.** 1997. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology* 112:387-397.
- Moilanen, E., Vuorinen, P., Kankaanranta, H., Metsa-Ketela, T., and Vapaatalo, H.** 1993. Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. *Br J Pharmacol* 109:852-858.

- Moncada, S., Ferreira, S.h., Vane, J.R. 1978.** Pain and inflammatory mediators. In: Handbook of experimental pharmacology vol 50/1 New York : Springer-Verlag 588-617.
- Moochhala, S., Chhatwal, V.J., Chan, S.T., Ngoi, S.S., Chia, Y.W., and Rauff, A. 1996.** Nitric oxide synthase activity and expression in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 17:1171-1174.
- Moore, P.K., Oluyomi, A.O., Babbedge, R.C., Wallace, P., and Hart, S.L. 1991.** L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 102:198-202.
- Moreau, M.C., Thomasson, M., Ducluzeau, R., and Raibaud, P. 1986.** [Kinetics of establishment of digestive microflora in the human newborn infant as a function of the kind of milk]. *Reprod Nutr Dev* 26:745-753.
- Morin, C., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., and Barratt, G. 1994.** Factors influencing macrophage activation by muramyl peptides: inhibition of NO synthase activity by high levels of NO. *Biochim Biophys Acta* 1224:427-432.
- Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., and Wallace, J.L. 1989.** Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96:795-803.
- Morteau, O., Hachet, T., Caussette, M., and Bueno, L. 1994.** Experimental colitis alters visceromotor response to colorectal distension in awake rats. *Dig Dis Sci* 39:1239-1248.
- Moser, M., and Murphy, K.M. 2000.** Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1:199-205.
- Mowat, A.M. 2003.** Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3:331-341.
- Mulder, T.P., Verspaget, H.W., Janssens, A.R., de Bruin, P.A., Pena, A.S., and Lamers, C.B. 1991.** Decrease in two intestinal copper/zinc containing proteins with antioxidant function in inflammatory bowel disease. *Gut* 32:1146-1150.
- Muller, G., Muller, A., Tuting, T., Steinbrink, K., Saloga, J., Szalma, C., Knop, J., and Enk, A.H. 2002.** Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. *J Invest Dermatol* 119:836-841.
- Munder, M., Eichmann, K., Moran, J.M., Centeno, F., Soler, G., and Modolell, M. 1999.** Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 163:3771-3777.
- Nagasaki, A., Gotoh, T., Takeya, M., Yu, Y., Takiguchi, M., Matsuzaki, H., Takatsuki, K., and Mori, M. 1996.** Coinduction of nitric oxide synthase, argininosuccinate synthetase, and argininosuccinate lyase in lipopolysaccharide-treated rats. RNA blot, immunoblot, and immunohistochemical analyses. *J Biol Chem* 271:2658-2662.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R., and Clemens, R.A. 1999.** Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr* 39:13-126.
- Nakamura, A., Fujita, M., and Shiomi, H. 1996.** Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 117:407-412.

- Nakamura, H., Tsukada, H., Oya, M., Onomura, M., Saito, T., Fukuda, K., Kodama, M., Taniguchi, T., Tominaga, M., Hosokawa, M., et al.** 1999. Aminoguanidine has both an anti-inflammatory effect on experimental colitis and a proliferative effect on colonic mucosal cells. *Scand J Gastroenterol* 34:1117-1122.
- Neeser, J.R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S., and Karlsson, K.A.** 2000. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology* 10:1193-1199.
- Ness, T.J., and Gebhart, G.F.** 1991. Interactions between visceral and cutaneous nociception in the rat. II. Noxious visceral stimuli inhibit cutaneous nociceptive neurons and reflexes. *J Neurophysiol* 66:29-39.
- Netea, M.G., Van Der Graaf, C.A., Vonk, A.G., Verschueren, I., Van Der Meer, J.W., and Kullberg, B.J.** 2002. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 185:1483-1489.
- Neutra, M.R.** 1998. Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am J Physiol* 274:G785-791.
- Ney, P., Schroder, H., and Schror, K.** 1990. Nitrovasodilator-induced inhibition of LTB4 release from human PMN may be mediated by cyclic GMP. *Eicosanoids* 3:243-245.
- Nicholson, B., Manner, C.K., Kleeman, J., and MacLeod, C.L.** 2001. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *J Biol Chem* 276:15881-15885.
- Niedzielin, K., Kordecki, H., and Birkenfeld, B.** 2001. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:1143-1147.
- Nielsen, O.H., Jorgensen, S., Pedersen, K., and Justesen, T.** 1994. Microbiological evaluation of jejunal aspirates and faecal samples after oral administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol* 76:469-474.
- Nobaek, S., Johansson, M.L., Molin, G., Ahrne, S., and Jeppsson, B.** 2000. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 95:1231-1238.
- Nussler, A.K., Billiar, T.R., Liu, Z.Z., and Morris, S.M., Jr.** 1994. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. *J Biol Chem* 269:1257-1261.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R.** 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98:694-702.
- O'Mahony, L., Feeney, M., O'Halloran, S., Murphy, L., Kiely, B., Fitzgibbon, J., Lee, G., O'Sullivan, G., Shanahan, F., and Collins, J.K.** 2001. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther* 15:1219-1225.
- Ortega-Cava, C.F., Ishihara, S., Rumi, M.A., Kawashima, K., Ishimura, N., Kazumori, H., Udagawa, J., Kadowaki, Y., and Kinoshita, Y.** 2003. Strategic

compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 170:3977-3985.

