



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)*
Discipline ou spécialité : *Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition*

Présentée et soutenue par *Lara MOUSSA*

Le *06 novembre 2012*

Titre : *Effets d'un ingrédient à base de germe de soja (Glycine max (L.) Merrill) fermenté sur l'intégrité de la barrière intestinale et la sensibilité viscérale: mécanismes d'action impliqués*

JURY

*Pr. Hervé Remignon
Dr. Bruno Bonaz
Dr. Guillaume Gourcerol
Dr. Christine Morand
Dr. François Paul
Dr. Eric Houdeau
Dr. Vassilia Théodorou*

*Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Membre invité
Directeur de thèse
Directeur de thèse*

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)*
Unité de recherche : *INRA UMR 1331 Toxalim, Equipe de Neuro-Gastroentérologie & Nutrition*
Directeur(s) de Thèse : *Dr. Vassilia Théodorou et Dr. Eric Houdeau*
Rapporteurs : *Dr Bruno Bonaz et Dr Guillaume Gourcerol*

Cette thèse a été réalisée à l'Unité Toxalim UMR 1331 au sein de l'équipe de Neurogastro-entérologie & Nutrition et a fait l'objet d'une bourse CIFRE cofinancée par GENIBIO et l'ANRT (Association Nationale de Recherche et de Technologie).

Merci à l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

Merci à Monsieur le Docteur Hervé Remignon, professeur à l'INPT, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Un grand merci à Monsieur le Docteur Guillaume Gourcerol (CHU Rouen) et à Monsieur le Docteur Bruno Bonaz (CHU Grenoble) de m'avoir fait l'honneur d'en être les rapporteurs. Je remercie également Madame le Docteur Christine Morand (INRA, Clermont Ferrand) d'avoir accepté de participer à mon comité de thèse, pour apporter de précieux conseils ainsi que d'examiner ce travail.

Merci à Monsieur François Paul Directeur Général de GENIBIO de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer cette thèse. Ses remarques et conseils ont été précieux pour la réalisation de ce travail. Je remercie également Christine Grimaldi pour avoir suivi le démarrage de ce projet.

A Vassilia, un très très grand MERCI ! Pour avoir vraiment cru en moi... pour avoir tout fait pour que j'aie une thèse dans l'équipe... Merci pour tes conseils, tes encouragements, pour m'avoir guidée tout au long de ces 4 années tout en me laissant une grande autonomie. Je n'oublie pas tous les efforts faits pour que je puisse finir ce travail dans des bonnes conditions.

A Eric Houdeau, un grand merci de m'avoir fait découvrir l'univers des estrogènes !! (surtout n'oublie pas de cycler les femelles, est-ce que t'as regardé le cycle ??, les questions habituelles d'Eric ; je t'avoue ça va me manquer !) Merci pour tes compétences au-delà de l'univers des estrogènes, tes remarques et conseils !

Je tiens à remercier monsieur le Docteur Jean Fioramonti de m'avoir accueillie dans son laboratoire lors de mon stage de master.

Merci à monsieur le Docteur Lionel Bueno pour ses compétences scientifiques sans limite, ses critiques et ses conseils.

Hélène, merci pour ta gentillesse, tes conseils et ton soutien.

Merci Raphaël pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Laurent, merci pour ton soutien, ton aide, ton écoute et d'avoir été mon binôme de poubelles même si tu n'étais pas là tout le temps ! Merci pour toutes les soumissions qu'on avait faites ensemble... Ainsi que pour les poubelles radioactives qu'on avait sorties ! Je n'oublierai jamais ce cadeau, être une assistante PCR !!!

Muriel, merci pour toute l'aide concernant les dossiers de soutenance ainsi que les conseils que tu m'avais donnés. Courage dans ta nouvelle vie à Paris ☺...

Alors, t'en es où ? T'as fini d'écrire ? Tu cherches un post-doc ? C'est Christine... Merci pour le soutien et ton intérêt pour mon avenir ! Bonne continuation à la NGN ☺

Merci Afi pour le soutien et les conseils.

Sandrine, merci pour toutes les discussions scientifiques (ou pas)... merci surtout de m'avoir agacée pendant la rédaction et de me faire rappeler qu'il faut que je trouve un post-doc !! N'en parlons pas des bouchons qu'on a eu ensemble... et les tours qu'on avait faits en voiture (surtout pour aller à Auzeville ☺) t'inquiète, tu vas apprendre la carte de Toulouse au bout d'un moment. Et s'il y a quelque chose que j'oublierai jamais, c'est quand je verrai un bélouga, je penserai à toi ☺

Isa, la petite Isa, alors si avec Sandrine j'ai fait des routes, avec toi j'ai fait tout le tour du périph.. Tu te rappelles ? Je me rappelle aussi le jour où j'étais dans ta voiture sur le parking de l'INRA, la voiture marchait seule... moi dedans... et toi qui courait derrière... que des moments rigolos (surtout à la Novela où toute la NGN attendait que le nom OLIVIER passe... en vain). Merci pour toutes les discussions, pour tous les bons moments, pour les encouragements quand il fallait...

Mathilde, merci pour ton aide précieuse surtout au début de mon stage, de m'avoir initiée à la biochimie. C'était vraiment agréable de partager un endroit « étroit » avec toi ☺ ; la prochaine fois, il faut se méfier pour ne pas être coincées dans un endroit si étroit.

Valérie Be, en fait les Bézirard, ou les MaYaVa que vous allez devenir les LaMaYaVa, non ?? Tant qu'à faire ?? déjà quand je parle de chez vous, je dis que c'est chez moi ; vous n'avez qu'à m'adopter et finir avec cette histoire ☺. Merci beaucoup Valérie pour toutes les discussions dans le petit bureau, pour tous les western-blot et surtout de me soutenir et de m'écouter dans les moments où la fin semblait loin et la route longue.

Chez Corinne, le deuxième chez moi (au cas où les Bézirard ne veulent pas de moi ☺) Merci pour ton humour, ton aide pour pouvoir faire des « NICE PAPER », pour les macarons, les bûches, ... bref de nous avoir bien nourris.

Thomas, avec qui j'ai eu de longues discussions et qui a toujours montré de l'enthousiasme et de la curiosité dans ses discours concernant mon pays, le Liban. Je tiens surtout à te remercier pour m'avoir écoutée (car c'est pas évident :P) et encouragée à chercher des postdoc pour partir dans une nouvelle aventure! Surtout continue à faire des plats Libanais....

« Tu vas l'avoir ton papier ! Tu vas l'avoir ta thèse ! Tu vas l'avoir ton post-doc ! » Ce n'est qu'un exemple d'encouragements que m'a apporté Maïwenn. Merci d'être quelqu'un de très aimable et très gentille.

Valérie Ba : La blouse ! la blouuuuuse ! Faut la mettre ! ben ouiii t'as raison, mais il fait très chaud ☺ Merci d'être un bon ACP, pour ton aide précieuse dans tous les abattages, les coupes et colorations et d'avoir pris en charge avec Patrick de me trouver un mari même si la liste est longue ☺

Simona, sacrée Simona, avec toutes les discussions qu'on a faites surtout pendant les 2 dernières années où on était dans le même bureau. Merci pour ton aide scientifique, de m'avoir fait rigoler du fond de mon cœur ! Il y en a des histoires que je n'oublierai pas (surtout que tu ferais analyser tes fécès ailleurs !! c'était la meilleure)

Delphine, merci pour toutes les discussions et les michokos qu'on a partagé pendant ces années... Courage pour la suite, et n'oublie pas de bien ranger les M&Ms par couleur avant de les manger PAR ORDRE !

Mapy, merci pour ta douceur, ta gentillesse, pour tous les échanges que l'on a pu avoir et pour ton soutien; nos thèses sont pour ainsi dire «complémentaires ». Merci de m'avoir supportée pendant l'avion à Lyon, et pendant notre séjour à Talloire ☺

Christel, merci de m'avoir initiée aux techniques de l'histologie et d'immunohistochimie. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes conseils.

Merci Vincent pour ta disponibilité et ton aide quand j'avais besoin ! Même les jours où on s'était disputé, ça finissait toujours bien ☺

Mme Barostat, Cathy, merci pour ta disponibilité et ton écoute quand ça n'allait pas ainsi que pour tous les moments agréables et les discussions dans ton petit bureau.

Merci à Valérie T pour le temps consacré à me former au début de ma thèse aux minihuit et pour toutes les explications concernant l'expé animale. « Punaise », c'était des bons moments !

Cherryl, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton soutien. J'ai vraiment eu le plaisir de te connaître. Qui va rigoler avec moi à voix haute ? ☺

Soraya, merci pour toutes les discussions sur les différentes cultures et religions dans le petit bureau.

Marion et les discussions de tout et de rien... merci de savoir rajouter une touche humoristique quand il en fallait pour égayer mes journées parfois longues et fatigantes.

Sans oublier Ambre avec qui nos discussions portaient souvent sur tout et n'importe quoi! J'espère que tu trouveras une solution pour « hepaticus free » avant que tu finisses ta thèse. Courage pour la suite.

Nabila, toujours discrète ! Merci de m'avoir supportée quand je mettais la clim... J'espère que la personne qui prendra ma place n'aura pas chaud l'été!! Bonne continuation !

Eric Gaultier, merci pour tous les conseils surtout sur le fonctionnement du barostat (nouveau) et du powerlab... t'es le meilleur technicien ! (en fait, il y a pas d'autres :P)

Merci à Jojo, Mme Fraysse et Sarah pour m'avoir aidée à gérer tout le côté administratif et les petits besoins au quotidien.

Marcel, merci pour avoir été toujours ta préférée ☺

Jean-Pierre, merci pour toutes les discussions et les rigolades à la cantine ou à la pause café.

Patrice, merci de t'occuper de mes rats à l'animalerie, pour ta gentillesse et ton humeur.

Orsi, j'espère que tu trouveras une solution pour évaluer la perméa de tes souris !! Bon courage pour la suite.

Merci aux « anciennes » ! Anita, Marta et Viorica pour les échanges que j'ai pu avoir avec vous, votre soutien et votre gentillesse.

Merci à mes amis Libanais qui m'ont soutenue tout au long de cette expérience : Ado, Assia, Fadia, Hani, Gass, Khillo, Mado, Ramroum et Zeina, vous êtes « ma famille Française ». Merci pour vos encouragements et les bons moments passés ensemble.

Enfin, merci à mes parents, mes frères et sœurs pour être là en permanence pour moi malgré la distance. Merci pour le réconfort que vous m'apportez et pour le regard que vous posez sur moi.

PUBLICATIONS

Lara Moussa, Valérie Bézirard, Christel Salvador-Cartier, Valérie Bacquié, Eric Houdeau and Vassilia Théodorou. A new soy germ fermented ingredient displays estrogenic and protease inhibitor activities able to prevent irritable bowel syndrome-like symptoms in stressed female rats (*Clinical Nutrition*, 2012).

Lara Moussa, Valérie Bézirard, Christel Salvador-Cartier, Valérie Bacquié, Corinne Lencina, Mathilde Lévêque, Sandrine Ménard, Vassilia Théodorou and Eric Houdeau. A low dose of fermented soy germ alleviates gut barrier injury, hyperalgesia and faecal protease activity in a rat model of inflammatory bowel disease (*en révision dans Plos One*).

PRÉSENTATIONS ORALES

Lara Moussa, Christine Grimaldi, François Paul, Viorica Braniste, Valérie Tondereau, Hélène Eutamène, Lionel Bueno, Jean Fioramonti, Eric Houdeau, Vassilia Théodorou. Protective effect of a phytoestrogen-enriched diet on visceral hypersensitivity and intestinal hyperpermeability induced by acute stress in female rats. *Digestive Disease Week, 1-5 Mai 2010, New Orleans, USA*.

Lara Moussa, Christine Grimaldi, François Paul, Viorica Braniste, Valérie Tondereau, Hélène Eutamène, Lionel Bueno, Jean Fioramonti, Eric Houdeau, Vassilia Théodorou. Effets d'un traitement par un ingrédient végétal riche en phytoestrogènes sur l'hypersensibilité viscérale et l'hyperperméabilité intestinale induites par un stress chez le rat femelle. *Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie, 10-11 Juin 2010, Nantes, France*.

Lara Moussa, Valérie Bézirard, Christel Salvador-Cartier, Valérie Bacquié, Corinne Lencina, Sandrine Ménard, Mathilde Lévêque, Vassilia Théodorou, Eric Houdeau. Protective effects of a fermented soy germ ingredient on colitis-induced hyperpermeability, hyperalgesia and protease-activated receptor (PAR)-2 expression in female rats through estrogen receptor dependent and independent signalling pathways. *Symposium Aliment Santé, 18-19 Juillet 2012, Toulouse, France*.

POSTERS

Eric Houdeau, **Lara Moussa**, Viorica Braniste, Mathilde Lévêque, Jean Daydé, Lionel Bueno, Jean Fioramonti, Hélène Eutamène Vassilia Théodorou. Beneficial effects of soy

germ diet on experimental colitis in a rat model of menopause : involvement of oestrogenic activity. *United European Gastroenterology Week, 18-22 Octobre 2008, Vienna, Austria.*

Lara Moussa, Christine Grimaldi, François Paul, Viorica Braniste, Valérie Tondereau, Hélène Eutamène, Lionel Bueno, Jean Fioramonti, Eric Houdeau, Vassilia Théodorou. Effets d'un traitement par un ingrédient végétal riche en phytoestrogènes sur l'hypersensibilité viscérale et l'hyperperméabilité intestinale induites par un stress chez le rat femelle. *Les Journées Francophones d'Hépatho-gastroentérologie et d'Oncologie Digestive, 25-28 Mars 2010, Paris, France.*

Lara Moussa, Christine Grimaldi, François Paul, Viorica Braniste, Valérie Tondereau, Hélène Eutamène, Lionel Bueno, Jean Fioramonti, Eric Houdeau, Vassilia Théodorou. Protective effect of a phytoestrogen-enriched diet on the increase in visceral sensitivity and intestinal permeability induced by acute stress in female rats. *United European Gastroenterology Week, 23-27 Octobre 2010, Barcelona, Spain.*

Lara Moussa, Christel Salvador-Cartier, Valérie Bézirard, Mathilde Lévêque, Valérie Bacquié, Eric Houdeau, Vassilia Théodorou. Effets préventifs d'un traitement par du germe de soja fermenté sur les altérations de la perméabilité intestinale et l'hypersensibilité viscérale induites par une colite expérimentale chez le rat femelle : implication des récepteurs aux estrogènes. *Les Journées Francophones d'Hépatho-gastroentérologie et d'Oncologie Digestive, 15-18 Mars 2012, Paris, France.*

Lara Moussa, Christel Salvador-Cartier, Valérie Bézirard, Valérie Bacquié, Corinne Lencina, Sandrine Ménard, Mathilde Lévêque, Vassilia Théodorou, Eric Houdeau. Protective effects of a treatment by a soy germ fermented ingredient on colonic inflammation-associated hyperpermeability and hyperalgesia in female rats: involvement of estrogen receptors. *. Digestive Disease Week, 20-22 Mai 2012, San Diego, USA.*

RÉSUMÉ

La barrière intestinale est la plus grande surface de contact entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Outre ses fonctions d'absorption des nutriments, elle exerce un rôle important de défense contre les agents indésirables (toxines, bactéries) contenus dans la lumière intestinale. Une augmentation de la perméabilité intestinale a été observée chez les patients atteints du syndrome de l'intestin irritable (SII) ou des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Cette hyperperméabilité intestinale est contemporaine d'une hypersensibilité viscérale à la distension de la paroi intestinale. Des travaux récents rapportent également une augmentation de l'activité protéolytique du contenu intestinal dans le cadre de ces deux pathologies.

Les estrogènes, par leurs propriétés anti-inflammatoires et leur capacité à moduler la perméabilité intestinale par activation de leurs récepteurs (REs) peuvent contribuer à l'amélioration des symptômes associés à ces pathologies digestives. Une variété de traitements médicaux a été utilisée pour la prise en charge thérapeutique du SII et de MICI. Cependant, les patients questionnent les cliniciens sur des conseils diététiques susceptibles d'améliorer leur qualité de vie. Ainsi, l'objectif de ce travail était d'évaluer les effets et les mécanismes d'action impliqués, d'un traitement par du germe de soja fermenté (SG) sur l'hyperalgésie viscérale et l'hyperperméabilité intestinale dans des modèles animaux mimant le SII et les MICI afin de proposer des futures allégations santé à ce produit. Le rationnel de l'évaluation de cet ingrédient était basé sur sa composition intéressante, à savoir, sa teneur en composés à propriétés estrogéniques (isoflavones) et sa capacité à inhiber les protéases (BBI).

Dans un premier temps, nous avons montré qu'un traitement oral de 15 jours par le SG diminue de façon significative l'hypersensibilité viscérale, l'hyperperméabilité intestinale ainsi que l'augmentation de l'activité protéolytique induites par un stress de contrainte chez le rat. La diminution de la perméabilité intestinale implique une surexpression de l'occludine, protéine des jonctions serrées. De même, le traitement par du SG réduit la densité des mastocytes au niveau du côlon. Tous les effets préventifs du SG sauf ceux sur l'activité protéolytique sont estrogéno-dépendants car bloqués par l'antagoniste des REs.

Dans un second temps, nous avons montré qu'un traitement préventif par le SG pendant 15 jours présente des effets protecteurs vis-à-vis d'une inflammation intestinale induite par du TNBS. Le SG atténue la sévérité de l'inflammation, l'hyperperméabilité, l'hypersensibilité et l'augmentation de l'activité protéolytique induites par la colite. Les effets

anti-inflammatoires du SG sont à la fois dépendants des phytoestrogènes et du contenu de l'ingrédient en BBI.

En conclusion, ces données sont prometteuses pour une future utilisation du SG dans la gestion thérapeutique du SII et des MICI comme traitement adjuvant.

ABSTRACT

The intestinal barrier is the largest area of contact between the external environment and internal environment. In addition to its function of nutrient absorption, the intestinal barrier plays a key role of defense against noxious agents (toxins, bacteria) contained in the intestinal lumen. An increase in intestinal permeability was observed in patients with irritable bowel syndrome (IBS) or inflammatory bowel disease (IBD). This intestinal hyperpermeability was often associated with visceral hypersensitivity to colorectal distension. Recent studies also report an increase in the proteolytic activity in patients with IBS or IBD.

Estrogens, through their anti-inflammatory properties and their ability to modulate intestinal permeability by activating estrogen receptors (ERs), can play an important role in these digestive diseases. A variety of medical therapies have been used for treatment of IBS and IBD. However, patients question clinicians about dietary suggestions to improve their symptoms and quality of life. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects and mechanisms of action involved of a treatment with fermented soy germ (SG) on visceral hyperalgesia, intestinal hyperpermeability in animal models mimicking the IBS and IBD. The evaluation of this ingredient was based on its interesting composition, i.e its content of isoflavones and a family of serine protease inhibitors known as BBI.

Initially, we demonstrated that an oral treatment of 15 days by SG significantly reduces visceral hypersensitivity, intestinal hyperpermeability and increased proteolytic activity induced by acute stress in the rat. Decreased intestinal permeability is due to overexpression of occludin, a transmembrane tight junction protein. Similarly, treatment with SG reduces the density of colonic mast cells. All preventive effects of SG except those on the proteolytic activity are estrogen-dependent because blocked by the antagonist of ERs.

In a second step, we demonstrated that a treatment for 15 days with SG induces protective effects against intestinal inflammation induced by TNBS. SG reduces the severity of colitis, decreases TNBS-induced hyperpermeability, hypersensitivity and increased proteolytic activity. The anti-inflammatory effects of SG are estrogen and/or BBI-dependent.

In conclusion, these data are promising for future use of the SG as adjuvant therapy in IBS and IBD management.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	6
PRINCIPALES ABREVIATIONS	7
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	9
CHAPITRE I LA BARRIERE INTESTINALE	10
1. Introduction	10
2. La barrière mécanique	11
3. La barrière écologique	11
4. La barrière physique ou épithéliale	13
4.1. Les cellules différenciées	13
4.1.1. Les entérocytes	13
4.1.2. Les cellules calciformes	13
4.1.3. Les cellules entéroendocrines	14
4.1.4. Les cellules de Paneth	14
4.1.5. Les cellules M (microfold cells)	14
4.2. Les jonctions intercellulaires	14
4.2.1. Les jonctions serrées	15
4.2.2. Les jonctions adhérentes	17
4.2.3. Les desmosomes	17
4.3. Voies de passage des molécules	17
4.3.1. Transport transcellulaire passif	17
4.3.2. Transport transcellulaire médié par un transporteur	18
4.3.3. Transport par transcytose	18
4.3.4. Transport paracellulaire passif	19
5. La barrière immunologique	19

5.1.	Les organes de l'immunité.....	19
5.2.	Les cellules de l'immunité.....	20
5.2.1.	L'immunité innée.....	20
5.2.1.1.	Les TLRs.....	21
5.2.1.2.	Les cellules dendritiques.....	23
5.2.1.3.	Les polynucléaires.....	23
5.2.1.4.	Les macrophages.....	24
5.2.1.5.	Les mastocytes.....	25
5.2.2.	L'immunité acquise.....	26
5.2.2.1.	Les lymphocytes B.....	26
5.2.2.2.	Les lymphocytes T.....	27
6.	Existe-t-il un lien entre la barrière intestinale épithéliale et l'immunité de la muqueuse digestive ?.....	28
CHAPITRE II LA DOULEUR VISCERALE.....		30
1.	Définition.....	30
2.	Propriétés de la douleur viscérale.....	30
3.	Les récepteurs de la douleur viscérale.....	31
4.	Neuromédiateurs de la nociception.....	32
5.	Voies de transmission de la douleur.....	33
CHAPITRE III STRESS, SENSIBILITE VISCERALE ET PERMEABILITE		
INTESTINALE.....		36
1.	Définition.....	36
2.	Stress et axe HPA.....	36
3.	Effets du stress sur la sensibilité viscérale.....	37
4.	Effets du stress sur la perméabilité intestinale.....	39
CHAPITRE IV ALTERATIONS DE LA BARRIERE INTESTINALE : PERTINENCE		
PHYSIOPATHOLOGIQUE.....		41

1. Le syndrome de l'intestin irritable	41
1.1. Introduction	41
1.2. Mécanismes physiopathologiques	41
1.3. Troubles psychologiques et SII	44
2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	45
2.1. Introduction	45
2.2. Mécanismes physiopathologiques	45
2.3. Stress psychologique et MICI	47
CHAPITRE V LES ESTROGENES – DE LA BIOSYNTHESE À LEUR FONCTION... 48	
1. Introduction	48
2. Les récepteurs aux estrogènes.....	49
3. Rôle des estrogènes dans la physiopathologie intestinale	51
3.1. Les estrogènes et l'intégrité de la barrière intestinale	51
3.2. Les estrogènes et la douleur viscérale.....	52
3.3. Les estrogènes et le système immunitaire	53
3.4. Les estrogènes et le stress	55
3.5. Les estrogènes et les pathologies intestinales.....	56
CHAPITRE VI LE GERME DE SOJA FERMENTE - UN INGREDIENT INNOVANT 58	
1. Introduction	58
2. Les isoflavones	60
2.1. Estimation des apports en isoflavones dans diverses populations	61
2.2. Biodisponibilité des isoflavones.....	61
2.3. Interaction avec les récepteurs aux estrogènes	63
2.4. Effets des isoflavones sur les cellules épithéliales intestinales, les jonctions serrées et la réponse immunitaire	64
2.5. Mécanismes d'action	65
3. Les inhibiteurs de protéases	67
4. Influence de la fermentation sur la composition du germe de soja	68
OBJECTIFS DE LA THÈSE	71

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	73
A NEW SOY GERM FERMENTED INGREDIENT DISPLAYS ESTROGENIC AND PROTEASE INHIBITOR ACTIVITIES ABLE TO PREVENT IRRITABLE BOWEL SYNDROME-LIKE SYMPTOMS IN STRESSED FEMALE RATS	74
A LOW DOSE OF FERMENTED SOY GERM ALLEVIATES GUT BARRIER INJURY, HYPERALGESIA AND FAECAL PROTEASE ACTIVITY IN A RAT MODEL OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE	76
DISCUSSION GÉNÉRALE	78
CONCLUSIONS	92
RÉFÉRENCES.....	96

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1. Eléments composants la barrière intestinale.</i>	10
<i>Figure 2. Composition de la microflore intestinale humaine.</i>	12
<i>Figure 3. Les cellules épithéliales différenciées de l'intestin grêle.</i>	13
<i>Figure 4. Schéma des différents complexes de jonctions intercellulaires intestinales.</i>	15
<i>Figure 5. Représentation schématique des jonctions serrées</i>	15
<i>Figure 6. Schéma des différentes voies de passage possible des substances actives à travers l'épithélium intestinal.</i>	18
<i>Figure 7. Description schématique générale du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale.</i>	20
<i>Figure 8. Les TLRs : activation de la voie NFκB.</i>	22
<i>Figure 9. Rôle du mastocyte muqueux</i>	25
<i>Figure 10. La réponse B thymo-dépendante.</i>	27
<i>Figure 11. La différenciation des lymphocytes auxiliaires.</i>	28
<i>Figure 12. Interaction entre le système immunitaire et la régulation de la barrière intestinale.</i>	29
<i>Figure 13. Relation entre intensité et sensation.</i>	31
<i>Figure 14. Substances algogènes impliquées dans l'activation/sensibilisation des nocicepteurs.</i>	33
<i>Figure 15. Voies de la douleur : voies spinothalamiques latérale et médiane</i>	34
<i>Figure 16. Représentation schématique des voies nouvellement décrites : les faisceaux spino-parabrachio-amygdalien, spino-parabrachio-hypothalamique et spino-hypothalamique.</i>	35
<i>Figure 17. Modèle multifactoriel proposé pour expliquer la douleur au cours du SII.</i>	42
<i>Figure 18. La structure des récepteurs estrogéniques.</i>	49
<i>Figure 19. Variations de la douleur abdominale au cours du cycle menstruel chez les patientes souffrantes du SII</i>	57
<i>Figure 20. Description macroscopique de la graine de soja</i>	59
<i>Figure 21. Comparaison structurale des phytoestrogènes du soja et du 17-β-estradiol.</i>	60
<i>Figure 22. Biotransformation des isoflavones.</i>	63
<i>Figure 23. Mécanismes d'action impliqués dans les effets de la génistéine sur la fonction de la barrière intestinale.</i>	66
<i>Figure 24. Structure du BBI.</i>	67
<i>Figure 25. Mécanisme de libération du maltol en milieu acide.</i>	70

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1. Ligands endogènes et exogènes des TLRs</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 2. Distribution tissulaire des isoformes des REs chez l'Homme et les Rongeurs.....</i>	<i>50</i>
<i>Tableau 3. Influence d'un procédé de fermentation lactique sur la composition du germe de soja.</i>	<i>69</i>

PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

ACTH	AdrenoCorticoTropin Hormone
BBI	Bowman Birk Inhibitor
CD	Cellule Dendritique
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRF	Corticotropin Releasing Factor
DCR	Distension ColoRectale
DNBS	DiNitroBenzene Sulfonique
DSS	Dextran Sulfate de Sodium
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
HPA	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal
IL	Interleukin
INF γ	Interféron γ
JAM	Junctional Adhesion Molecule
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MLCK	Myosine Light-Chain Kinase
MPO	MyéloPerOxidase
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natural Killer
PAR	Proteinase-activated receptor
RCH	RectoColite Hemorragique
RE	Récepteurs aux Estrogènes
SII	Syndrome de l'Intestin Irritable

SP	Substance P
TGF β	Transforming Growth Factor β
TLR	Toll-Like Receptor
TNBS	2,4,6-TriNitroBenzene Sulfonique
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
VIP	Vaso-Intestinal Peptide
ZO	Zonula Occludens

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

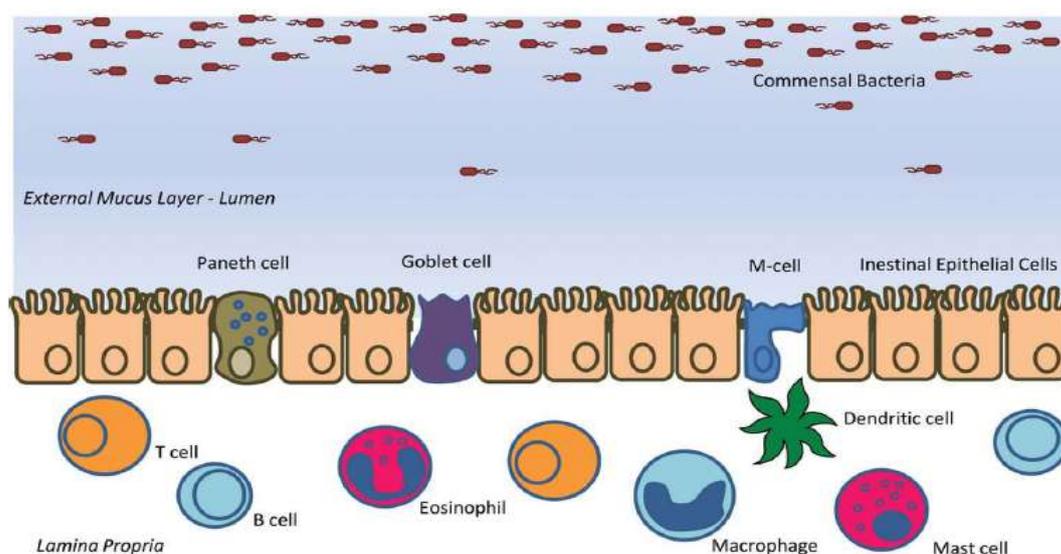
CHAPITRE I

LA BARRIÈRE INTESTINALE

1. Introduction

La muqueuse intestinale représente la plus grande surface d'échange de l'organisme avec le milieu extérieur. L'intestin grêle mesure 4 à 7 m chez l'homme. Les parois sont recouvertes de plis circulaires, de villosités et de microvillosités formant la bordure en brosse, ce qui lui confère une surface d'échange avec la lumière de 400 m² en moyenne. Cette large surface joue un rôle de filtre, avec une perméabilité sélective qui permet le passage des nutriments depuis la lumière intestinale jusqu'à la circulation générale tout en assurant un rôle de barrière, qui prévient la pénétration dans l'organisme des microorganismes, des virus, des antigènes et des toxines, contenus en grande quantité dans la lumière intestinale (Salim & Soderholm, 2011).

La barrière intestinale est une barrière de défense organisée en quatre unités fonctionnelles : 1) la barrière mécanique, correspondant au transit intestinal 2) la barrière écologique, correspondant à la flore intestinale, 3) la barrière physique (ou barrière épithéliale), composée des cellules de l'épithélium et de leurs sécrétions et 4) la barrière immunologique, comprenant les cellules immunitaires et leurs sécrétions (immunoglobulines, cytokines,...) (*Figure 1*). Ces unités fonctionnelles entretiennent entre elles des relations permanentes, étroites et finement régulées, assurant le maintien de l'homéostasie générale de l'organisme (Salim & Soderholm, 2011).



*Figure 1. Éléments composants la barrière intestinale.
(Salim & Soderholm, 2011)*

2. La barrière mécanique

Les mouvements péristaltiques intestinaux constituent une barrière très efficace pour limiter la pénétration des bactéries intestinales dans l'organisme. Ces mouvements de propulsion du bol alimentaire préviennent la prolifération des bactéries dans l'intestin de même que leur translocation à travers la muqueuse intestinale (Nieuwenhuijs *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 2000).

3. La barrière écologique

Le nombre de souches différentes au sein du microbiote (auparavant appelé flore intestinale) est estimé entre 300 et 500 (Simon & Gorbach, 1984), dont seulement 30 à 40 espèces représentent 90% de la flore. Certaines des bactéries du microbiote sont des pathogènes ou des pathogènes opportunistes. La composition du microbiote varie en fonction de l'espèce animale et de son alimentation (Drasar & Barrow, 1985). Chez un individu donné, il existe également des variations quantitatives et qualitatives en fonction de la région intestinale (Drasar, 1974). Si l'on exclut la bouche, directement en contact avec le milieu extérieur, les populations bactériennes présentes dans la lumière du tube digestif augmentent progressivement de l'estomac jusqu'aux selles (*Figure 2*). Dans les parties hautes du tube digestif, cette flore est majoritairement représentée par des bactéries aérobies et quelques anaérobies, en particulier les entérocoques. A l'inverse, le côlon héberge une flore essentiellement anaérobie, avec une densité très élevée de 10^{10} à 10^{12} UFC par gramme de contenu intestinal. Les bactéries anaérobies comme les *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus* appartiennent communément à la flore dominante de plusieurs espèces animales. Le temps de transit lent au niveau du côlon offre une niche écologique favorable à ces bactéries et leur permet d'y établir des populations stables. Les bactéries commensales sont indispensables au bon fonctionnement du système digestif. Elles modulent l'expression de gènes impliqués dans l'absorption des nutriments, renforcent la barrière muqueuse et participent au métabolisme des xénobiotiques, à l'angiogenèse et à la maturation intestinale post-natale (Guarner & Malagelada, 2003).

La flore bactérienne participe activement à l'établissement et au maintien de la fonction de barrière en interagissant avec d'autres entités comme la barrière physique et immunitaire. L'utilisation de modèles animaux axéniques ou gnotoxéniques (animaux axéniques inoculés avec des souches bactériennes connues) a permis de réaliser des progrès considérables dans l'étude des fonctions de la flore du tube digestif (Raibaud *et al.*, 1980;

Romond *et al.*, 1990). Des études menées sur des animaux axéniques ont montré que la flore commensale était indispensable au bon développement et à la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Hooper *et al.*, 2001; Artis, 2008).

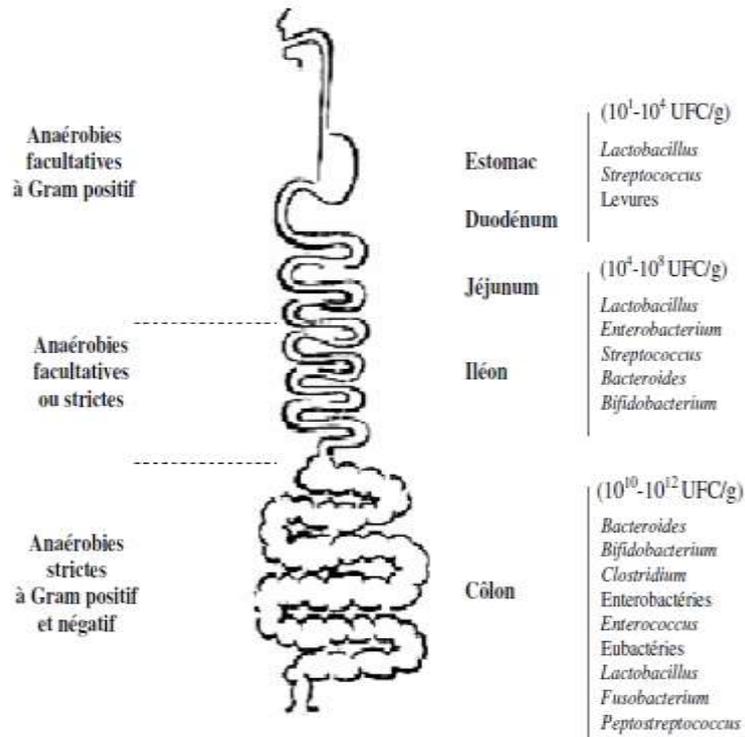


Figure 2. Composition de la microflore intestinale humaine (Holzapfel *et al.*, 1998)

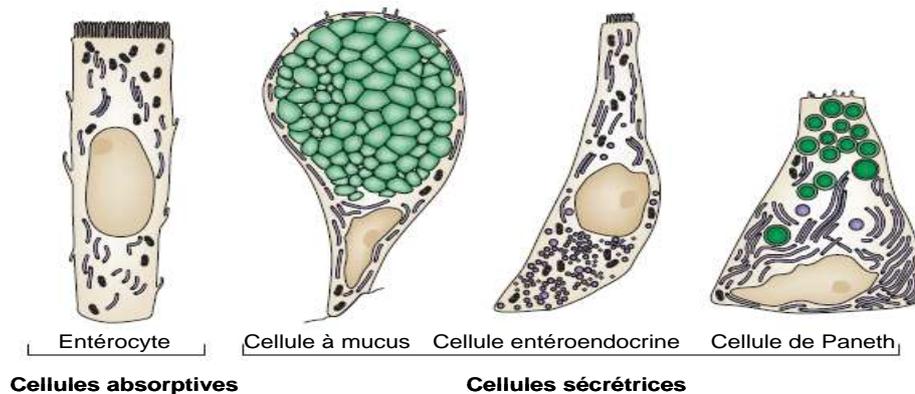
Une autre fonction importante exercée par la flore intestinale est la maturation et la stimulation du système immunitaire de l'hôte. Le système immunitaire local associé à la muqueuse digestive ainsi que le système immunitaire général sont fortement stimulés ou parfois inhibés par certaines bactéries de la flore du tube digestif. Plusieurs études ont montré que la flore intestinale stimule l'activité phagocytaire (Nicaise *et al.*, 1993), la sécrétion des cytokines par les macrophages (Nicaise *et al.*, 1999) ainsi que les lymphocytes intraépithéliaux (Bandeira *et al.*, 1990). L'importance de la flore commensale dans le bon développement du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT : *gut-associated lymphoid tissue*) a également été démontrée (Umesaki & Setoyama, 2000; Strauch *et al.*, 2005). Les bactéries de la flore intestinale modulent donc l'activité du système immunitaire de façon à établir la tolérance de l'hôte à leur égard et éviter une réponse contraire à leur implantation. Cette interaction entre le système immunitaire muqueux et le microbiote maintient cette

muqueuse dans un état « d'inflammation physiologique » contrôlée (Berg & Savage, 1975; Shroff *et al.*, 1995).