- Osman, N., Adawi, D., Ahrne, S., Jeppsson, B., and Molin, G.** 2004. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Dig Dis Sci* 49:320-327.
- O'Sullivan, M.A., and O'Morain, C.A.** 2000. Bacterial supplementation in the irritable bowel syndrome. A randomised double-blind placebo-controlled crossover study. *Dig Liver Dis* 32:294-301.
- Oswald, I.P., Gazzinelli, R.T., Sher, A., and James, S.L.** 1992. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* 148:3578-3582.
- Otte, J.M., Cario, E., and Podolsky, D.K.** 2004. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126:1054-1070.
- Otte, J.M., and Podolsky, D.K.** 2004. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 286:G613-626.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A.** 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13766-13771.
- Paksoy, M., Ipek, T., Oral, C., Polat, E., and Dogusoy, G.** 1997. The effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on bacterial translocation in the splenectomized rat. *Hepatogastroenterology* 44:411-416.
- Palmblad, J., Malmsten, C.L., Uden, A.M., Radmark, O., Engstedt, L., and Samuelsson, B.** 1981. Leukotriene B4 is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood* 58:658-661.
- Park, S.K., Lin, H.L., and Murphy, S.** 1997. Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF-kappaB binding to DNA. *Biochem J* 322 (Pt 2):609-613.
- Parker R.B.** 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health* 29; 4-8.
- Parks, D.A., and Granger, D.N.** 1983. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 245:G285-289.
- Pathmakanthan, S., Li, C.K., Cowie, J., and Hawkey, C.J.** 2004. *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *J Gastroenterol Hepatol* 19:166-173.
- Pavan, S., Desreumaux, P., and Mercenier, A.** 2003. Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:696-701.
- Payan, D.G., Brewster, D.R., and Goetzl, E.J.** 1983. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol* 131:1613-1615.

- Payan, D.G., Brewster, D.R., Missirian-Bastian, A., and Goetzl, E.J.** 1984. Substance P recognition by a subset of human T lymphocytes. *J Clin Invest* 74:1532-1539.
- Payan, D.G., Levine, J.D., and Goetzl, E.J.** 1984. Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *J Immunol* 132:1601-1604.
- Payne, D., and Kubes, P.** 1993. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol* 265:G189-195.
- Peach, S., Lock, M.R., Katz, D., Todd, I.P., and Tabaqchali, S.** 1978. Mucosal-associated bacterial flora of the intestine in patients with Crohn's disease and in a control group. *Gut* 19:1034-1042.
- Peppercorn, M.A.** 1993. Is there a role for antibiotics as primary therapy in Crohn's ileitis? *J Clin Gastroenterol* 17:235-237.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Aguero, G., and Gobato, N.** 1995. Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 78:1597-1606.
- Perdue, M.H.** 1999. Mucosal immunity and inflammation. III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol* 277:G1-5.
- Perianin, A., Snyderman, R., and Malfroy, B.** 1989. Substance P primes human neutrophil activation: a mechanism for neurological regulation of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 161:520-524.
- Perner, A., Andresen, L., Normark, M., and Rask-Madsen, J.** 2002a. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the normal human colonic epithelium. *Scand J Gastroenterol* 37:944-948.
- Perner, A., Nordgaard, I., Matzen, P., and Rask-Madsen, J.** 2002b. Colonic production of nitric oxide gas in ulcerative colitis, collagenous colitis and uninflamed bowel. *Scand J Gastroenterol* 37:183-188.
- Pfeiffer, C.J., and Qiu, B.S.** 1995. Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on TNB-induced colitis in rats. *J Pharm Pharmacol* 47:827-832.
- Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., and Beck, K.F.** 2001. Regulation of gene expression by nitric oxide. *Pflugers Arch* 442:479-486.
- Pieper, G.M., Clarke, G.A., and Gross, G.J.** 1994. Stimulatory and inhibitory action of nitric oxide donor agents vs. nitrovasodilators on reactive oxygen production by isolated polymorphonuclear leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 269:451-456.
- Pirzer, U., Schonhaar, A., Fleischer, B., Hermann, E., and Meyer zum Buschenfelde, K.H.** 1991. Reactivity of infiltrating T lymphocytes with microbial antigens in Crohn's disease. *Lancet* 338:1238-1239.
- Plein, K., and Hotz, J.** 1993. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea--a pilot study. *Z Gastroenterol* 31:129-134.
- Pollock, J.S., Forstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H., Nakane, M., and Murad, F.** 1991. Purification and characterization of particulate

endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10480-10484.

- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al.** 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
- Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L.B., and Coffman, R.L.** 1994. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1:553-562.
- Prantera, C., Scribano, M.L., Falasco, G., Andreoli, A., and Luzi, C.** 2002. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG. *Gut* 51:405-409.
- Pryor, W.A., and Squadrito, G.L.** 1995. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268:L699-722.
- Pulendran, B., Banchereau, J., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C.** 2001. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 22:41-47.
- Pullman, W.E., Elsbury, S., Kobayashi, M., Hapel, A.J., and Doe, W.F.** 1992. Enhanced mucosal cytokine production in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 102:529-537.
- Purcell, W.M., and Atterwill, C.K.** 1995. Mast cells in neuroimmune function: neurotoxicological and neuropharmacological perspectives. *Neurochem Res* 20:521-532.
- Qu, X.W., Wang, H., De Plaen, I.G., Rozenfeld, R.A., and Hsueh, W.** 2001. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B. *Faseb J* 15:439-446.
- Qureshi, S.T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P., and Malo, D.** 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189:615-625.
- Rachmilewitz, D., Karmeli, F., and Okon, E.** 1995. Sulfhydryl blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase. *Gastroenterology* 109:98-106.
- Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Takabayashi, K., Hayashi, T., Leider-Trejo, L., Lee, J., Leoni, L.M., and Raz, E.** 2002. Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology* 122:1428-1441.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., et al.** 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126:520-528.

- Rachmilewitz, D., Stampler, J.S., Bachwich, D., Karmeli, F., Ackerman, Z., and Podolsky, D.K.** 1995. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 36:718-723.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M., and Moncada, S** 1987. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1482-1489.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M., and Moncada, S** 1990. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5193-5197.
- Ralph, P., Nakoinz, I., Sampson-Johannes, A., Fong, S., Lowe, D., Min, H.Y., and Lin, L.** 1992. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 148:808-814.
- Rao, S.S., Read, N.W., Davison, P.A., Bannister, J.J., and Holdsworth, C.D.** 1987. Anorectal sensitivity and responses to rectal distention in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 93:1270-1275.
- Rao, S.S., Read, N.W., Stobart, J.A., Haynes, W.G., Benjamin, S., and Holdsworth, C.D.** 1988. Anorectal contractility under basal conditions and during rectal infusion of saline in ulcerative colitis. *Gut* 29:769-777.
- Rasic, J.L., and Kurmann, J.A.** 1983. Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. *Experientia Suppl* 39:1-295.
- Rath, H.C., Herfarth, H.H., Ikeda, J.S., Grenther, W.B., Hamm, T.E., Jr., Balish, E., Taurog, J.D., Hammer, R.E., Wilson, K.H., and Sartor, R.B.** 1996. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 98:945-953.
- Rath, H.C., Wilson, K.H., and Sartor, R.B.** 1999. Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67:2969-2974.
- Ravichandran, L.V., Johns, R.A., and Rengasamy, A.** 1995. Direct and reversible inhibition of endothelial nitric oxide synthase by nitric oxide. *Am J Physiol* 268:H2216-2223.
- Raz, A., Wyche, A., Siegel, N., and Needleman, P.** 1988. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *J Biol Chem* 263:3022-3028.
- Redan, J.A., Rush, B.F., Jr., Lysz, T.W., Smith, S., and Machiedo, G.W.** 1990. Organ distribution of gut-derived bacteria caused by bowel manipulation or ischemia. *Am J Surg* 159:85-89; discussion 89-90.
- Reeh, P. W.** 1994 Chemical excitation and sensitisation of nociceptors. In: *Cellular Mechanisms of Sensory Processing*. Eds. Urban L. Berlin: Springer . 119-270.
- Regnault, J.P.** 1988 Cellules de l'immunité. Chapitre 3. In : *Immunologie générale*, Décarie et Vigot, Montréal, 47-93.

- Regoli, D., and Barabe, J.** 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32:1-46.
- Reimund, J.M., Hirth, C., Koehl, C., Baumann, R., and Duclos, B.** 2000. Antioxidant and immune status in active Crohn's disease. A possible relationship. *Clin Nutr* 19:43-48.
- Rembacken, B.J., Snelling, A.M., Hawkey, P.M., Chalmers, D.M., and Axon, A.T.** 1999. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354:635-639.
- Remer, K.A., Brcic, M., and Jungi, T.W.** 2003. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunol Lett* 85:75-80.
- Rengasamy, A., and Johns, R.A.** 1993. Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 44:124-128.
- Resta-Lenert, S., and Barrett, K.E.** 2003. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52:988-997.
- Reuter, B.K., Asfaha, S., Buret, A., Sharkey, K.A., and Wallace, J.L.** 1996. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 98:2076-2085.
- Reuter, G.** 1970. Laktobazillen und eng verwandte Mikorganismen in Fleisch und Fleischereugnissen. *Fleischwirtschaft*; 50: 954-962.
- Ribbons, K.A., Currie, M.G., Connor, J.R., Manning, P.T., Allen, P.C., Didier, P., Ratterree, M.S., Clark, D.A., and Miller, M.J.** 1997. The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase on chronic colitis in the rhesus monkey. *J Pharmacol Exp Ther* 280:1008-1015.
- Roa, I., Henriquez, A., and Latorre, J.J.** 1987. [Hodgkin's disease in children. Morphologic aspects]. *Rev Chil Pediatr* 58:43-47.
- Roberts, P.J., Riley, G.P., Morgan, K., Miller, R., Hunter, J.O., and Middleton, S.J.** 2001. The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon. *J Clin Pathol* 54:293-297.
- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F.** 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:588-593.
- Roediger, W.E., Lawson, M.J., Nance, S.H., and Radcliffe, B.C.** 1986. Detectable colonic nitrite levels in inflammatory bowel disease--mucosal or bacterial malfunction? *Digestion* 35:199-204.
- Rogers, N.E., and Ignarro, L.J.** 1992. Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 189:242-249.
- Rola-Pleszczynski, M., Borgeat, P., and Sirois, P.** 1982. Leukotriene B4 induces human suppressor lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 108:1531-1537.
- Roos, D.** 1992. Neutrophils. In : *Encyclopedia of immunology*, I.M. Roitt and P. J. Delves, eds., Academic Press, London, 1163-1166.

- Rosam, A.C., Wallace, J.L., and Whittle, B.J.** 1986. Potent ulcerogenic actions of platelet-activating factor on the stomach. *Nature* 319:54-56.
- Rouzade, M.L., Anton, P., Fioramonti, J., Garcia-Villar, R., Theodorou, V., and Bueno, L.** 1999. Reduction of the nociceptive response to gastric distension by nitrate ingestion in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 13:1235-1241.
- Ruseler-van Embden, J.G., and Both-Patoir, H.C.** 1983. Anaerobic gram-negative faecal flora in patients with Crohn's disease and healthy subjects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49:125-132.
- Rutgeerts, P., Goboos, K., Peeters, M., Hiele, M., Penninckx, F., Aerts, R., Kerremans, R., and Vantrappen, G.** 1991. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 338:771-774.
- Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J.N., Wynn, T.A., and Murray, P.J.** 2001. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol* 166:2173-2177.
- Saade, N.E., Nasr, I.W., Massaad, C.A., Safieh-Garabedian, B., Jabbur, S.J., and Kanaan, S.A.** 2000. Modulation of ultraviolet-induced hyperalgesia and cytokine upregulation by interleukins 10 and 13. *Br J Pharmacol* 131:1317-1324.
- Saavedra-Delgado, A.M., Turpin, S., and Metcalfe, D.D.** 1984. Typical and atypical mast cells of the rat gastrointestinal system: distribution and correlation with tissue histamine. *Agents Actions* 14:1-7.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A.C. and Horak, I.** 1993. Ulcerative colitis like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75:253-261.
- Safieh-Garabedian, B., Kanaan, S.A., Haddad, J.J., Jaoude, P.A., Jabbur, S.J., and Saade, N.E.** 1997. Involvement of interleukin-1 beta, nerve growth factor and prostaglandin E2 in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 121:1619-1626.
- Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Winter, J., and Woolf, C.J.** 1995. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 115:1265-1275.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., and Rowland, I.** 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80 Suppl 1:S147-171.
- Salminen, S., Isolauri, E., and Onnela, T.** 1995. Gut flora in normal and disordered states. *Chemotherapy* 41 Suppl 1:5-15.
- Salzman, A.L.** 1995. Nitric oxide in the gut. *New Horiz* 3:33-45.
- Salzman, A.L., Eaves-Pyles, T., Linn, S.C., Denenberg, A.G., and Szabo, C.** 1998. Bacterial induction of inducible nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 114:93-102.

- Salzman, A.L., Menconi, M.J., Unno, N., Ezzell, R.M., Casey, D.M., Gonzalez, P.K., and Fink, M.P.** 1995. Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2BBE intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol* 268:G361-373.
- Samel, S., Keese, M., Lanig, S., Kleczka, M., Gretz, N., Hafner, M., Sturm, J., and Post, S.** 2003. Supplementation and inhibition of nitric oxide synthesis influences bacterial transit time during bacterial translocation in rats. *Shock* 19:378-382.
- Sampson, A.P.** 2000. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 30 Suppl 1:22-27.
- Samuelsson, B., and Claesson, H.E.** 1990. Leukotriene B4: biosynthesis and role in lymphocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 20:1-13.
- Sartor, R.B.** 1991. Pathogenetic and clinical relevance of cytokines in inflammatory bowel disease. *Immunol Res* 10:465-471.
- Sartor, R.B.** 1995. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 24:475-507.
- Savage, D.C.** 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 31:107-133.
- Savage, D.C.** 1987. Microorganisms associated with epithelial surfaces and stability of the indigenous gastrointestinal microflora. *Nahrung* 31:383-395.
- Schmid, R.M., and Adler, G.** 2000. NF-kappaB/rel/IkappaB: implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 118:1208-1228.
- Schmidt, H.H., Pollock, J.S., Nakane, M., Gorsky, L.D., Forstermann, U., and Murad, F.** 1991. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:365-369.
- Schmidt, K.N., Amstad, P., Cerutti, P., and Baeuerle, P.A.** 1995. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol* 2:13-22.
- Schrezenmeir, J., and de Vrese, M.** 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73:361S-364S.
- Schultz, M., Veltkamp, C., Dieleman, L.A., Grenther, W.B., Wyrick, P.B., Tonkonogy, S.L., and Sartor, R.B.** 2002. *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 8:71-80.
- Sears, C.L.** 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions V. assault of the tight junction by enteric pathogens. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G1129-1134.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., and Isakson, P.** 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12013-12017.
- Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D.M., and Sartor, R.B.** 1998. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 66:5224-5231.