4. La barrière physique ou épithéliale

4.1. Les cellules différenciées

L'épithélium intestinal est une barrière protégeant l'organisme des agents potentiellement délétères présents dans la lumière intestinale. Il est constitué par un ensemble de cellules hautement différenciées et hautement spécialisées (*Figure 3*), en renouvellement constant et présentant une polarité structurale et fonctionnelle.



*Figure 3. Les cellules épithéliales différenciées de l'intestin grêle.
(Crosnier et al., 2006)*

4.1.1. Les entérocytes

Les entérocytes représentent 80% de la population cellulaire totale de l'épithélium intestinal. Ce sont des cellules hautement polarisées et hautement spécialisées, qui assurent l'absorption, le métabolisme et le transfert des nutriments, depuis la lumière intestinale jusqu'à la circulation sanguine (veine porte). Elles contrôlent les échanges entre le milieu extérieur et le milieu intérieur, et en particulier l'absorption des nutriments grâce à la présence d'une bordure en brosse spécialisée faisant face à la lumière intestinale.

4.1.2. Les cellules caliciformes

Egalement appelées cellules à mucus ou cellules en gobelet, elles sécrètent des mucines qui protègent l'épithélium contre les enzymes intraluminales. Les cellules caliciformes sont plus nombreuses au niveau du jéjunum et l'iléon et deviennent moins nombreuses au niveau de l'épithélium colique (15% des cellules épithéliales). Elles sécrètent

en continu un mucus dont le rôle premier est de faciliter le glissement et la protection face aux ingesta progressant dans la lumière.

4.1.3. Les cellules entéroendocrines

Disséminées le long de l'épithélium intestinal, elles représentent seulement 1% des cellules épithéliales. Elles sont spécialisées dans la synthèse et la sécrétion d'amines (sérotonine) et de polypeptides biologiquement actifs (par exemple la somatostatine, la substance P).

4.1.4. Les cellules de Paneth

Elles assurent la défense non spécifique contre les microorganismes dans l'intestin. Lors de l'exposition à des bactéries ou à des antigènes microbiens, les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens comme les défensines dans la lumière. Ces cellules ne sont pas retrouvées en condition physiologique au niveau du côlon.

4.1.5. Les cellules M (microfold cells)

Situées dans l'épithélium intestinal au niveau des plaques de Peyer, elles incorporent par endocytose les antigènes luminaux puis les transfèrent aux cellules dendritiques qui les présentent aux lymphocytes B.

4.2. Les jonctions intercellulaires

L'épithélium intestinal est polarisé : il présente un pôle apical et un pôle basolatéral. La barrière intestinale permet le maintien de cette polarité principalement grâce à l'établissement de nombreuses jonctions entre les cellules, contrôlant la diffusion des solutés tout en empêchant celle des microorganismes. Ces jonctions intercellulaires sont de trois types différents (*Figure 4*): les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes.

Les jonctions serrées sont situées à la frontière entre le pôle apical et la face latérale de la cellule. Elles permettent ainsi de limiter fortement le passage paracellulaire. Les jonctions adhérentes et les desmosomes sont situés plus vers le pôle basal.

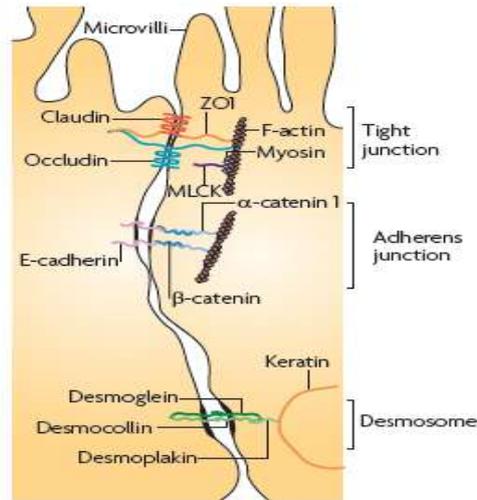


Figure 4. Schéma des différents complexes de jonctions intercellulaires intestinales. (Turner, 2009)

4.2.1. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont des complexes multiprotéiques composés par des protéines transmembranaires (occludine, claudines et JAM (*junction adhesion molecule*)) associées à des protéines de la plaque cytoplasmique (*zonula occludens* ou ZO) (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008). Elles participent aux contacts cellule/cellule existant entre les cellules épithéliales adjacentes (Figure 5).

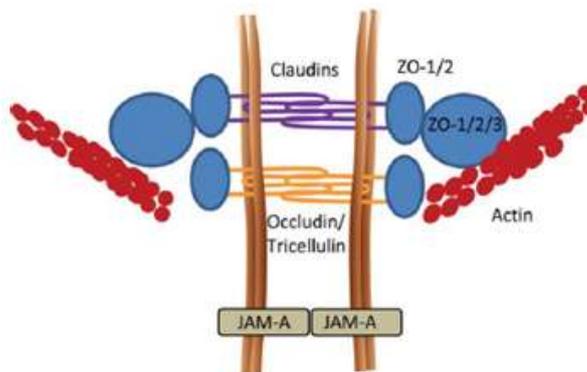


Figure 5. Représentation schématique des jonctions serrées (Salim & Soderholm, 2011)

Les claudines, une famille composée de 24 membres identifiés chez la souris et l'homme, sont constituées de 4 domaines transmembranaires, de deux boucles extracellulaires ainsi que d'un domaine C-terminal cytoplasmique et d'un petit domaine N-terminal également cytoplasmique. Elles servent de point d'appui (ancrage) pour les jonctions serrées. La partie C-terminale est nécessaire à la stabilité des jonctions serrées. Elle contient également un motif

spécifique permettant la liaison à certaines protéines cytoplasmiques, telles que les zonula occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) (Chiba *et al.*, 2008).

Les claudines exercent un rôle primordial dans la sélection des ions pouvant traverser les jonctions serrées. En effet, leur première boucle extracellulaire est responsable de la création de pores paracellulaires permettant de laisser passer les ions entre deux cellules voisines. Ainsi, la claudine-2 constitue des pores laissant passer les cations alors que la claudine-16 ne laisse passer que les ions Mg^{2+} (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008).

L'occludine possède deux boucles extracellulaires ainsi qu'une petite boucle intracellulaire. Ses deux extrémités (N- et C-terminales) sont intra-cytoplasmiques. Le résidu C-terminal intra-cytoplasmique est long et il est fréquemment phosphorylé par différentes protéines kinases. Cette partie est liée avec la ZO-1 qui est elle-même en interaction avec le cytosquelette. Enfin, cette partie riche en résidus sérine, thréonine, et tyrosine, peut être phosphorylée par différentes protéines kinases. Ainsi, les occludines semblent être impliquées dans la transmission de signaux cellulaires. Cependant, leur rôle précis reste encore non entièrement élucidé.

La molécule d'adhésion des jonctions (JAM) est une protéine transmembranaire glycosylée appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Elle est constituée de 2 domaines Ig-like extracellulaires, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal cytoplasmique. On retrouve dans cette famille JAM 1, 2, 3, 4 et JAM-L. JAM 4 est exprimée au niveau des jonctions des cellules épithéliales gastro-intestinales ; JAM 2 est retrouvée sur les cellules endothéliales. JAM 3 est exprimée par les lymphocytes T où elle agit en neutralisant les récepteurs à JAM 1 sur les cellules épithéliales, permettant la transmigration des lymphocytes à travers les jonctions (Arrate *et al.*, 2001). JAM 1 est exprimée dans de nombreux tissus épithéliaux et endothéliaux, comme le placenta, les poumons, le foie, le pancréas, le cœur, le cerveau et l'intestin. On la retrouve également dans les plaquettes, les neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes et les érythrocytes. Dans les cellules épithéliales, on la retrouve au niveau des jonctions serrées. JAM 1 influence de nombreux processus cellulaires comme la régulation de la perméabilité paracellulaire, la polarité cellulaire, l'adhésion et la migration des cellules, l'angiogenèse et la migration leucocytaire.

Les protéines de la famille ZO, jouent un rôle d'adaptateurs moléculaires permettant la liaison de diverses protéines membranaires dont les protéines des jonctions serrées au

cytosquelette d'actine, à des protéines régulatrices ou aux protéines des jonctions adhérentes (Rajasekaran *et al.*, 1996). En effet, les protéines transmembranaires claudines et occludine interagissent directement avec les protéines ZO.

4.2.2. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont situées entre les jonctions serrées et les desmosomes (*Figure 4*). La principale molécule d'adhésion constituant les jonctions adhérentes est la cadhérine. La fonction principale des jonctions adhérentes est la connexion des cellules afin de réguler la formation des tissus lors de la morphogénèse chez l'organisme en développement. Elles jouent également un rôle important dans le maintien des tissus chez l'organisme adulte. Les jonctions adhérentes permettent ainsi un rapprochement étroit mais non serré des cellules adjacentes.

4.2.3. Les desmosomes

Les desmosomes sont des molécules retrouvées ponctuellement et qui connectent les filaments intermédiaires du cytosquelette, entraînant de fortes liaisons entre les cellules et permettant donc le maintien de la proximité cellulaire (*Figure 4*). Les desmosomes sont également des sites majeurs de communication intercellulaire.

4.3. Voies de passage des molécules

Le passage de substances actives à travers la membrane intestinale peut se faire suivant 2 voies principales : la voie paracellulaire qui correspond au passage de la molécule entre deux cellules et la voie transcellulaire qui correspond au passage de la molécule au travers des cellules épithéliales (*Figure 6*). Le passage transcellulaire se décline en plusieurs types: le transport transcellulaire passif, le transport transcellulaire mettant en jeu un transporteur et la transcytose. En revanche dans le cas d'un passage paracellulaire, un seul mécanisme passif existe.

En fonction de leurs caractéristiques physicochimiques, masse moléculaire, solubilité, stabilité chimique, distribution des charges, liaisons hydrogène, pH isoélectrique, caractère hydrophile, les molécules peuvent passer par une des voies mentionnées ci-dessus.

4.3.1. Transport transcellulaire passif

Les substances actives diffusent au sein de la membrane apicale puis traversent l'intérieur de la cellule et passent enfin la membrane basolatérale (*Figure 6*). La voie

transcellulaire est empruntée par des petites molécules, peu chargées (Blanchette *et al.*, 2004) qui ont à la fois une bonne affinité avec la membrane plasmique lipophile et le cytoplasme aqueux de la cellule. Ainsi, un certain nombre de substances lipidiques traverse l'épithélium intestinal selon cette voie. Le passage dépend donc du gradient de concentration de la substance active à travers la membrane cytoplasmique.

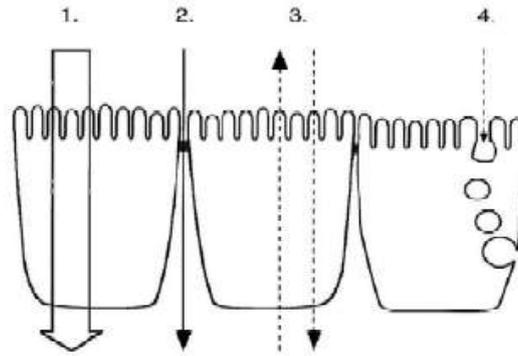


Figure 6. Schéma des différentes voies de passage possible des substances actives à travers l'épithélium intestinal.

(Artursson *et al.*, 2001)

1. transport transcellulaire passif.
2. transport paracellulaire passif.
3. transport transcellulaire actif médié par un transporteur.
4. transport par transcytose.

4.3.2. *Transport transcellulaire médié par un transporteur*

La substance est reconnue par un transporteur présent au niveau de la membrane intestinale (Figure 6). Les substances actives empruntant un transporteur actif sont principalement celles dont la structure chimique présente des similitudes avec celles de nutriments, substrats réels du transporteur. Ces voies de passage sont saturables et très souvent, le transport des molécules les utilisant est réalisé en parallèle par transport passif.

4.3.3. *Transport par transcytose*

La transcytose est une voie de passage de faible capacité pour le transport actif. En effet, elle est considérée comme une voie pouvant favoriser le passage de macromolécules non absorbées par ailleurs, de par leur taille trop importante (Keita & Soderholm, 2010). Cependant, un des inconvénients de cette voie de passage est le fait que les vésicules formées contiennent une quantité importante d'enzymes protéolytiques. Le contenu de ces vésicules

peut soit être acheminé jusqu'au pôle basolatéral de la cellule, soit être digéré à l'intérieur même de la cellule (Blanchette *et al.*, 2004).

4.3.4. Transport paracellulaire passif

Les substances actives traversent l'épithélium en passant entre deux cellules adjacentes (*Figure 6*). Cependant, l'espace existant entre les pores présents au niveau paracellulaire est relativement faible, compris entre 10 Å et 30 à 50 Å (Morishita & Peppas, 2006). Ainsi, le passage par voie paracellulaire est restreint à des molécules de petite taille (c'est à dire de masse moléculaire inférieure à 300 Da) et hydrophiles. En effet, leur hydrophilie limite leur passage par voie transcellulaire passive, car elles ne peuvent se répartir dans la membrane plasmique lipophile.

5. La barrière immunologique

Il s'agit d'un mécanisme de défense spécifique. Pour produire des réponses immunitaires efficaces contre des microorganismes intestinaux potentiellement dangereux ou maintenir sa tolérance vis-à-vis des bactéries commensales ou des protéines alimentaires, le tractus intestinal possède un réseau lymphoïde complexe, responsable du transport des antigènes et de leur présentation aux cellules T dans le tissu intestinal : le GALT (Spahn & Kucharzik, 2004) (*Figure 7*). Le GALT renferme la plus grande quantité de lymphocytes du corps humain (80%), et est également composé de mastocytes (2-5%) et de macrophages (10-15%). Il comprend des plaques de Peyer, des follicules lymphoïdes isolés, des lymphocytes répartis dans la muqueuse et la lamina propria et des lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) (Salminen *et al.*, 1998). Cette muqueuse constitue à la fois le lieu d'absorption des nutriments, mais aussi la première barrière s'opposant à la pénétration dans l'organisme des particules étrangères. Elle est donc un site de communication important entre le milieu intérieur et le milieu extérieur.

5.1. Les organes de l'immunité

Les plaques de Peyer sont des agrégats de follicules lymphoïdes répartis dans la lamina propria tout au long de l'intestin grêle, qui présentent une structure semblable à celle des ganglions lymphatiques périphériques. Une plaque de Peyer est constituée de trois éléments essentiels : les follicules lymphoïdes, la zone inter-folliculaire et l'épithélium associé aux follicules (Kraehenbuhl & Neutra, 1992). Les follicules eux-mêmes contiennent des lymphocytes B, des cellules dendritiques et des macrophages. La zone inter-folliculaire

contient des cellules T, alors que l'épithélium associé au follicule est formé d'entérocytes entre lesquels s'intercalent des cellules M.

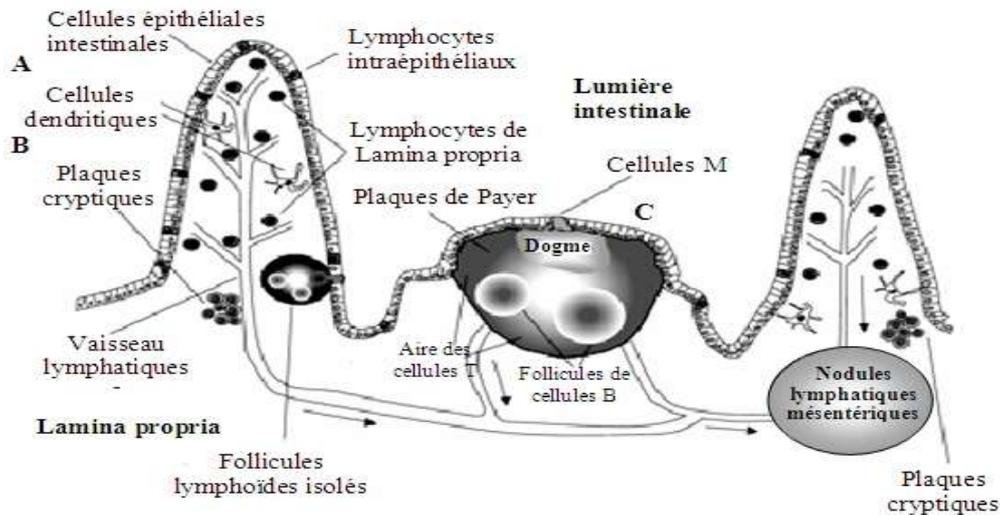


Figure 7. Description schématique générale du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale.