- Servin, A.L., and Coconnier, M.H.** 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:741-754.
- Shanahan, F.** 2001. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 120:622-635.
- Shanahan, F.** 2002. Crohn's disease. *Lancet* 359:62-69.
- Sheehy, A.M., Burson, M.A., and Black, S.M.** 1998. Nitric oxide exposure inhibits endothelial NOS activity but not gene expression: a role for superoxide. *Am J Physiol* 274:L833-841.
- Sheil, B., McCarthy, J., O'Mahony, L., Bennett, M.W., Ryan, P., Fitzgibbon, J.J., Kiely, B., Collins, J.K., and Shanahan, F.** 2004. Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* 53:694-700.
- Shiba, T., Aiba, Y., Ishikawa, H., Ushiyama, A., Takagi, A., Mine, T., and Koga, Y.** 2003. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol* 47:371-378.
- Shibolet, O., Karmeli, F., Eliakim, R., Swennen, E., Brigidi, P., Gionchetti, P., Campieri, M., Morgenstern, S., and Rachmilewitz, D.** 2002. Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 8:399-406.
- Shroff, K.E., Meslin, K., and Cebra, J.J.** 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* 63:3904-3913.
- Shu, Q., and Gill, H.S.** 2001. A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 189:147-152.
- Sido, B., Hack, V., Hochlehnert, A., Lipps, H., Herfarth, C., and Droge, W.** 1998. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 42:485-492.
- Sies, H.** 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69:965-968.
- Silva, M., Jacobus, N.V., Deneke, C., and Gorbach, S.L.** 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 31:1231-1233.
- Simmonds, N.J., Allen, R.E., Stevens, T.R., Van Someren, R.N., Blake, D.R., and Rampton, D.S.** 1992. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 103:186-196.
- Singer, II, Kawka, D.W., Scott, S., Weidner, J.R., Mumford, R.A., Riehl, T.E., and Stenson, W.F.** 1996. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111:871-885.

- Smith, M.J., Ford-Hutchinson, A.W., and Bray, M.A.** 1980. Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. *J Pharm Pharmacol* 32:517-518.
- Sorrells, D.L., Friend, C., Koltuksuz, U., Courcoulas, A., Boyle, P., Garrett, M., Watkins, S., Rowe, M.I., and Ford, H.R.** 1996. Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge in vivo. *Arch Surg* 131:1155-1163.
- Spiller, R.C., Jenkins, D., Thornley, J.P., Hebden, J.M., Wright, T., Skinner, M., and Neal, K.R.** 2000. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 47:804-811.
- Spirit, M.J.** 1994. Antibiotic in inflammatory bowel disease: new choices for an old disease. *Am J Gastroenterol*. 89:974-978.
- Spitz, J., Yuhan, R., Koutsouris, A., Blatt, C., Alverdy, J., and Hecht, G.** 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function. *Am J Physiol* 268:G374-379.
- St John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H., and Nathan, C.** 2001. Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9901-9906.
- Stagg, A.J., Hart, A.L., Knight, S.C., and Kamm, M.A.** 2003. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 52:1522-1529.
- Stagg, A.J., Hart, A.L., Knight, S.C., and Kamm, M.A.** 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:255-270.
- Stanisz, A.M., Scicchitano, R., Dazin, P., Bienenstock, J., and Payan, D.G.** 1987. Distribution of substance P receptors on murine spleen and Peyer's patch T and B cells. *J Immunol* 139:749-754.
- Stead, R.H., Dixon, M.F., Bramwell, N.H., Riddell, R.H., and Bienenstock, J.** 1989. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* 97:575-585.
- Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryneck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., and Remaut, E.** 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289:1352-1355.
- Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., and Enk, A.H.** 2002. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99:2468-2476.
- Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H.** 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159:4772-4780.
- Stenton, G.R., Vliagoftis, H., and Befus, A.D.** 1998. Role of intestinal mast cells in modulating gastrointestinal pathophysiology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 81:1-11; quiz 12-15.
- Strober, W., Kelsall, B., and Marth, T.** 1998. Oral tolerance. *J Clin Immunol* 18:1-30.