(Spahn & Kucharzik, 2004)

Les follicules lymphoïdes isolés sont anatomiquement comparables aux follicules lymphoïdes des plaques de Peyer. Ils sont présents aussi bien dans l'intestin grêle que dans le côlon. Ils jouent le même rôle que les plaques de Peyer, à savoir l'induction de la réponse immunitaire par présentation des antigènes luminaux aux cellules présentatrices d'antigènes.

5.2. Les cellules de l'immunité

Il existe une immunité innée qui ne dépend pas d'une exposition préalable aux pathogènes, et une immunité spécifique (ou adaptative ou acquise), qui est mise en jeu lors d'une deuxième exposition à un pathogène donné.

Plusieurs types cellulaires sont à l'origine de l'immunité de l'organisme : les lymphocytes, les cellules phagocytaires (macrophages et cellules dendritiques), les mastocytes et polynucléaires.

5.2.1. L'immunité innée

Il s'agit d'une immunité non spécifique, immédiate qui constitue la première ligne de défense de l'organisme ; elle ne fait pas intervenir de notion de mémoire mais elle fait appel à plusieurs processus.

Les récepteurs de l'immunité innée sont dénommés *pattern recognition receptors* (PRR) et reconnaissent des structures communes à des groupes de pathogènes : les *pathogen*

associated molecular pattern (PAMP) (Janeway, 1989). Les PRRs représentent l'ensemble des récepteurs de surfaces « *toll-like receptor* » (TLR) ainsi que les récepteurs intra-cellulaires NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*). Leurs fonctions principales sont de détecter la présence et le type de pathogènes, de déclencher une réponse locale et de stimuler la réponse adaptative.

5.2.1.1. Les TLRs

Les TLRs sont des récepteurs cellulaires qui existent chez l'homme et les mammifères et sont homologues au produit du gène de drosophile *Toll*. Le premier TLR identifié chez les mammifères a été le TLR4 en 1997 (Medzhitov *et al.*, 1997; Poltorak *et al.*, 1998). Actuellement 11 TLR sont identifiés chez l'homme : TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11 (Akira *et al.*, 2006). Les TLRs se trouvent sur des cellules immunes : macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T, neutrophiles, cellules *natural killer* (NK), monocytes, éosinophiles et sur des cellules non immunes : fibroblastes, cellules épithéliales des tractus intestinal, respiratoire et urogénital (Iwasaki & Medzhitov, 2004). Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 et TLR11 sont exprimés sur la membrane des cellules alors que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont sur l'endosome (Kanzler *et al.*, 2007).

L'activation des TLRs est initiée par leur liaison à des molécules ligands composants de microorganismes, les PAMPs. La découverte de molécules endogènes similaires aux PAMPs, les DAMPs (ligands endogènes), pourrait expliquer l'intervention des TLRs dans la physiopathologie de certaines maladies (*Tableau 1*).

Les TLRs induisent l'expression de gènes très variés, incluant des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, des chémokines, des facteurs antimicrobiens, des molécules de co-stimulation à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, des molécules du CMH (*Complexe Majeur d'Histocompatibilité*). Les voies de signalisation des TLRs sont complexes et entraînent différentes réponses biologiques. Après activation des TLRs, une cascade de signaux intracellulaires conduit à la translocation nucléaire de NF- κ B et entraîne la transcription de gènes modulant l'expression de cytokines pro-inflammatoires (*Figure 8*).

TLR	PAMP	DAMPS
TLR1	Lipopeptides des mycobactéries	β -défensines humaines (hBD)
TLR2	Lipoprotéines des bactéries Peptidoglycane des bactéries Gram positif acide lipotéichoïque (LTA) des streptocoques B Porines des Neisseria Lipoarabinomannane des mycobactéries Zymozan des <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Phospholipomannane des <i>Candida albicans</i> Glucuronoxylomannane des <i>Cryptococcus neoformans</i> mutin-type transmembran glycoprotein (tGPI-mutin) des trypanosomes Héماغلutinines du virus de la rougeole	Protéines du choc thermique (HSP) HMGB1
TLR3	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i> (poly IC)	ARNm, HSP, HMGB1, fragments de hyaluronane
TLR4	Lipopolysaccharides (LPS) bactériens (bactéries Gram négatif) Mannanes des champignons Glycoinositolphospholipides des parasites Protéines de l'enveloppe des virus	HMGB1 Fibrinectine Surfactant A Lipoprotéines
TLR5	Flagelline des bactéries flagellées	
TLR6	Lipoprotéines des mycoplasmes LTA des streptocoques B Zymozan des <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Protéines du choc thermique (HSP) HMGB1
TLR7 et TLR8	ARN simple brin des virus à ARN	ARN simple brin
TLR9	<i>cytosine-phosphate-guanine</i> (CpG) ADN des bactéries Hémozoiné du plasmodium l'ADN des virus	ADN
TLR10	Inconnu	Inconnu
TLR11	Bactéries à tropisme urologique <i>profilin-like</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	

Tableau 1. Ligands endogènes et exogènes des TLRs

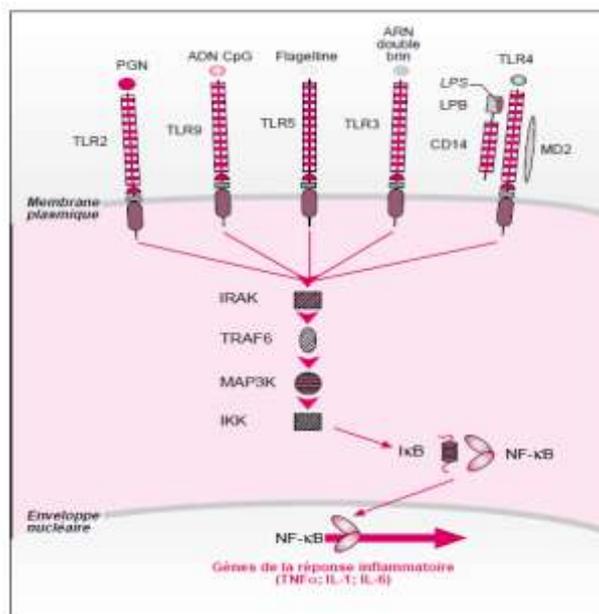


Figure 8. Les TLRs : activation de la voie NFκB

5.2.1.2. *Les cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques (CDs) sont les seules cellules présentatrices d'antigènes capables d'activer les cellules T naïves. Elles peuvent présenter les peptides antigéniques endocytés aussi bien aux cellules T CD4 que CD8 par le biais des molécules du CMH.

Les fonctions des CDs sont hétérogènes et dépendent de leur maturation, des interactions avec les autres cellules et de l'environnement cytokinique dans lequel elles se trouvent. Elles jouent un rôle dans la polarisation des lymphocytes en lymphocytes de type Th1 (réponse proinflammatoire) ou de type Th2 (réponse allergique). Selon leur maturité, elles peuvent activer ou supprimer les réponses des LT auxiliaires (Gordon, 2003; Kapsenberg, 2003). Les CDs immatures ont de faibles capacités à présenter l'antigène, mais après maturation (activation par les ligands des TLRs ou par les cytokines), elles migrent dans les organes lymphoïdes (Jensen, 2007) et vont pouvoir agir pleinement en tant que cellules présentatrices d'antigène. Leur fonction peut être régulée par les cellules NK qui peuvent soit tuer les CDs immatures soit au contraire entraîner leur activation et leur maturation *via* la synthèse de l'IFN γ et de TNF- α (Vivier *et al.*, 2008). Les CDs sont très présentes dans certains tissus notamment l'intestin, où elles jouent un rôle aussi bien dans la tolérance des bactéries commensales que dans la génération d'une immunité contre les pathogènes (Coombes & Powrie, 2008).

Au niveau de la muqueuse intestinale, les CDs sont les cellules clés du contrôle de l'immunité contre les pathogènes et de la tolérance envers les organismes commensaux. Les CDs expriment toute la gamme des récepteurs PRRs leur permettant de distinguer les pathogènes des organismes commensaux, et d'activer ou de maintenir quiescentes les cellules T effectrices (Fleaton *et al.*, 2004). Si les CDs sont les acteurs cellulaires du contrôle d'identité pathogène à la frontière intestinale, les récepteurs PRRs tels que les TLRs et NODs sont les acteurs moléculaires garants de la reconnaissance des constituants bactériens.

5.2.1.3. *Les polynucléaires*

Les cellules polynucléaires sont des cellules effectrices de l'immunité. En effet, à titre d'exemple, ces cellules sont chargées de l'élimination des agents bactériens après leur reconnaissance par le système immunitaire lymphoïde. Trois sortes de cellules polynucléaires sont décrites selon l'apparence de leurs granules après coloration : les neutrophiles, les éosinophiles, et les basophiles.

Les neutrophiles représentent 45 à 70% des leucocytes circulants. Leur noyau est formé de lobes facilement identifiables: 3 à 5 lobes réunis par de fines bandes de chromatine. Leur cytoplasme est riche en granulations plus ou moins violacées, les grains azurophiles. Les neutrophiles sont des phagocytes, capables de digérer les antigènes comme les bactéries.

Les basophiles sont les leucocytes les plus rares (moins 1%). Leur noyau, peu ou pas segmenté, est irrégulier. Leurs granulations sont volumineuses. Ils attirent les autres globules blancs en déversant l'histamine contenue dans leurs granules. L'histamine exerce des propriétés pro-inflammatoires et constitue le principal médiateur de l'inflammation IgE-dépendante.

Les éosinophiles : Leur noyau est habituellement fait de 2 lobes réunis par un pont chromatinien assez épais. Leur cytoplasme contient de granulations arrondies, cristalloïdes, colorées rouge orangé. Elles sont largement impliquées dans la défense contre les parasites.

5.2.1.4. Les macrophages

Dans la moelle osseuse, les pro-monocytes se multiplient tout en continuant leur différenciation. Lorsque la maturation cellulaire est suffisante (en 24 à 48 h), les monocytes quittent la moelle osseuse en traversant les sinusoides vasculaires entre les cellules endothéliales et se retrouvent dans le sang. Les monocytes restent environ 24 heures dans le sang circulant (1/2 vie de 8 heures) puis quittent ce dernier pour les tissus où ils achèvent leur maturation en devenant un macrophage.

On peut distinguer les macrophages recrutés des macrophages résidents. Les macrophages résidents se retrouvent au niveau du foie (cellules de Kupffer), de la peau (cellules de Langerhans) et au niveau des tissus conjonctifs associés au tractus digestif. Les macrophages recrutés au cours d'une inflammation ont une durée de vie très courte. Ils peuvent être activés en réponse à un antigène ou à un corps étranger (Gordon, 2003).

Les monocytes/macrophages exercent leurs actions grâce à leurs propriétés de mobilité, d'adhérence, de phagocytose, de digestion et de sécrétion. Après avoir digéré un pathogène, un macrophage peut présenter un antigène à un lymphocyte T spécifique. La stimulation lymphocytaire par un macrophage est moindre par rapport à celle induite par une cellule dendritique, mais les macrophages sont capables de présenter des antigènes associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, et donc de stimuler des lymphocytes CD4+. Ils participent donc à l'immunité innée en tant que défense non

spécifique, mais sont capables de participer à l'immunité adaptative via l'activation des LT et LB effecteurs (Gordon, 2002).

La capacité des macrophages à montrer une variété de phénotypes en réponse à différents stimuli a été utilisée pour les classer en différentes catégories. Une classification M1/M2 des macrophages a été proposée sur le modèle de la polarisation lymphocytaire Th1/Th2 (Gordon, 2003; Mantovani *et al.*, 2004). Les macrophages M1 sont décrits comme les macrophages pro-inflammatoires et les M2 comme les macrophages anti-inflammatoires. Plus récemment une troisième population de macrophage a été décrite, les « wound macrophages » (Daley *et al.*, 2010).

5.2.1.5. Les mastocytes

Les mastocytes se comportent en véritables immunocytes, capables d'influencer la plupart des fonctions épithéliales, comme la sécrétion, la perméabilité, le flux sanguin muqueux, les interactions neuro-immunes et le péristaltisme (Bischoff & Kramer, 2007) (Figure 9).

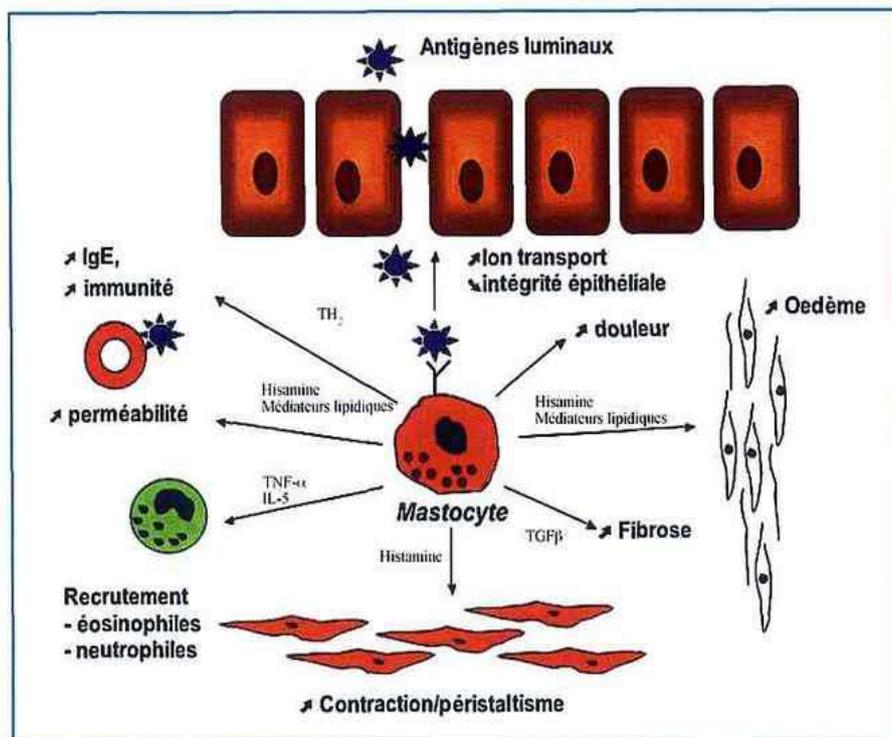


Figure 9. Rôle du mastocyte muqueux
(Piche & Dainese, 2010)

La diversité des fonctions des mastocytes s'explique, d'une part, par une localisation stratégique dans la muqueuse, à proximité des cellules épithéliales et des fibres nerveuses

entériques et, d'autre part, par la libération de médiateurs comme les protéases, l'histamine, l'héparine et/ou la synthèse de médiateurs lipidiques et de cytokines (Piche & Dainese, 2010).

5.2.2. L'immunité acquise

La réponse adaptative ou acquise présente deux volets : la réponse humorale, basée sur la production d'immunoglobulines par les plasmocytes issus de la différenciation des lymphocytes B (LB) et la réponse cellulaire basée sur l'action des lymphocytes T (LT) qui coordonnent les différents axes de la réponse immunitaire et détruisent les cellules infectées.

La mise en jeu de ces différentes cellules nécessite une organisation spatiale et temporelle particulière qui implique des organes spécialisés dans la maturation des lymphocytes (les organes lymphoïdes primaires), et des organes spécialisés dans la rencontre entre les lymphocytes et leurs antigènes (les organes lymphoïdes secondaires : rate, ganglions lymphatiques, amygdales, plaque de Peyer), des cellules spécialisées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes (les cellules M et dendritiques) et enfin une recirculation efficace des lymphocytes dans l'ensemble des tissus. Les lymphocytes au repos qu'ils soient T ou B présentent tous la même apparence cytologique; le seul moyen de les différencier est de se baser sur l'expression de leurs protéines membranaires (CD4, CD8, foxp3...).

5.2.2.1. Les lymphocytes B

Ce sont les lymphocytes producteurs d'anticorps. L'activation et la prolifération de ces lymphocytes ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires où des CPA présentent l'antigène aux lymphocytes naïfs circulants. La reconnaissance de cet antigène active les LB et se traduit par une multiplication intense de ces cellules par mitose. Les LB obtenus se différencient alors en cellules « effectrices » : plasmocytes (LB sécréteurs) ou en cellules « mémoire ». La différenciation des LB est dépendante des LT. En effet, leur différenciation nécessite un signal délivré par l'antigène résultant de l'interaction d'une CPA et d'un LT CD4⁺. Cette interaction entraîne l'activation du LB ainsi que la différenciation finale du LB en plasmocyte sécrétant des anticorps (*Figure 10*) (Rodriguez-Pinto, 2005). Tous les LB stimulés par un Ag ne se transforment pas en plasmocyte, certains deviennent des LB « mémoire ».

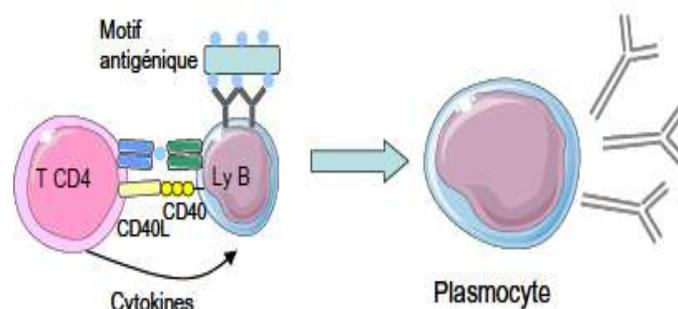


Figure 10. La réponse B thymo-dépendante.

L'antigène qui se fixe au récepteur de la cellule B (LyB) la stimule tout en étant internalisé et « apprêté » en peptides. Les signaux provenant de l'antigène et de la cellule T CD4 vont déclencher la prolifération et la différenciation de la cellule B en plasmocyte sécréteur d'anticorps spécifiques.

5.2.2.2. Les lymphocytes T

Outre les LB, l'organisme contient des LT. Ce sont des protéines spécialisées dans la reconnaissance d'antigènes. On observe deux sous-populations : les lymphocytes auxiliaires (T helper) et les lymphocytes cytotoxiques.

Les LT auxiliaires exprimant le CD4 sont les cellules coordinatrices majeures du système immunitaire. Les LT cytotoxiques exprimant le CD8 participent uniquement à la réponse cellulaire. Ces deux populations diffèrent de façon fondamentale dans leurs modalités de reconnaissance de l'antigène et dans les fonctions régulatrices ou effectrices qu'elles exercent. L'activation du LT est un terme qui regroupe les événements de la signalisation menant à la survie de la cellule, sa prolifération, le réarrangement de son cytosquelette, l'augmentation de son métabolisme et la variation de son profil d'expression génique. Le LT naïf activé peut se différencier en lymphocyte effecteur, Th1 ou Th2 (Mosmann *et al.*, 1986; Romagnani, 1991), capable de sécréter des cytokines et de réguler la réponse immunitaire. La différenciation en Th1 ou Th2 est multifactorielle et dépend entre autres du contexte cytokinique et des molécules de co-stimulation exprimées par la CPA. (Kapsenberg, 2003; Pulendran, 2005). Une vision simple de la dichotomie Th1/Th2 indique que les lymphocytes Th1, auxiliaires des LT CD8+, sont impliqués dans la réponse cytotoxique et les lymphocytes Th2, auxiliaires des LB, initient des réponses humorales (Kidd, 2003). Il a été montré qu'il existait une autre voie de différenciation pour les LT auxiliaires naïfs, la voie Th17 (Tato & O'Shea, 2006). Ces différentes sous-populations sont sous le contrôle d'un autre type de cellules T CD4+, les lymphocytes T régulateurs (Treg).

Les principales caractéristiques de ces différents types de cellules auxiliaires sont résumées ci-dessous (*Figure II*).

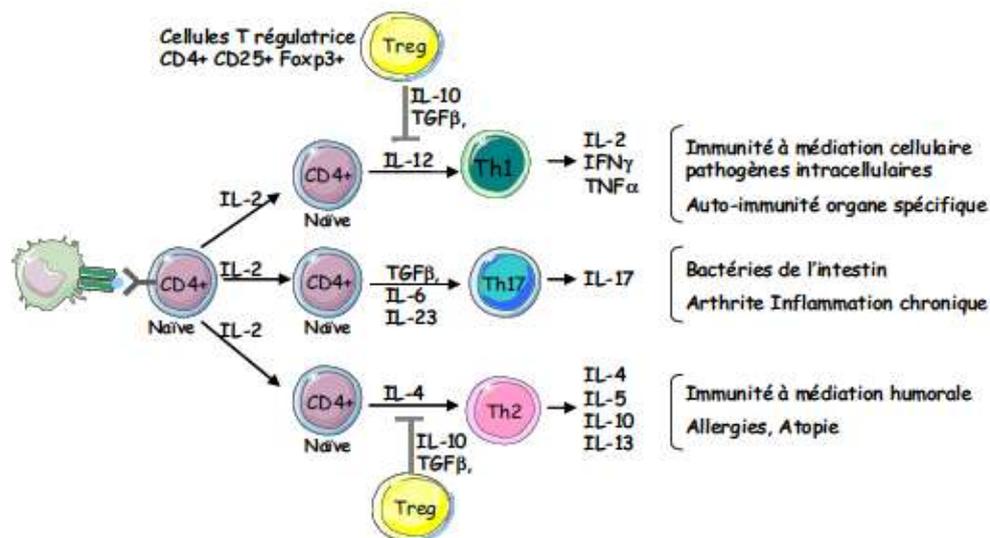


Figure 11. La différenciation des lymphocytes auxiliaires.

(Cooke, 2006)

6. Existe-t-il un lien entre la barrière intestinale épithéliale et l'immunité de la muqueuse digestive ?

L'interaction entre l'épithélium et l'immunité est à double sens. En effet, par leurs différentes sécrétions, les lymphocytes T activés vont pouvoir agir et moduler la barrière intestinale, notamment à travers leur action sur les protéines de jonctions (*Figure 12*).

Le TNF α (*tumor necrosis α*) et l'IFN γ (*interféron γ*) sont deux molécules pro-inflammatoires pouvant être sécrétées par les CPAs et les cellules Th1.

L'effet du TNF α sur la barrière a également été évalué sur des monocouches de cellules épithéliales intestinales. Le traitement par le TNF α de ces cellules augmente l'expression et l'activation de la kinase de la chaîne légère de myosine (*myosin light-chain kinase* : MLCK), directement corrélée avec une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Ma *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). En effet, une fois active, la MLCK va phosphoryler la MLC ce qui va entraîner une contraction du cytosquelette d'actine et l'ouverture des jonctions serrées. Au contraire, l'IFN γ aurait un effet direct sur les protéines de jonction. L'exposition de cellules à l'IFN γ entraîne une endocytose de l'occludine, de JAM-1 et de la claudine-1, par un mécanisme de macropinocytose nécessitant également la phosphorylation de la MLC (Ivanov *et al.*, 2004; Utech *et al.*, 2005).

D'autre part, des souris génétiquement modifiées pour exprimer constitutivement la forme active de MLCK et spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal, présentent une

perméabilité intestinale augmentée ainsi qu'une activation des CD4+, TNF α , INF γ et CMH I au niveau de la muqueuse intestinale, suggérant que le recrutement ou l'activation des cellules immunitaires est la conséquence du dysfonctionnement de la barrière épithéliale (Su *et al.*, 2009).

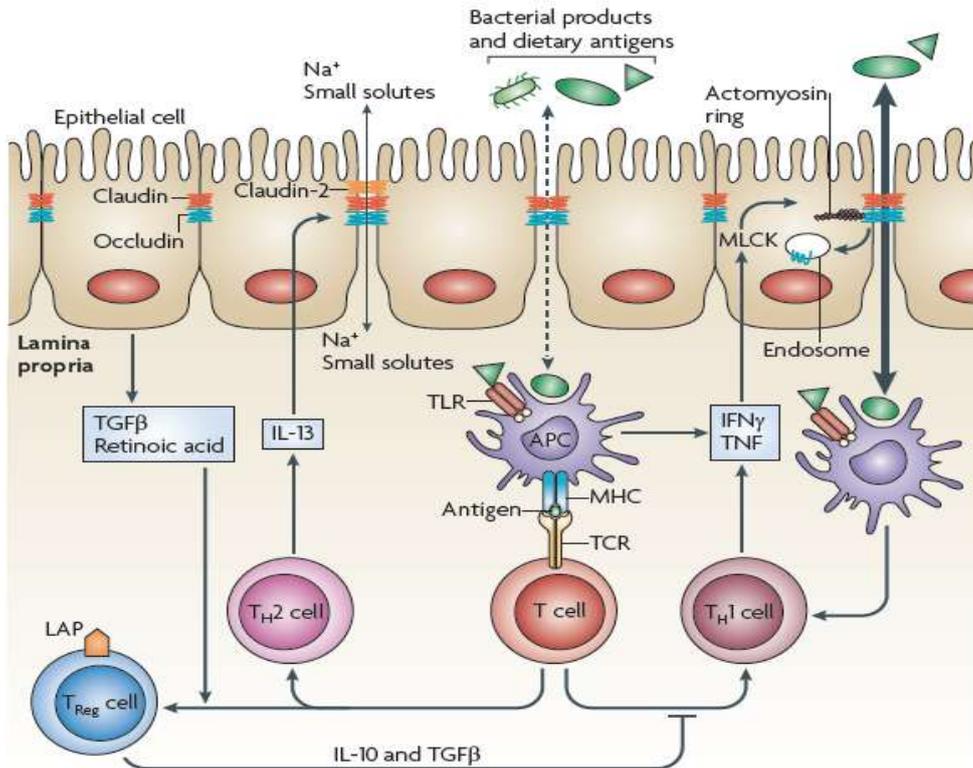


Figure 12. Interaction entre le système immunitaire et la régulation de la barrière intestinale. (Turner, 2009).

A la suite du passage des antigènes bactériens au travers de la barrière épithéliale intestinale, la reconnaissance de cet antigène par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) entraînant la différenciation des cellules T en Th1 ou Th2, peut induire le développement d'une inflammation. Le TNF α et l'INF γ sécrétés par les CPA et les cellules Th1, vont activer la MLCK entraînant une contraction du cytosquelette d'actine et induisant une augmentation du flux paracellulaire d'antigènes bactériens et ainsi amplifier le cycle de l'inflammation. L'IL-4 et l'IL-13, produites par les cellules Th2, provoquent une apoptose épithéliale et une augmentation de l'expression de la claudine-2, entraînant une augmentation des flux de cations. A l'inverse, si les CPA favorisent la différenciation des cellules T en cellules Treg, l'homéostasie de la muqueuse est maintenue et empêche le développement de l'inflammation. Cette différenciation peut être induite par l'acide rétinoïque et le TGF β dérivés des cellules épithéliales.

CHAPITRE II

LA DOULEUR VISCÉRALE

1. Définition

« La douleur n'est plus ni moins qu'un système d'alarme, dont la seule fonction est de signaler une lésion corporelle », Descartes 1664. Pendant très longtemps, les cliniciens et les chercheurs ont considéré la douleur comme une sensation particulière qui témoigne d'un traumatisme ou d'une agression, ou n'apparaissant qu'après application d'un stimulus. Cette définition ne rend pas compte des implications psycho-pathologiques inhérentes à toute douleur.

La définition qui a été adoptée par le comité de taxonomie de l'Association Internationale de l'étude de la Douleur (IASP) a été proposée par Merskey (1979) : « La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle ou décrite en termes d'une telle lésion ». Cette définition intègre la dimension affective et émotionnelle à la dimension sensorielle. Elle rend compte de l'ensemble des mécanismes générateurs qui peuvent être d'origine physique ou psychologique.

2. Propriétés de la douleur viscérale

Dans le cas de la douleur viscérale, on distingue les stimuli nocifs qui lèsent directement ou potentiellement les organes sans engendrer nécessairement une sensation, des stimuli nociceptifs qui produisent une sensation désagréable ou franchement douloureuse (Cervero, 1988; Ness & Gebhart, 1990). Les douleurs viscérales sont non seulement difficiles à décrire, mais elles sont diffuses et irradient souvent dans le territoire somatique d'une façon complexe et variable d'un individu à l'autre.

Classiquement, on admet qu'il existe deux types de douleur : (i) la douleur limitée au viscère pathologique et correspondant à l'hyperalgésie primaire (abaissement du seuil de la douleur). La douleur de ce type est définie par une augmentation des réponses à des stimuli mécaniques, thermiques et est liée à une sensibilisation des nocicepteurs périphériques et (ii) la douleur plus étendue, correspondant à l'hyperalgésie secondaire qui implique des mécanismes centraux complexes. L'hyperalgésie secondaire est caractérisée par une augmentation des réponses uniquement à des stimuli mécaniques. Elle semble être liée à l'activation initiale des nocicepteurs.

Souvent, dans le domaine de la douleur viscérale, l'apparition d'une inflammation de la muqueuse provoque un phénomène d'*allodynie*. L'allodynie est caractérisée par l'apparition de la douleur suite à une stimulation normalement non douloureuse (*Figure 13*).

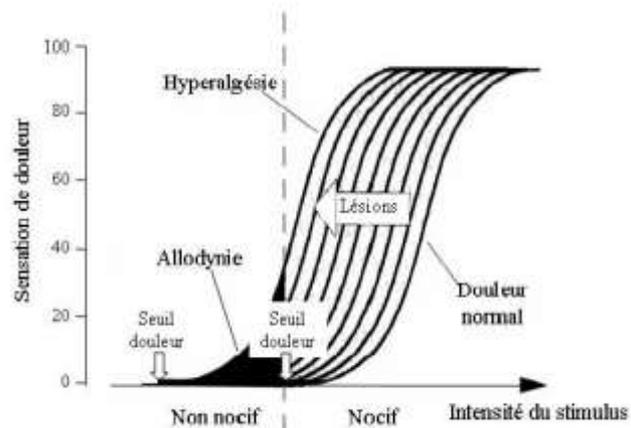


Figure 13. Relation entre intensité et sensation (Gebhart, 1999)

3. Les récepteurs de la douleur viscérale

La présence de la douleur viscérale suppose l'existence des nocicepteurs qui sont capables d'être activés par des stimuli périphériques. Ces nocicepteurs sont constitués de terminaisons libres de fibres nerveuses amyélinisées constituant des arborisations plexiformes dans la paroi des viscères.

Il existe deux types de nocicepteurs viscéraux : 20 à 25 % sont des fibres de haut seuil d'activation, codant l'intensité de la distension mécanique, mais uniquement au-dessus du seuil douloureux. Les nocicepteurs les plus nombreux (75 % environ) sont des fibres de faible seuil d'activation codant les informations non douloureuses (nausées, vomissements, distension colique). Ces nocicepteurs viscéraux sont polymodaux (Gebhart, 1996), ils répondent à des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques.

De plus, un troisième contingent de fibres viscérales est constitué des fibres dites « silencieuses ». Elles ne répondent que lorsqu'elles sont préalablement sensibilisées par un processus pathologique tel que l'inflammation (Ness & Gebhart, 1990). Ces nocicepteurs sont répartis de façon ubiquitaire (Cervero & Janig, 1992). La stimulation de ces récepteurs silencieux est à l'origine d'hyperalgésie et/ou d'allodynie observées aussi bien dans les viscères que dans les zones somatiques (Cervero & Janig, 1992).

Les nocicepteurs viscéraux se rencontrent dans la totalité des organes internes. Toutefois, suivant leur localisation précise (muscleuse ou muqueuse), ils donnent naissance à des douleurs différentes (torsion, crampe..).

Ces récepteurs viscéraux transmettent les événements nociceptifs au système nerveux central (SNC). Il se pourrait que l'activation des nocicepteurs viscéraux spécifiques soit à l'origine des douleurs viscérales définies, aiguës et non étendues, alors que les formes vagues et sourdes d'inconfort seraient dues à la stimulation générale des récepteurs viscéraux non spécifiques (Cervero, 1991).

4. Neuromédiateurs de la nociception

Les lésions traumatiques, inflammatoires ou ischémiques vont provoquer la libération par les tissus lésés des différents médiateurs. Soit ces médiateurs activent directement les nocicepteurs et sont dits algogènes, soit ils sensibilisent les nocicepteurs à d'autres stimuli.

Parmi ces substances algogènes, on peut identifier, dans les fibres afférentes viscérales la SP (*substance P*), la bradykinine, les prostaglandines, les neurotrophines, la CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), le NPY (*neuropeptide Y*), la CCK (*cholécystokinine*), les ENK (*enképhalines*), la somatostatine, le VIP (*vaso-intestinal peptide*), la PMH (*peptide histidine méthionine*), la gastrine, la neurotensine et les pro-dynorphines (Chayvialle *et al.*, 1980; Schultzberg *et al.*, 1980; Mulderry *et al.*, 1985; Molander *et al.*, 1987; Chery-Croze *et al.*, 1988).

Ces neuropeptides sont synthétisés dans les corps cellulaires des afférences digestives puis transportés et sécrétés au niveau des extrémités centrales et périphériques des neurones (Levine *et al.*, 1993). L'intégration centrale des messages afférents et le type des réponses efférentes qu'ils induisent dépendent de la nature des peptides libérés et de leur interaction au niveau des sites post-jonctionnels (*Figure 14*).

Ces neuromédiateurs sont également libérés dans la paroi du tube digestif. Les neuromédiateurs ainsi libérés participent à des fonctions effectrices (vasorégulation, sécrétion, contraction ou relaxation du muscle lisse digestif, réaction inflammatoire,...) et modulent à leur tour l'activité des récepteurs sensitifs.

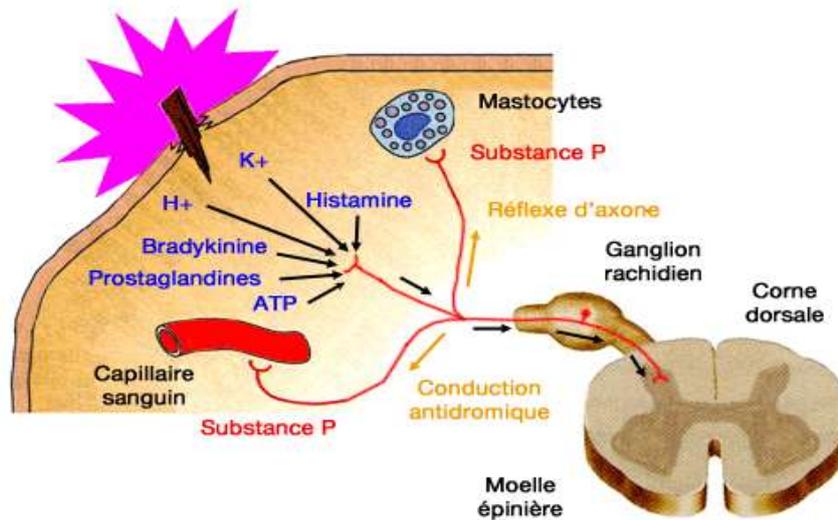


Figure 14. Substances algogènes impliquées dans l'activation/sensibilisation des nocicepteurs

5. Voies de transmission de la douleur

Après activation des nocicepteurs, l'influx nociceptif se dirige par des fibres nerveuses afférentes vers la moelle épinière où les axones des neurones afférents font synapse avec des interneurons dans les cornes dorsales de la moelle épinière. Les fibres nerveuses à l'approche de la moelle se séparent en deux groupes : les fibres A α de gros calibre sont situées en position médiane, alors que les fibres plus fines (A δ et C) sont en position latérale.

Les fibres A α sont entourées de myéline et ont la capacité de conduire très rapidement l'influx nerveux véhiculant la sensation des différences de température et de pression. Les fibres A δ sont également entourées de myéline mais beaucoup moins rapides que les fibres A α . Elles ne véhiculent que des sensations en réponse à des stimulations à type de pincement, piqûre ou de chaleur. Les fibres C ne possèdent pas de myéline en périphérie et véhiculent l'influx nerveux perçu par le cerveau comme une douleur.