- Stuehr, D.J., Fasehun, O.A., Kwon, N.S., Gross, S.S., Gonzalez, J.A., Levi, R., and Nathan, C.F.** 1991. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J* 5:98-103.
- Sutherland, L., Singleton, J., Sessions, J., Hanauer, S., Krawitt, E., Rankin, G., Summers, R., Mekhjian, H., Greenberger, N., Kelly, M., et al.** 1991. Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* 32:1071-1075.
- Sutherland, R** 1991. Beta-lactamase inhibitors and reversal of antibiotic resistance. *Trends Pharmacol Sci* 12:227-232.
- Suzuki, T., Itoh, K., Kaneko, T., and Suzuki, H.** 1997. Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of a culture condensate of *Bifidobacterium longum*. *J Vet Med Sci* 59:665-669.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., et al.** 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122:44-54.
- Takemura, R., and Werb, Z.** 1984. Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am J Physiol* 246:C1-9.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S.** 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451.
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P.F., and Akira, S.** 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164:554-557.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S.** 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13:933-940.
- Tanaka, A., Mizoguchi, H., Kunikata, T., Miyazawa, T., and Takeuchi, K.** 2001. Protection by constitutively formed nitric oxide of intestinal damage induced by indomethacin in rats. *J Physiol Paris* 95:35-41.
- Tannock, G. W.** 1995 Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body. Chapman & Hall.
- Taurog, J.D., Richardson J.A., Croft, J.T., Simmons, W.A., Zhou, M. Fernandez-Sueiro, J.L., Balish, E. And Hammer, R.E. **1994. The germ-free state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med.* 180:2354-2364.**
- Taylor, B.S., de Vera, M.E., Ganster, R.W., Wang, Q., Shapiro, R.A., Morris, S.M., Jr., Billiar, T.R., and Geller, D.A.** 1998. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 273:15148-15156.

- Tejada-Simon, M.V., Ustunol, Z., and Pestka, J.J.** 1999. Ex vivo effects of lactobacilli, streptococci, and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. *J Food Prot* 62:162-169.
- Theodorides, T. C.**, 1996 The mast cell: a neuroimmunoendocrine master player. *Int J Reac*, XVIII (1), 1-21.
- Tobias, P.S., Soldau, K., and Ulevitch, R.J.** 1986. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 164:777-793.
- Togashi, H., Sasaki, M., Frohman, E., Taira, E., Ratan, R.R., Dawson, T.M., and Dawson, V.L.** 1997. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2676-2680.
- Tracey, D.J., and Walker, J.S.** 1995. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? *Inflamm Res* 44:407-411.
- Travis, S.P., and Jewell, D.P.** 1994. The role of platelet-activating factor in the pathogenesis of gastrointestinal disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 50:105-113.
- Trifileff, A., Fujitani, Y., Mentz, F., Dugas, B., Fuentes, M., and Bertrand, C.** 2000. Inducible nitric oxide synthase inhibitors suppress airway inflammation in mice through down-regulation of chemokine expression. *J Immunol* 165:1526-1533.
- Trivedi, K., Barret K. E. and Resta-Lenert S. C.** 2003. Probiotic inhibition of the entry of enteroinvasive *E. coli* into human intestinal epithelial cells involves both Rho-dependent and -independent pathways. [Abstract] *Gastroenterology*; 793:A106
- Tu, H., Juelich, T., Smith, E.M., Tyring, S.K., Rady, P.L., and Hughes, T.K., Jr.** 2003. Evidence for endogenous interleukin-10 during nociception. *J Neuroimmunol* 139:145-149.
- Ukawa, H., Yamakuni, H., Kato, S., and Takeuchi, K** 1998. Effects of cyclooxygenase-2 selective and nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs on mucosal ulcerogenic and healing responses of the stomach. *Dig Dis Sci* 43:2003-2011.
- Ulisse, S., Gionchetti, P., D'Alo, S., Russo, F.P., Pesce, I., Ricci, G., Rizzello, F., Helwig, U., Cifone, M.G., Campieri, M., et al.** 2001. Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. *Am J Gastroenterol* 96:2691-2699.
- Underdown, B.J., and Schiff, J.M.** 1986. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol* 4:389-417.
- Unno, N., Wang, H., Menconi, M.J., Tytgat, S.H., Larkin, V., Smith, M., Morin, M.J., Chavez, A., Hodin, R.A., and Fink, M.P.** 1997. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 113:1246-1257.
- Vadas, P., Pruzanski, W., Stefanski, E., Ellies, L.G., Aubin, J.E., Sos, A., and Melcher, A** 1991. Extracellular phospholipase A2 secretion is a common effector pathway of interleukin-1 and tumour necrosis factor action. *Immunol Lett* 28:187-193.