A partir des relais interneuronaux de la corne dorsale, le message nociceptif emprunte les voies spinales ascendantes jusqu'aux centres supra-spinaux. Deux voies principales s'offrent alors au message nociceptif (*Figure 15*) :

- la voie spinothalamique latérale
- la voie spinothalamique médiane ou spino-réticulaire

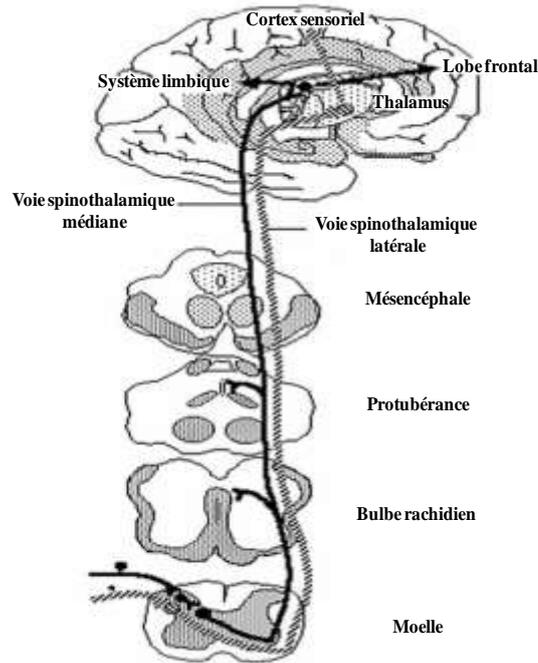


Figure 15. Voies de la douleur : voies spinothalamiques latérale et médiane

Faisceau spinothalamique latéral

Des études effectuées chez le rat, le chat et le singe (Giesler *et al.*, 1979; Kuo *et al.*, 1983; Hobbs *et al.*, 1992) ont montré que les neurones spinothalamiques sont largement distribués dans la moelle épinière. Leurs projections se répartissent dans trois zones du thalamus : les régions ventro-postéro-latérale, postérieure et médiane. Sur le plan fonctionnel, un pourcentage élevé de neurones à l'origine du faisceau spinothalamique sont sensibles à des stimulations nociceptives. Environ 32% des neurones spinothalamiques sont de type nociceptifs spécifiques et 55% de type nociceptifs non spécifiques (Kevetter & Willis, 1982), confirmant la participation de ce faisceau à la transmission de l'information nociceptive.

Faisceau spinoréticulaire

Le faisceau spinoréticulaire se projette sur la substance réticulée. Son rôle dans la nociception a été montré par plusieurs études comportementales confirmant la participation de la formation réticulée du tronc cérébral aux phénomènes de la nociception (Monconduit *et al.*, 2002). Les axones spinoréticulaires cheminent soit dans le cordon ventral soit dans le cordon antéro-latéral. Les projections spinoréticulaires se terminent à différents niveaux s'étendant du bulbe rachidien au mésencéphale (Chaouch *et al.*, 1983; Peschanski & Besson, 1984).

D'autres voies ascendantes et structures impliquées dans la nociception ont été nouvellement décrites (*Figure 16*).

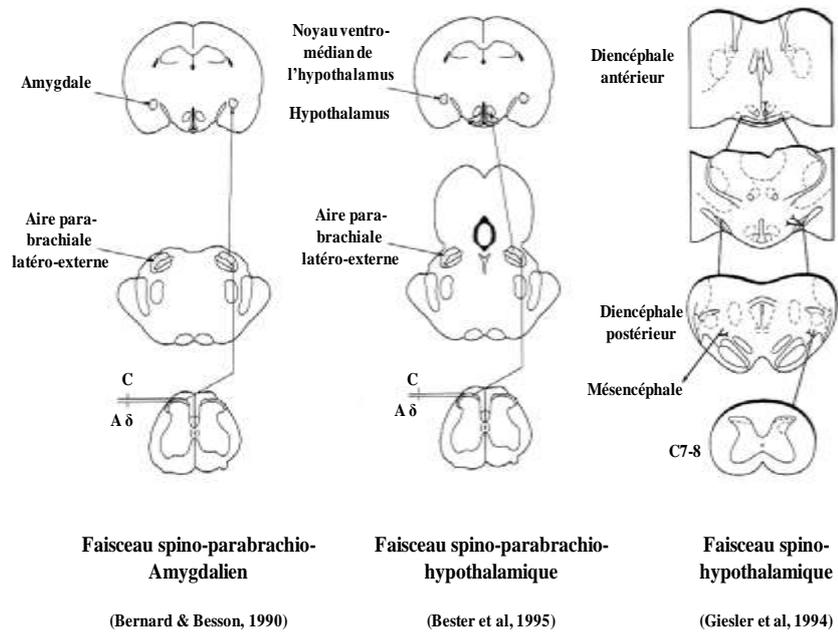


Figure 16. Représentation schématique des voies nouvellement décrites : les faisceaux spino-parabrachio-amygdalien, spino-parabrachio-hypothalamique et spino-hypothalamique.

CHAPITRE III

STRESS, SENSIBILITÉ VISCÉRALE ET PERMÉABILITÉ INTESTINALE

1. Définition

La réaction de stress peut être définie comme l'ensemble des réponses de l'organisme à une sollicitation de l'environnement correspondant au « syndrome d'adaptation général ». Le stress désigne ainsi la réponse de l'organisme aux facteurs d'agressions physiologiques et psychologiques, ainsi qu'aux émotions qui nécessitent une adaptation. Cependant, lorsqu'il y a une rupture d'équilibre entre les capacités d'adaptation et les exigences du milieu environnemental, la réaction de stress devient pathologique, conduisant à l'apparition de troubles fonctionnels.

2. Stress et axe HPA

L'axe HPA est un ensemble complexe d'influences directes et d'interactions régulatrices entre l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes corticosurrénales. Il constitue un système neuroendocrine de contrôle des réactions au stress et régule de nombreuses fonctions physiologiques (digestion, immunité, humeur et émotions, sexualité, homéostasie énergétique).

En réponse à un stresser, l'axe HPA s'active et l'hypothalamus sécrète la CRF (*corticotropin releasing factor*) qui va stimuler la sécrétion et la synthèse d'ACTH (*adrenocorticotropin hormone*) par l'hypophyse qui, à son tour, entraîne celle des corticoïdes (cortisol et corticostérone) par les glandes surrénales. Les glucocorticoïdes jouent un rôle de rétrocontrôle négatif pour inhiber la production de CRF par l'hypothalamus. Cependant, l'activation inadéquate ou excessive de l'axe HPA peut contribuer au développement de pathologies (Munck *et al.*, 1984; McEwen & Stellar, 1993). Les auteurs suggèrent que les augmentations induites par le stress dans les niveaux de glucocorticoïdes ne protègent pas contre la source de stress lui-même, mais plutôt contre les réactions normales de l'organisme au stress.

Les principaux neuromédiateurs du stress sont représentés par le CRF et ses apparentés, les urocortines (Ucn 1,2,3) qui ont une distribution dans le SNC mais également dans le tube digestif (Tache & Bonaz, 2007). Ils exercent leur action par l'intermédiaire de deux récepteurs appartenant à la famille des protéines à sept domaines transmembranaires

couplés à la protéine G : CRF1 et CRF2. Le CRF1 prédomine au niveau central alors que le CRF2 est plutôt observé en périphérie. Or le stress induit des perturbations de la motricité gastro-intestinale (ralentissement de la vidange gastrique et du transit dans l'intestin grêle, accélération du transit intestinal et sécrétion colique) par l'intermédiaire du système CRFergique central et périphérique. L'inhibition de la vidange gastrique implique le CRF2 et la stimulation du transit colique le CRF1.

Des études utilisant des agonistes et des antagonistes du CRF ainsi que des modèles de souris transgéniques ont confirmé l'importance du CRF dans la réponse de l'axe HPA au stress (Bale & Vale, 2004). En effet, une perfusion directe dans le cerveau ou une administration périphérique de CRF entraîne la libération de l'ACTH par l'hypophyse. De même, des antagonistes CRF ont été bien documentés pour diminuer ou atténuer la libération de cette hormone en réponse au stress. Le stress est caractérisé par une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de CRH (Ladd *et al.*, 2000). Des études chez les rongeurs et les primates montrent que la privation maternelle dans l'enfance est associée à une augmentation de l'expression génique neuronale du CRH et à une réactivité accrue au stress (Bakshi & Kalin, 2000; Caldji *et al.*, 2000). Une fois adulte, les animaux ayant été soumis à des stress précoces montrent une sur-activation de l'axe HPA et une grande vulnérabilité aux maladies induites par le stress (Coplan *et al.*, 1996).

3. Effets du stress sur la sensibilité viscérale

Chez le rongeur, il a été montré qu'un stress aigu (stress de contrainte) induit une hypersensibilité viscérale en réponse à la distension colrectale, sans modifications de la compliance rectale (Gue *et al.*, 1997). De même, des études ont montré que des stimuli adverses précoces (irritation colique néo-natale mécanique ou chimique ; séparation maternelle durant la vie néo-natale) s'accompagnent d'une hypersensibilité viscérale chronique (Al-Chaer *et al.*, 2000) et induisent des troubles de la motricité intestinale (Coutinho *et al.*, 2002) à l'âge adulte. Les mécanismes impliqués dans les altérations de la sensibilité viscérale par le stress sont à la fois périphériques et centraux. Gue et al (2007) ont montré pour la première fois qu'une administration centrale d'un antagoniste non spécifique des récepteurs au CRH bloque l'hypersensibilité viscérale induite par le stress, suggérant que le CRH libéré en central lors du stress joue un rôle important dans la régulation de la sensibilité viscérale. Plus récemment, un rôle du CRH, libéré en périphérie, dans la sensibilité viscérale en réponse à la distension colrectale a été mis en évidence. Un stress répété

(éviter passif de l'eau) induit aussi une hypersensibilité viscérale et cet effet est bloqué par l'administration intrapéritonéale d'un antagoniste non spécifique des récepteurs au CRH (astressine) agissant exclusivement en périphérie (Larauche *et al.*, 2008). Chez l'homme, l'administration intraveineuse de CRH provoque une hypersensibilité viscérale et baisse le seuil de la sensation douloureuse en réponse à une session de distensions rectales des volontaires sains en mimant les effets du stress (Nozu & Kudaira, 2006). Inversement, l'administration systémique d'un antagoniste non spécifique des récepteurs au CRF, mais qui ne traverse pas la barrière hématoencéphalique, réduit l'hyperalgésie viscérale chez des patients souffrant du syndrome de l'intestin irritable soumis à une stimulation électrique colique (Sagami *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données obtenues chez l'homme ou chez l'animal montrent un rôle important du CRH central et périphérique dans l'apparition et le maintien de l'hypersensibilité viscérale.

Un autre facteur clé, le mastocyte, a été identifié dans le contrôle de l'hypersensibilité viscérale induite par le stress. Les mastocytes, au niveau de la muqueuse digestive, occupent une position stratégique dans l'axe intestin-cerveau grâce à leur localisation à l'interface entre le système immunitaire de la muqueuse intestinale et le système nerveux entérique. En effet, les mastocytes se situent à une grande proximité des terminaisons nerveuses. Ils possèdent à leur surface plusieurs types de récepteurs et possèdent la capacité de libérer des médiateurs (histamine, protéases, NGF (*nerve growth factor*)). En effet, un stress de contrainte induit une dégranulation mastocytaire et la libération d'histamine et de SP impliquées dans l'hypersensibilité viscérale (Bradesi *et al.*, 2002). L'administration d'antagoniste des récepteurs NK1 (récepteurs de SP) supprime l'hypersensibilité colique à la distension induite après un stress de contrainte (Bradesi *et al.*, 2003). De même, l'administration de doxantrazole, un stabilisateur mastocytaire, reverse l'effet délétère produit par l'injection de CRH sur la sensibilité viscérale (Barreau *et al.*, 2007). Il semble donc que les médiateurs mastocytaires libérés en réponse à la stimulation par la CRH pourraient être les effecteurs moléculaires du stress au niveau intestinal en conduisant au développement de troubles sensitifs (Castagliuolo *et al.*, 1996). En particulier, le NGF pourrait intervenir puisqu'il est requis pour le développement de l'hypersensibilité viscérale chez les rats adultes ayant vécu une séparation maternelle en période néo-natale (Barreau *et al.*, 2007).

4. Effets du stress sur la perméabilité intestinale

Chez l'animal, de nombreux travaux ont étudié les effets du stress sur la perméabilité paracellulaire et transcellulaire. Des études ont montré une augmentation de la conductance épithéliale, ainsi que le passage paracellulaire de sondes inertes telles que le mannitol et le Cr-EDTA chez les rats stressés, bien que la structure de la muqueuse observée en microscopie semble normale (Saunders *et al.*, 1994). D'autres ont aussi observé, chez les rats ayant subi un stress de 24h, une augmentation du flux transépithélial de la « horseradish peroxydase » caractérisé par la présence de cette molécule au niveau des endosomes entérocytaires (Kiliaan *et al.*, 1998). Parallèlement à ces altérations de la perméabilité transcellulaire et paracellulaire, l'application d'un stress aigu est également décrite pour altérer la résistance de l'épithélium digestif et les échanges ioniques entérocytaires associés à un phénomène de translocation bactérienne (Santos *et al.*, 1999).

Un stress chronique provoque une augmentation de la perméabilité transcellulaire (flux d'horseradish peroxydase) et de la conductance épithéliale chez des rats stressés (Santos *et al.*, 2000). Chez la souris, une session de stress répétée (ultrasons et contrainte) entraîne une augmentation de la perméabilité paracellulaire par un mécanisme mettant en jeu les lymphocytes CD4+, également associé à une translocation bactérienne au niveau du foie (Ferrier *et al.*, 2003). Un stress chronique peut aussi stimuler l'adhésion des bactéries aux niveaux des cellules épithéliales via un mécanisme dépendant des mastocytes (Soderholm *et al.*, 2002).

Parmi les médiateurs impliqués dans l'augmentation de la perméabilité induite par un stress aigu ou chronique, l'implication du système cholinergique de l'axe corticotrope (CRF et glucocorticoïdes) et des mastocytes ont largement été étudiés. Les médiateurs de l'axe corticotrope, tels que le CRF et les glucocorticoïdes, sont connus pour participer au développement des altérations digestives (Santos *et al.*, 1999; Saunders *et al.*, 2002). En effet, l'administration périphérique de corticolibérine reproduit les effets du stress sur la perméabilité colique (Santos *et al.*, 1999) en activant les mastocytes. En revanche, les effets du stress sur la muqueuse colique sont prévenus après un traitement au doxantrazole ou après administration d'un antagoniste non sélectif des récepteurs au CRF. La participation des mastocytes, leur dégranulation et leur prolifération est bien décrite dans les altérations de la perméabilité intestinale en réponse à un stress. De même, l'implication d'un autre médiateur, la corticostérone, dans les altérations de la perméabilité induite par un stress a été décrite.

Ainsi, ces auteurs ont montré qu'une adrénalectomie ou un blocage pharmacologique des récepteurs à la corticostérone, prévient l'augmentation de la perméabilité intestinale (Meddings & Swain, 2000).

Il a été également montré que des changements au niveau de la perméabilité paracellulaire colique sont responsables de l'hypersensibilité viscérale induite par un stress de contrainte, et ces changements résultent de la contraction du cytosquelette des cellules épithéliales par l'activation de la MLCK (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005). En effet, une augmentation de la perméabilité intestinale serait susceptible de favoriser le passage d'agents indésirables présents dans la lumière intestinale à travers la barrière épithéliale, lesquels à leur tour activeraient le système immunitaire libérant ainsi des médiateurs capables d'activer et/ou sensibiliser les terminaisons nerveuses sensibles.

CHAPITRE IV

ALTÉRATIONS DE LA BARRIÈRE INTESTINALE : PERTINENCE PHYSIOPATHOLOGIQUE

Les deux principaux types de pathologies intestinales chroniques rencontrés en gastro-entérologie et impliquant une altération plus ou moins importante de la fonction de la barrière intestinale sont les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH) et le syndrome de l'intestin irritable (SII).

1. Le syndrome de l'intestin irritable

1.1. Introduction

Le SII est un trouble fonctionnel intestinal dans lequel des douleurs abdominales ou un inconfort digestif sont associés à la défécation ou à une modification de la fréquence des selles. Un ballonnement, une distension abdominale et des troubles du transit intestinal sont également fréquemment associés. Il est défini par des critères cliniques qui ont évolué avec le temps, les derniers en date étant les critères de Rome III (Longstreth *et al.*, 2006). Le SII affecte 10-15% de la population totale dans les pays industrialisés, avec une prévalence deux fois plus importantes chez la femme que chez l'homme.

Selon la forme et la consistance des selles, définies par l'échelle de Bristol (Heaton *et al.*, 1992), il est possible d'identifier différents sous-groupes : diarrhée prédominante (SII-D), constipation prédominante (SII-C), mixte avec alternance de diarrhée et de constipation (SII-M). Le SII post-infectieux (SII-PI) est un quatrième sous-type désignant un SII dont l'apparition est consécutive à une infection gastro-intestinale (Drossman *et al.*, 2002). Le SII est une affection multifactorielle (Mertz, 2003; Camilleri & Talley, 2004). Plusieurs mécanismes sont à l'origine de la survenue des symptômes (*Figure 17*).

1.2. Mécanismes physiopathologiques

Un trouble de la motricité digestive a été la première explication apportée aux symptômes du SII (Mertz, 2003). Il est clair que les perturbations motrices digestives ne peuvent résumer la physiopathologie du SII, car leur présence est inconstante et leur coïncidence avec les symptômes, notamment les douleurs abdominales, est rarement observée.