- Van de Merwe, J.P., Schroder, A.M., Wensinck, F., and Hazenberg, M.P.** 1988. The obligate anaerobic faecal flora of patients with Crohn's disease and their first-degree relatives. *Scand J Gastroenterol* 23:1125-1131.
- Van der Waaij, L.A., Limburg, P.C., Mesander, G., and van der Waaij, D.** 1996. In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* 38:348-354.
- Vane, J.R., Bakhle, Y.S., and Botting, R.M.** 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120.
- Venturi, A., Gionchetti, P., Rizzello, F., Johansson, R., Zucconi, E., Brigidi, P., Matteuzzi, D., and Campieri, M.** 1999. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 13:1103-1108.
- Verdu, E.F., Bercik, P., Cukrowska, B., Farre-Castany, M.A., Bouzourene, H., Saraga, E., Blum, A.L., Cortesy-Theulaz, I., Tlaskalova-Hogenova, H., and Michetti, P.** 2000. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 120:46-50.
- Videla, S. Vilaseca, J., Guarner, F., Salas, A., Treserra, F., Crespo, E, Antolin, M. and Malagalada, J.** 1994. Role of intestinal microflora in chronic inflammation and ulceration of the rat colon. *Gut*. 35:1090-1097.
- Virag, L., Szabo, E., Gergely, P., and Szabo, C.** 2003. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140-141:113-124.
- Vuckovic, S., Florin, T.H., Khalil, D., Zhang, M.F., Patel, K., Hamilton, I., and Hart, D.N.** 2001. CD40 and CD86 upregulation with divergent CMRF44 expression on blood dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 96:2946-2956.
- Wagner, D.A., Schultz, D.S., Deen, W.M., Young, V.R., and Tannenbaum, S.R.** 1983. Metabolic fate of an oral dose of ¹⁵N-labeled nitrate in humans: effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer Res* 43:1921-1925.
- Wallace, J.L., and Chin, B.C.** 1997. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 214:192-203.
- Wallace, J.L., and Ma, L.** 2001. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:1003-1015.
- Wallace, J.L., and Miller, M.J.** 2000. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 119:512-520.
- Wallace, J.L., Vergnolle, N., Muscara, M.N., Asfaha, S., Chapman, K., McKnight, W., Del Soldato, P., Morelli, A., and Fiorucci, S.** 1999. Enhanced anti-inflammatory effects of a nitric oxide-releasing derivative of mesalamine in rats. *Gastroenterology* 117:557-566.
- Wang, X.D., Parsson, H., Andersson, R., Soltesz, V., Johansson, K., and Bengmark, S.** 1994. Bacterial translocation, intestinal ultrastructure and cell membrane permeability early after major liver resection in the rat. *Br J Surg* 81:579-584.

- Wang, Y. & Marsden P. A.** 1995. Nitric oxide Synthases: Gene Structure and regulation. In : Nitric oxide Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. Murad, F., Academic Press Inc.
- Warner, T.D., de Nucci, G., and Vane, J.R.** 1989. Comparison of the survival of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide within the isolated perfused mesenteric arterial bed of the rat. *Br J Pharmacol* 97:777-782.
- Watkins, L.R., Goehler, L.E., Relton, J., Brewer, M.T., and Maier, S.F.** 1995. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. *Brain Res* 692:244-250.
- Wells, C.L., Maddaus, M.A., Reynolds, C.M., Jechorek, R.P., and Simmons, R.L.** 1987. Role of anaerobic flora in the translocation of aerobic and facultatively anaerobic intestinal bacteria. *Infect Immun* 55:2689-2694.
- Werner-Felmayer, G., Golderer, G., and Werner, E.R.** 2002. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, utilization and pharmacological effects. *Curr Drug Metab* 3:159-173.
- Whitehead, W.E., Crowell, M.D., Davidoff, A.L., Palsson, O.S., and Schuster, M.M.** 1997. Pain from rectal distension in women with irritable bowel syndrome: relationship to sexual abuse. *Dig Dis Sci* 42:796-804.
- Wiest, R., and Rath, H.C. 2003.** Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:397-425.
- Williams, C.S., and DuBois, R.N.** 1996. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 270:G393-400.
- Wingate, D.L.** 1990. Acid reduction and recurrent enteritis. *Lancet* 335:222.
- Wink, D.A., and Mitchell, J.B.** 1998. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25:434-456.
- Wink, D.A., Cook, J.A., Kim, S.Y., Vodovotz, Y., Pacelli, R., Krishna, M.C., Russo, A., Mitchell, J.B., Jourdeuil, D., Miles, A.M., et al.** 1997. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* 272:11147-11151.
- Wink, D.A., Hanbauer, I., Krishna, M.C., DeGraff, W., Gamson, J., and Mitchell, J.B.** 1993. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9813-9817.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L.** 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80:617-653.
- Wolf, G., Arendt, E.K., Pfahler, U., and Hammes, W.P.** 1990. Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products. *Int J Food Microbiol* 10:323-329.
- Wonodi, A and Panigrahi, P.** 2003. Effects of *Lactobacillus plantarum* on Caco-2 cell tight junction proteins after infection with enteric bacteria. [Abstract] *Gastroenterology*; T1073:A479.

- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Mathison, J.C.** 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.
- Wright, S.D., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Ramos, R.A.** 1989. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med* 170:1231-1241.
- Wu, G., and Morris, S.M., Jr.** 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1):1-17.
- Wyatt, J., Vogelsang, H., Hubl, W., Waldhoer, T., and Lochs, H.** 1993. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 341:1437-1439.
- Xie, Q.W., Whisnant, R., and Nathan, C.** 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177:1779-1784.
- Xiong, H., Zhu, C., Li, F., Hegazi, R., He, K., Babyatsky, M., Bauer, A.J., and Plevy, S.E.** 2004. Inhibition of interleukin-12 p40 transcription and NF-kappaB activation by nitric oxide in murine macrophages and dendritic cells. *J Biol Chem* 279:10776-10783.
- Xu, D.Z., Lu, Q., and Deitch, E.A.** 2002. Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function. *Shock* 17:139-145.
- Xu, J. and Verstraete, W.** . 2001. Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56:504-507.
- Yamada, T, Sartor R.B., Marshall, S., Specian R.D. and Grisham M.B.** 1993. Mucosal injury and inflammation in a model of chronic granulomatous colitis in rat. *Gastroenterology* 104:759-771.
- Yue, G., Lai, P.S., Yin, K., Sun, F.F., Nagele, R.G., Liu, X., Linask, K.K., Wang, C., Lin, K.T., and Wong, P.Y.** 2001. Colon epithelial cell death in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis is associated with increased inducible nitric-oxide synthase expression and peroxynitrite production. *J Pharmacol Exp Ther* 297:915-925.
- Zetterstrom, R., Bennet, R., and Nord, K.E.** 1994. Early infant feeding and microecology of the gut. *Acta Paediatr Jpn* 36:562-571.
- Zimmermann, K.C., Sarbia, M., Schror, K., and Weber, A.A.** 1998. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol* 54:536-540.
- Zingarelli, B., Cuzzocrea, S., Szabo, C., and Salzman, A.L.** 1998. Mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 287:1048-1055.

Zingarelli, B., Szabo, C., and Salzman, A.L. 1999. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. *Gut* 45:199-209.

Zoche, M., Beyermann, M., and Koch, K.W. 1997. Introduction of a phosphate at serine741 of the calmodulin-binding domain of the neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) prevents binding of calmodulin. *Biol Chem* 378:851-857.

Résumé

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants dont l'ingestion exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Certains présentent des propriétés immuno-modulatrices et anti-inflammatoires au niveau intestinal chez l'animal et chez l'homme. Toutefois les mécanismes d'action impliqués dans ces effets ne sont pas clairement établis. Par ailleurs, la littérature attribue généralement un rôle anti-inflammatoire au monoxyde d'azote (NO) exogène en particulier dans le cadre de l'inflammation des parties hautes du tube digestif chez l'animal. L'hypothèse de notre travail était qu'un apport exogène de NO dans les parties basses du tube digestif pourrait réduire la sévérité d'une colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) chez le rat. Aussi dans un premier temps nous avons utilisé un donneur chimique du NO, le nitroprussiate de sodium, et mis en évidence son rôle protecteur vis-à-vis de la colite expérimentale. Notre objectif étant d'apporter du NO par une bactérie, nous avons choisi *Lactobacillus farciminis* et montré tout d'abord sa capacité à produire du NO dans la lumière colique *in vivo*. Nous avons ensuite montré que ce lactobacille administré par voie orale réduisait la colite induite par le TNBS et que cet effet anti-inflammatoire était NO-dépendant. De plus, ce traitement de la colite s'est traduit par une diminution de l'expression de l'activité NO synthase inductible, une modulation de la flore endogène, une réduction de la translocation bactérienne, une diminution de la perméabilité paracellulaire colique et une modulation du profil cytokinique de la muqueuse colique. Enfin, nous avons montré qu'un traitement par *L. farciminis* réduisait le nombre de contractions abdominales induites par une distension colo-rectale sans modification du tonus musculaire, tant chez l'animal témoin que chez l'animal traité par le TNBS à travers un mécanisme impliquant le NO.

L'ensemble de nos travaux montre que chez le rat le traitement par *L. farciminis* diminue la sévérité d'une colite induite par le TNBS, ainsi que l'hyperalgésie viscérale d'origine inflammatoire associée et mettent en évidence un mécanisme d'action impliquant le NO.

***Lactobacillus farciminis* a bacteria releasing nitric oxide in the gut : a potential therapeutic agent**

Beneficial effects of probiotic treatments have been reported in experimental colitis as well as in inflammatory bowel diseases in humans. However the mechanisms involved in the anti-inflammatory action of these bacteria are not clearly established. On the other hand, a protective action of exogenous nitric oxide (NO) has been suggested particularly in the upper gut inflammation. We have showed that a chemical NO donor, sodium nitroprusside, improves trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis in rats. Our hypothesis was that a bacteria able to release NO in the gut lumen can reduce the severity of the colitis induced by TNBS and the visceral hyperalgesia associated in response to colo-rectal distension. We have showed the ability of *Lactobacillus farciminis* to release NO in the colonic lumen *in vivo*. Furthermore, *L. farciminis* given orally improves TNBS-induced colitis through a mechanism of action involving NO delivered by this strain. In addition, the anti-inflammatory action of *L. farciminis* involves also a normalization of colonic microflora, a prevention of bacterial translocation, an enhancement of barrier integrity and a decrease of pro-inflammatory cytokine mucosal level. Moreover, we have showed that *L. farciminis* treatment reduces the number of abdominal contractions induced by colo-rectal distension in control and colitic rats through a NO dependent mechanism of action.

Mots clés : *Lactobacillus farciminis*, monoxyde d'azote, inflammation, probiotique, douleur viscérale

Discipline : Sciences Agronomiques

INRA - Unité de Neurogastroentérologie et Nutrition - 180 chemin de Tournefeuille - 31931 TOULOUSE