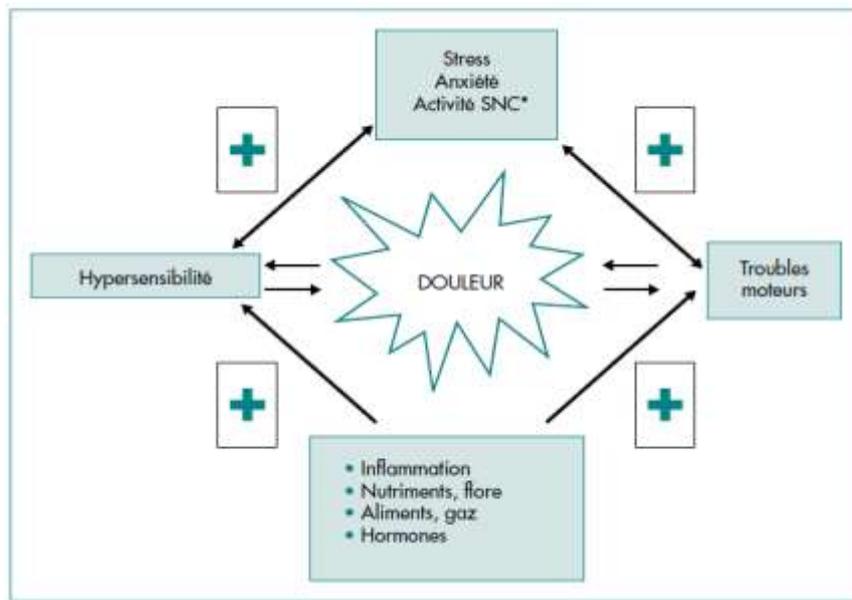


Figure 17. Modèle multifactoriel proposé pour expliquer la douleur au cours du SII.

* SNC = système nerveux central.

Un tournant essentiel dans la conception physiopathologique du SII a été la démonstration que la douleur était souvent associée à une hypersensibilité viscérale. L'hypothèse d'une telle hypersensibilité avait été avancée dès 1973 après la démonstration par Ritchie qu'une distension rectale réalisée à l'aide d'un ballonnet déclenchait une douleur chez 55% des patients souffrant d'un SII alors que le même volume de distension n'était perçu douloureusement que par 6% des sujets témoins (Ritchie, 1973).

Des anomalies dans le fonctionnement de l'axe HPA ont été décrites au cours du SII. Un travail suédois a rapporté chez des patients atteints de différents sous-types de SII, que le stress induisait chez les patients, à la différence des volontaires sains, une augmentation significative du CRF, de l'ACTH, de l'adrénaline et de la noradrénaline (Posserud *et al.*, 2004). Cette différence existait quelle que soit la forme symptomatique. Une équipe irlandaise a confirmé cette hyperréactivité : après injection IV de CRF, l'ACTHémie et la cortisolémie se sont élevées de façon exagérée chez les malades par rapport aux témoins, en association avec une sécrétion accrue d'IL-6 et d'IL-8.

Le rôle des mastocytes ne doit pas aussi être oublié. Chez des malades atteints de SII, un nombre accru de mastocytes a été observé dans la muqueuse colique et intestinale avec des altérations plus prononcées au niveau du côlon droit et de l'iléon terminal. De même, dans un travail publié par une équipe de Bologne, la proximité entre les fibres nerveuses entériques et

les mastocytes muqueux était corrélée à la sévérité des douleurs abdominales (Barbara *et al.*, 2004b). Plus récemment, la même équipe a pu identifier les médiateurs mastocytaires impliqués dans la nociception au cours du SII. Dans ce travail, le surnageant issu de la culture de biopsies coliques de malades atteints de SII était capable de stimuler des préparations de neurones entériques humains et ces effets étaient inhibés par un prétraitement par des antagonistes de l'histamine, de la sérotonine et de la tryptase (Buhner *et al.*, 2009). La tryptase, l'histamine ou le NGF, contenus dans les mastocytes et libérés lors de leur dégranulation, sont des médiateurs reconnus de l'hypersensibilité viscérale (Bueno *et al.*, 2000).

De même, une augmentation de la perméabilité intestinale a été documentée chez des malades atteints de SII (Spiller *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2004). En utilisant le test au lactulose/mannitol, une grande étude contrôlée conduite au Canada après une épidémie de gastroentérite suite à une contamination du réseau d'eau potable, a montré que les sujets qui développaient un SII-PI avaient une perméabilité intestinale augmentée (Marshall *et al.*, 2004). D'autres auteurs ont confirmé que la perméabilité intestinale, évaluée plus finement par des méthodes isotopiques (^{51}Cr EDTA), était anormalement élevée chez des malades ayant un SII-D que l'origine soit infectieuse ou pas (Dunlop *et al.*, 2006). De même, un travail avait mis en évidence une corrélation entre l'augmentation de la perméabilité paracellulaire colique et la sévérité des douleurs abdominales chez 39 malades atteints de SII, sans différence entre les malades diarrhéiques ou constipés. Dans cette étude, l'augmentation de la perméabilité paracellulaire mesurée sur des biopsies coliques montées dans des mini chambres de Ussing était associée à une réduction de l'expression de l'ARNm de la protéine ZO-1 au niveau des jonctions serrées. L'augmentation de la perméabilité paracellulaire colique est un facteur favorisant la pénétration de toxines, d'antigènes et la translocation bactérienne qui peuvent être à l'origine des réponses inflammatoires locales associées à une présence locale accrue de cellules immunocompétentes et surtout de médiateurs de l'inflammation. Ceux-ci sont capables à leur tour de sensibiliser les terminaisons des neurones afférents primaires et en particulier les mécanorécepteurs pariétaux répondant aux stimuli mécaniques. Ceci pourrait être à l'origine de l'hypersensibilité à la distension identifiée chez les sujets SII.

Les protéases endoluminales coliques apparaissent aussi comme un autre facteur physiopathologique potentiel. Ceci est notamment le cas pour la sérine-protéase. Un travail a montré que dans le sous-groupe des patients SII-D, l'activité sérine-protéase fécale était 3 fois

plus élevée que dans une population témoin. Cette hyperactivité n'était associée ni à l'élévation de la tryptase mastocytaire, ni à celle de l'élastase pancréatique. Les hypothèses des auteurs sont les suivantes : la sérine protéase en excès pourrait avoir une action directe sur l'épithélium colique ; la sérine-protéase pourrait également être à l'origine de l'activation des récepteurs activés par les protéases (récepteurs PAR), notamment de type 2. Cette activation des récepteurs PAR générerait un état d'hypersensibilité via une augmentation de la perméabilité intestinale (Roka *et al.*, 2007).

1.3. Troubles psychologiques et SII

Les patients avec un SII présentent fréquemment des troubles psychologiques. La somatisation, l'anxiété, l'hypochondrie, la dépression et les phobies sont communes chez les patients (Porcelli, 2004). Cependant, des études de larges cohortes de patients ont permis de mettre en évidence que ces troubles psychologiques ne concernent qu'une sous-population de malades qui recherche des soins médicaux et en particulier l'avis de spécialistes (Gaynes & Drossman, 1999; Herschbach *et al.*, 1999). En revanche, l'historique d'abus sexuels ou physiques et d'événements émotionnels intenses et nombreux au cours de la vie est une donnée épidémiologique solide (Drossman *et al.*, 1996a; Drossman *et al.*, 1996b). Dans un échantillon de patients atteints de SII et ayant subi des abus physiques et/ou sexuels, les seuils de douleur à la distension rectale sont diminués et corrélés à l'activation des structures limbiques (Ringel *et al.*, 2008). Ces données montrent qu'il existe, chez les patients avec un SII, une vulnérabilité au stress (hyperréactivité limbique) probablement de survenue précoce. D'ailleurs, les patients avec un SII rapportent souvent un stress chronique (Bennett *et al.*, 1998) et/ou un stress aigu précédant le déclenchement de la maladie (Creed, 1999). Cependant, si le stress affecte la fonction digestive motrice et la perception viscérale (Monnikes *et al.*, 2001) et ce, avec d'autant plus d'intensité que le sujet est jeune (Ladd *et al.*, 2000), il est plus probable qu'il soit responsable d'une aggravation des symptômes que de leur cause (Bennett *et al.*, 1998).

L'état de stress des patients atteints de SII est corrélé aux symptômes, par exemple à des changements de transit ou de consistance des selles (Mayer *et al.*, 2001). Des preuves de la dérégulation de l'axe HPA ont d'abord été apportées chez les patients atteints de SII-D qui présentent des taux de cortisol plasmatique bas, une libération de cortisol faible et une libération d'ACTH normale en réponse à des DCR nociceptives (Posserud *et al.*, 2004). A

l'inverse, les taux de cortisol urinaire sont augmentés dans un sous-groupe de femmes atteintes de SII (Heitkemper *et al.*, 1996). Les dernières études décrivent une hyperréactivité de l'axe HPA en réponse à l'injection de CRH chez les patients SII (Dinan *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2009). Ces données signalent un défaut de régulation des récepteurs aux glucocorticoïdes et donc potentiellement une altération du rétrocontrôle glucocorticoïdérique (Mayer & Collins, 2002).

2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

2.1. Introduction

Les MICI forment un groupe de conditions inflammatoires de l'intestin grêle et du côlon. Les deux principales formes de MICI sont la MC et la RCH. Les MICI affectent environ 200 000 personnes en France. Sur ces 200 000 personnes, environ 120 000 sont atteintes de MC et 80 000 souffrent de RCH. Il existe également une disparité selon le sexe du sujet et il semble que le ratio femmes sur hommes pour la MC soit de 0.9 tandis que celui relatif à la RCH soit de 0.5.

2.2. Mécanismes physiopathologiques

L'étiopathogénèse des MICI reste encore méconnue. Mais l'hétérogénéité des manifestations cliniques et des données épidémiologiques plaide en faveur d'une étiologie multifactorielle mettant en jeu aussi bien des facteurs génétiques, immunologiques ou encore environnementaux.

L'orientation des réponses immunitaires est sous le contrôle d'un équilibre entre les réponses Th1 et Th2 (Romagnani, 1997). En effet, les lymphocytes Th1, via l'IFN γ , vont diminuer l'expansion des lymphocytes Th2 et/ou la production de cytokines favorisant la réponse humorale (IL-4, 5, 6, 10 et 13) et les lymphocytes Th2, via la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4 et vont inhiber la réponse immunitaire à médiation cellulaire et l'expansion des lymphocytes Th1. Un déséquilibre vers l'une de ces deux voies est donc susceptible d'affecter le développement de la réponse immunitaire protectrice (Kidd, 2003). Pour la MC, ce sont les lymphocytes Th1, caractérisés par une production élevée d'IL-2 et d'IFN γ , qui prédominent (Bamias *et al.*, 2003). A l'inverse, la muqueuse des patients atteints de RCH est infiltrée majoritairement par des lymphocytes Th2 atypiques qui sont des lymphocytes caractérisés par la production d'IL-5, d'IL-13 et de TGF- β (Targan & Karp, 2005).

Des profils moteurs anormaux ont été décrits dans la MC et la RCH (O'Brien & Phillips, 1996). Les zones enflammées présentent en général une activité contractile réduite du muscle lisse et une prévalence élevée de contractions se propageant par bouffées dans l'intestin grêle proximal (Annese *et al.*, 1997). Ces changements moteurs concourent à la promotion d'un transport rapide du contenu du côlon recto-sigmoïde et à l'apparition de diarrhées et de crampes.

Dans les MICI, une augmentation de l'expression de nombreux neuropeptides et neurotransmetteurs (SP, VIP, NGF, CGRP) dans les neurones et les cellules gliales de la muqueuse et de la sous-muqueuse a été démontrée (Barbara *et al.*, 2004a). Les kinines ou tachykinines (SP, neurokinine A, bradykinine et kallididine) participent au développement de l'hyperalgésie dans les conditions inflammatoires en stimulant la production de cytokines, en activant les voies de transduction de la synthèse d'acide arachidonique et en déclenchant la dégranulation d'histamine par les mastocytes. Le récepteur à la bradykinine B1 est inductible et synthétisé uniquement dans les conditions inflammatoires sous dépendance du facteur de transcription NFκB. Le récepteur B2, conduit à l'activation et à la sensibilisation des nocicepteurs par la bradykinine en provoquant la libération de SP et de CGRP (Holzer & Holzer-Petsche, 1997; Blaukat, 2003; Wang *et al.*, 2006). Exprimés dans les neurones sensoriels et les neurones myentériques (Stadnicki *et al.*, 2005), les récepteurs à la bradykinine font partie des acteurs de la sensibilisation viscérale, par exemple en réponse à l'IL-1β (Murakami *et al.*, 2008). Le blocage des récepteurs B1 a ainsi montré des effets bénéfiques sur des patients atteints de MICI (Marceau & Regoli, 2008).

Dans les modèles animaux de MICI, l'hypersensibilité colique est fortement corrélée à une activation des neurones, qui se traduit par une production élevée de neuropeptides SP, CGRP et VIP. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs NK1 et NK2 permet de diminuer la douleur viscérale et l'infiltration granulocytaire observées dans le côlon d'animaux présentant une colite induite par le TNBS (Improta *et al.*, 2003) ou une colite induite par le DNBS (Ursino *et al.*, 2009). Dans le modèle DSS, la colite s'accompagne d'une infiltration de cellules T CD4+ et d'une forte expression de SP corrélée à l'augmentation des réponses à la DCR (Verma-Gandhu *et al.*, 2007).

Un nombre élevé de mastocytes a été détecté dans des segments intestinaux des malades atteints de la MC et de RCH (Gelbmann *et al.*, 1999). Ils peuvent alors contribuer à aggraver la colite par l'afflux de neutrophiles et par la production de cytokines pro-

inflammatoires. Cependant les mastocytes ont également été documentés pour avoir des propriétés anti-inflammatoires, parce qu'ils peuvent servir à améliorer ou à limiter les réponses immunitaires innées ou adaptatives, selon le contexte (Galli *et al.*, 2008).

Les patients atteints de MICI présentent une augmentation de la perméabilité paracellulaire, qui reflète une perturbation de la fonction de barrière (Hollander *et al.*, 1986; May *et al.*, 1993; Gassler *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que l'augmentation de perméabilité intestinale chez les patients en rémission était un préalable à la rechute de la maladie (Wyatt *et al.*, 1993; Arnott *et al.*, 2000). Comme explicité avant, les complexes jonctionnels sont primordiaux dans le maintien de la barrière. L'expression de la claudine-5, de la claudine-8 et de l'occludine sont diminuées chez les patients atteints de MC (Zeissig *et al.*, 2007). De même, chez les patients atteints de RCH une diminution de l'expression des claudines 4 et 7 est observée (Oshima *et al.*, 2008). Chez les patients atteints de MC et de RCH, une augmentation de la formation de pores par la claudine-2 est observée, cette claudine étant connue pour augmenter le passage des ions et des petites molécules non chargées (Prasad *et al.*, 2005; Oshima *et al.*, 2008). L'augmentation de l'expression de cette claudine est associée à un écartement plus important des jonctions serrées et donc d'un accroissement de la perméabilité paracellulaire intestinale (Zeissig *et al.*, 2007). De plus chez les patients atteints de MICI, on observe une baisse de l'expression de la protéine JAM-A, protéine dont l'inactivation chez la souris entraîne une susceptibilité augmentée à la colite induite au sulfate de dextran (DSS) (Laukoetter *et al.*, 2008; Vetrano *et al.*, 2008).

2.3. Stress psychologique et MICI

Le stress psychologique a été décrit comme un facteur aggravant de l'activité inflammatoire dans les MICI. Des événements de vie traumatisants, le stress chronique et la dépression augmentent la probabilité de rechute chez les patients en rémission (Lerebours *et al.*, 2007; Maunder & Levenstein, 2008; Bonaz & Bernstein, 2012).

CHAPITRE V

LES ESTROGÈNES – DE LA BIOSYNTÈSE À LEUR FONCTION

1. Introduction

Les estrogènes sont des hormones sexuelles stéroïdes à 18 atomes de carbones (C18), dérivées du cholestérol. Les trois principaux estrogènes naturels sont : (i) l'estradiol (E2, forme majoritaire secrétée par l'ovaire chez la femelle non gestante, obtenue par aromatisation de la testostérone), (ii) l'estriol (E3, produit principalement au cours de la gestation par le placenta) et (iii) l'estrone (E1, produit pendant la ménopause par aromatisation de l'androstènedione). Les estrogènes, lipophiles, diffusent rapidement à travers les membranes cellulaires pour agir sur leurs récepteurs, appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils sont produits principalement par les gonades et les surrénales.

Chez la femme, les estrogènes sont synthétisés dans les ovaires et en moindre quantité dans le cortex surrénalien. Au cours de la gestation, une quantité considérable est également produite par le placenta. La voie de biosynthèse des estrogènes est initiée à partir du cholestérol et passe par la formation de progestérone puis d'androgènes. Les androgènes, précurseurs des estrogènes, sont synthétisés dans les cellules thécales puis ils diffusent ensuite dans les cellules de la granulosa où ils sont convertis en estrogènes par une aromatase. La production des estrogènes est stimulée par les hormones antéhypophysaires, la FSH (*follicle-stimulating hormone*) et la LH (*luteinizing hormone*).

Le **cycle menstruel** chez les femmes dure 28 jours, avec une ovulation apparaissant vers le 14^{ème} jour du cycle. La sécrétion des estrogènes durant ce cycle présente deux pics : juste avant l'ovulation puis vers le milieu de la phase lutéale.

Le **cycle œstral** chez la rate est beaucoup plus court, 4-5 jours. Il est divisé en 4 stades : proestrus, estrus, metestrus et diestrus. Le proestrus et l'estrus correspondent à la phase folliculaire, tandis que le metestrus et le diestrus correspondent à la phase lutéale. Le pic des estrogènes apparaît dans la période de proestrus.

Chez l'homme, les estrogènes sont formés dans le testicule et dans les glandes corticosurrénales. Dans le testicule, la voie de biosynthèse des estrogènes est initiée dans les cellules de Leydig et les androgènes sont aromatisés en estrogènes dans les cellules de Sertoli.

2. Les récepteurs aux estrogènes

Il existe deux types de REs : RE α et RE β . Une troisième forme a été mise en évidence chez les poissons mais n'a pas été identifiée chez l'humain (Drummond *et al.*, 2002).

Les deux types RE α et RE β font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et partagent une structure similaire composée d'abord, d'un domaine de liaison au ligand (LBD pour *ligand-binding domain*) en C terminal relativement conservé avec 54% d'homologie (Figure 18). Vient ensuite un domaine central, hautement conservé avec 96% d'homologie, responsable de la liaison des REs à l'ADN (DBD pour *DNA-binding domain*) grâce à la structure d'acides aminés en doigt de zinc. La région N-terminale est le domaine le plus variable entre les deux récepteurs avec seulement 17% d'homologie. Il possède également plusieurs sites de phosphorylation sérine/thréonine pouvant être régulés par une variété de kinases, permettant ainsi l'interaction des REs avec d'autres voies de signalisation (Edwards, 2005). En plus de ces domaines, la structure des REs possède deux sous-domaines d'activation transcriptionnelle nommés AF-1 et AF-2 (AF pour *activation factor*). Le sous-domaine AF-1, indépendant du LBD et situé en N-terminal, est très actif chez le RE α . Par contre, son activation est plutôt minimale chez le RE β . Le domaine AF-2 situé en C-terminal est quant à lui, dépendant du LBD et permet le recrutement et l'interaction de cofacteurs et/ou de corépresseurs au niveau du promoteur. Ensemble, le sous-domaine AF-2 et le domaine DBD sont responsables de la dimérisation des récepteurs ainsi que de leur translocation au noyau (Matthews & Gustafsson, 2003). Ces récepteurs peuvent donc se retrouver sous forme d'homodimères, soient RE α /RE α et RE β /RE β , ou sous forme d'hétérodimères (RE α /RE β) suite à leur activation.

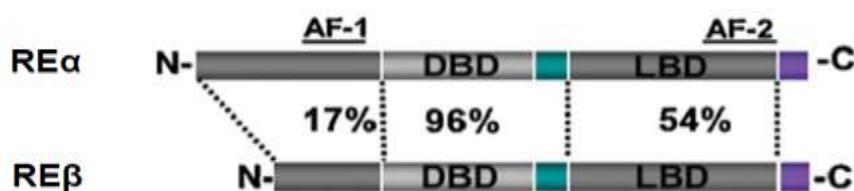


Figure 18. La structure des récepteurs estrogéniques.
(Edwards, 2005)

Malgré leur structure semblable, les REs sont codés par deux gènes différents situés sur des chromosomes distincts. Le gène codant pour le RE α humain (ESR1) est situé sur le chromosome 6 alors que celui codant pour le RE β humain (ESR2) est localisé sur le

chromosome 14. Le RE α est une protéine de 595 acides aminés avec un poids moléculaire de 66 kDa. Le gène de RE β permet l'expression d'une protéine de 530 acides aminés de poids moléculaire d'environ 54 kDa (Matthews & Gustafsson, 2003; Zhao *et al.*, 2008).

Les deux types α et β sont présents ensemble ou non, ou dans des proportions différentes dans la plupart des tissus et organes (Nilsson & Gustafsson, 2000; Jacobs *et al.*, 2003) (*Tableau 2*).

Organe/tissus	Homme		Rongeurs	
	RE α	RE β	RE α	RE β
Poumon	-	X	-	X
Vaisseaux	X	X	-	-
Surrénales	X	-	X	-
Reins	X	X	X	-
Prostate	-	X	-	X
Testicules	-	X	X	X
Coeur	X	X	X	X
Cerveau	X	X	-	X
Thymus	-	X	-	X
Glandes mammaires	X	X	-	-
Utérus	X	X	X	X
Endomètre	X	X	-	-
Vagin	X	-	-	-
Trompes de Fallope	-	X	-	-
Ovaires	X	X	X	X
Vessie	-	X	-	X
Epididyme	-	X	X	X
Hypophyse	X	X	X	X
Hypothalamus	X	X	X	-
Foie	X	-	X	X
Muscles	-	-	X	X
Graisse	-	-	X	X
Tractus gastrointestinal	-	X	-	X
Côlon	-	X	-	X
Intestin grêle	-	X	-	X
Os	X	X	X	X

Tableau 2. Distribution tissulaire des isoformes des REs chez l'Homme et les Rongeurs (Kuiper & Gustafsson, 1997; COT, 2003)

D'autres études mettent en évidence l'existence d'un autre récepteur aux estrogènes. L'hypothèse est que les effets des estrogènes sur la sensibilité viscérale n'impliquaient pas les récepteurs nucléaires des estrogènes, car insensible à leur antagoniste, le ICI 182,780, mais que l'estradiol modulait l'hypersensibilité viscérale via un récepteur couplé à la protéine G (GPR30 – *G protein coupled receptor 30*) (Lu *et al.*, 2007).

3. Rôle des estrogènes dans la physiopathologie intestinale

3.1. Les estrogènes et l'intégrité de la barrière intestinale

In vivo, une diminution de la perméabilité intestinale chez la rate en proestrus (stade du cycle sous dominance estrogénique) a été démontrée par rapport aux mâles (Homma *et al.*, 2005) en conditions basales (non inflammatoires). Cette même étude a montré que l'administration d'estradiol chez les mâles diminuait la perméabilité paracellulaire intestinale en conditions basales, suggérant un rôle protecteur des estrogènes sur la barrière épithéliale. De même, une modulation de la perméabilité intestinale liée aux variations naturelles d'hormones stéroïdiennes au cours du cycle sexuel a été démontrée chez la rate, suggérant que les hormones sexuelles participent au contrôle de la barrière épithéliale (Braniste *et al.*, 2009). L'administration d'estradiol chez des rates ovariectomisées diminue la perméabilité de la barrière intestinale en comparaison avec les contrôles. De plus, son activité est apparue médiée par les REs car l'utilisation d'un antagoniste pur de ces récepteurs (ICI 182,780) bloque ses effets (Braniste *et al.*, 2009).

Les deux types de REs α et β ont été localisés au niveau de l'intestin chez les rongeurs (Kawano *et al.*, 2004). Des études sur biopsies humaines ont également identifié les deux types de REs dans le côlon normal (Foley *et al.*, 2000; Konstantinopoulos *et al.*, 2003). Le RE α est exprimé au niveau de la muqueuse intestinale dans les neurones des plexus nerveux d'Auerbach et de Meissner (Kawano *et al.*, 2004); tandis que le RE β est présent dans les cellules épithéliales, les neurones des plexus sous-muqueux et myentériques, les cellules endothéliales, les lymphocytes et dans les cellules musculaires lisses de la *muscularis mucosa* et *muscularis propria* (Konstantinopoulos *et al.*, 2003). Une prédominance du RE β a été démontrée au niveau de l'épithélium colique chez le rat ainsi que chez l'homme (Thomas *et al.*, 1993; Campbell-Thompson *et al.*, 2001; Konstantinopoulos *et al.*, 2003) avec un niveau plus élevé chez la femme que chez l'homme (Campbell-Thompson *et al.*, 2001).

Le RE β joue un rôle essentiel dans l'organisation et la maintenance de l'architecture de l'épithélium intestinal, en régulant les processus de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales (Wada-Hiraike *et al.*, 2006). Ce rôle a été démontré chez des souris invalides pour RE β qui ont présenté également des anomalies au niveau des jonctions intercellulaires qui se traduisaient par une diminution du nombre de desmosomes, la présence de desmosomes asymétriques et une diminution de jonctions serrées, support de la perméabilité paracellulaire intestinale. Dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire colique, seule l'activation de la voie RE β est responsable de la diminution du passage intercellulaire, un mécanisme passant par la surexpression des protéines transmembranaires des jonctions serrées, occludine et JAM-A (Braniste *et al.*, 2009).

3.2. Les estrogènes et la douleur viscérale

Dans les maladies touchant la sphère abdominale, la douleur est souvent liée aux mouvements intestinaux. Comme le temps de transit et les fonctions des sphincters peuvent être altérés par les hormones sexuelles (Hinds *et al.*, 1989; Heitkemper & Jarrett, 1992), celles-ci modulent très probablement la douleur viscérale. L'influence des hormones sexuelles pourrait donc expliquer pourquoi les douleurs chroniques viscérales sont deux à trois fois plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes. Chez le rat, l'influence du cycle menstruel est bien établie dans la douleur viscérale puisque les réponses sensorielles enregistrées pendant le test de DCR sont obtenues pour des seuils plus bas pendant la phase de proestrus (Holdcroft *et al.*, 2000), une observation à l'inverse de la symptomatologie chez la patiente SII, où la perception de la douleur abdominale est exacerbée pendant la période de menstruation là où les estrogènes s'écroulent (Heitkemper *et al.*, 2003). Au contraire, dans un modèle de calcul urétéral artificiel, la sensibilité à la douleur urétérale chez la rate est accentuée pendant les phases de metestrus/diestrus (Giamberardino *et al.*, 1997). Les études animales suggèrent donc que la phase du cycle menstruel conditionnerait la sensibilité à la douleur chez la femelle. Cette différence apparaît liée à l'action des estrogènes et non de la progestérone. Des études ont montré que l'ovariectomie diminue la sensibilité viscérale en réponse à la DCR alors que l'estradiol réverse cet effet (Ji *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2007).

Les deux types de REs se retrouvent dans les compartiments du système nerveux impliqués dans la modulation de la réponse nociceptive. Ils ont été mis en évidence dans la moelle épinière et dans les ganglions rachidiens, mais également dans les zones du cerveau capables de moduler la réponse au stress et à la douleur (Papka *et al.*, 2001). Ces deux

récepteurs peuvent coexister dans certains neurones sensoriels, ce qui peut expliquer la difficulté de définir le rôle exact de chaque type de récepteurs dans la physiopathologie de la douleur. Des études ont montré une réduction de la réponse viscérale suite à l'injection de formaldéhyde chez des souris déficientes pour RE β en comparaison avec des souris sauvages (Spooner *et al.*, 2007). De même, cet effet est associé à une diminution de l'expression de la protéine c-fos au niveau spinal, plus exactement de la lamina I-II et IV-V (Spooner *et al.*, 2007). D'autres études ont montré que l'inactivation de RE α ou RE β chez la souris induit une altération similaire de la réponse à la douleur (Li *et al.*, 2009), suggérant l'implication des deux types de REs dans la réponse à la douleur. Par ailleurs, Lu et al (2009) ont montré chez la rate OVX que l'hypersensibilité viscérale induite par l'E2 était insensible à l'antagoniste des REs, le ICI 182,780, suggérant cette fois l'implication des récepteurs non nucléaires GPR30 (Lu *et al.*, 2007).

3.3. Les estrogènes et le système immunitaire

Les deux types de REs sont présents au niveau des cellules immunitaires. RE α est présent dans les cellules dendritiques, les macrophages, les monocytes, les mastocytes, les cellules NK et les lymphocytes B et T (Curran *et al.*, 2001; Grimaldi *et al.*, 2002; Phiel *et al.*, 2005). RE β est moins ubiquitaire, il est exprimé au niveau des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et des lymphocytes B (Phiel *et al.*, 2005).

Les estrogènes induisent une modification dans le nombre et la fonction des neutrophiles. L'estradiol diminue la chimiotaxie des neutrophiles ainsi que l'adhérence à l'endothélium vasculaire, ce qui prévient l'infiltration neutrophilaire. La diminution de l'infiltration neutrophilaire par l'estradiol se traduit par la diminution de l'activité de l'enzyme myéloperoxidase (MPO) (Verdu *et al.*, 2002; Houdeau *et al.*, 2007). De même, les estrogènes jouent un rôle important dans la différenciation des cellules dendritiques. Le traitement des cellules dendritiques avec des estrogènes diminue la production de TNF- α et d'IL-12, en augmentant l'expression des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-10 (Yang *et al.*, 2006). En ce qui concerne les mastocytes, les estrogènes réduisent la libération des protéases par les mastocytes dans un modèle de colite spontanée chez le rat (HLA-B27) (Harnish *et al.*, 2004). Les effets anti-inflammatoires des estrogènes s'expriment par une diminution de l'expression d'ARNm de RMCP-1, -3 et 4 (*rat mast cell protease*). Cette même étude a montré que l'estradiol inhibe la dégranulation des mastocytes et la libération des cytokines (Harnish *et al.*, 2004).

Parmi les cytokines essentielles à la genèse et au maintien de la réaction inflammatoire, le MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) est une protéine exprimée de façon constitutive dans l'intestin. Cette protéine est présente dans les cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes, les mastocytes et les macrophages, mais également dans les cellules épithéliales (Baugh & Donnelly, 2003; Calandra & Roger, 2003). Lors d'une inflammation, le MIF est libéré par les cellules immunitaires et épithéliales afin d'inhiber la migration des macrophages en induisant leur accumulation sur la zone lésée. Située en amont de la cascade immuno-inflammatoire, cette cytokine stimule la production d'un large spectre de molécules pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-8...) (Calandra & Roger, 2003). De là, il a été montré que la concentration basale de MIF dans l'intestin conditionnait l'intensité de la réponse inflammatoire. En effet, des études sur des souris transgéniques sur-exprimant le MIF ont mis en évidence une induction rapide d'une colite à de très faibles doses de DSS (*dextran sulfate de sodium*) normalement sans effet chez des souris sauvages (Ohkawara *et al.*, 2005). De plus, l'administration d'un anticorps anti-MIF améliore les signes cliniques et histologiques dans deux modèles de colite (DSS et TNBS – *acide trinitrobenzène sulfonique*) (Ohkawara *et al.*, 2002).

Chez la rate, les variations plasmatiques en hormones sexuelles au cours du cycle sexuel sont un facteur de régulation de la concentration basale de MIF dans le côlon. Ainsi, en conditions physiologiques, les concentrations de cytokines TNF- α et d'IL-1 β ne varient pas de la phase folliculaire à la phase lutéale, alors que la production de MIF est significativement diminuée pendant l'estrus et élevée pendant les phases de metestrus et de diestrus (Houdeau *et al.*, 2007). Dans un modèle expérimental d'inflammation colique, une diminution de l'inflammation a été démontrée chez les rates pendant la phase folliculaire par rapport à la phase lutéale suggérant un rôle anti-inflammatoire des estrogènes circulants (Houdeau *et al.*, 2007). Cette même étude a montré que l'estradiol est capable d'atténuer la réponse inflammatoire aiguë, en diminuant l'expression du MIF 24 heures après induction de la colite. Cette diminution est suivie par un effet suppresseur de la production d'IL-1 β , associée à une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires, ainsi qu'à une réduction des lésions tissulaires. De la même façon, un régime chronique à l'estradiol ou à un xénoestrogène (Bisphénol A) induit une diminution significative de l'infiltration neutrophilaire 24h après l'induction chez la rate ovariectomisée d'une colite au TNBS. Cet effet est bloqué par l'administration d'ICI 182,780, confirmant que ces propriétés anti-inflammatoires sont de nature estrogénique (Braniste *et al.*, 2010).

De même, l'administration de génistéine et de daidzéine a montré des propriétés anti-inflammatoires en diminuant l'inflammation au niveau de la muqueuse colique et en restaurant la balance des cytokines vers un statut anti-inflammatoire (Harnish *et al.*, 2004; Morimoto *et al.*, 2009; Seibel *et al.*, 2009).

3.4. Les estrogènes et le stress

Des études cliniques et expérimentales ont mis en évidence l'existence d'une différence liée au sexe dans la réponse à des stimuli nociceptifs. Des facteurs biologiques, psychologiques et socio-culturels contribuent aux différences dans la perception de la douleur dans les deux sexes (Fillingim, 2000). En comparaison avec les femmes, les hommes ont un risque plus élevé d'artériosclérose (Kalin & Zumoff, 1990) et de maladies infectieuses (Klein, 2000), tandis que les femmes ont plus de risque de développer des maladies auto-immunes, y compris la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose (Beeson, 1994; Whitacre *et al.*, 1999), ainsi que de nombreux troubles liés au stress comme la fibromyalgie (Wolfe *et al.*, 1995) et la douleur chronique (Verhaak *et al.*, 1998).

Connaître les mécanismes d'action impliqués dans ces différences importantes entre les deux sexes peut être extrêmement utile dans l'élucidation de la pathogénèse de diverses maladies courantes, une étape cruciale dans le développement de leur traitement. Cependant, malgré les progrès récents, les mécanismes d'action restent inconnus.

Les individus réagissent différemment à des événements de vie stressants. Un stimulus stressant induit une activation de plusieurs voies physiologiques tels que l'axe HPA et le SNA (*système nerveux autonome*). Un nombre considérable de recherche au cours des dernières années a lié la fonction de ces deux systèmes à la pathogénèse de plusieurs troubles, y compris les troubles liés au stress (Stoney *et al.*, 1990; Heim *et al.*, 2000; Tsigos & Chrousos, 2002). Un effet de l'âge et du sexe sur la réponse de l'axe HPA à des événements physiologiques, pharmacologiques ou psychosociaux a, de même, été démontré (Otte *et al.*, 2005).

Une méta-analyse en 1987 sur 12 études psychophysiologiques examinant la relation entre le sexe et la réponse au stress a conclu qu'il n'y a pas de différence dans la réponse au stress liée au sexe (Stoney *et al.*, 1987). Une principale critique de cette étude était que, bien que le stress psychologique employé était suffisant pour étudier la réaction du SNA, il n'était pas assez sévère pour stimuler la réponse de l'axe HPA. Cependant, le développement d'un stress social a permis de générer des réponses adéquates de l'axe HPA (Kirschbaum *et al.*,

1993; Kudielka & Kirschbaum, 2005). Ces études ont montré que des réponses de l'axe HPA selon le sexe, sont subtiles en conditions basales, mais deviennent fortement prononcées suite à un stress psychologique. En général, entre la puberté et la ménopause, la réponse de l'axe HPA et du SNA a tendance à être plus faible chez la femme par rapport à l'homme au même âge (Kudielka *et al.*, 1998; Kirschbaum *et al.*, 1999). Cependant, avant la puberté et après la ménopause, la différence liée au sexe devient plus faible même inexistante. De même, des études ont montré des variations considérables de la réponse de l'axe HPA au stress en fonction du cycle menstruel, généralement avec une réactivité accrue dans la phase lutéale (Tersman *et al.*, 1991; Kirschbaum *et al.*, 1999), similaire aux hommes (Rohleder *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 2001). D'une autre part, des études ont montré une réponse accrue de l'axe HPA au stress chez les femmes par rapport aux hommes (Weekes *et al.*, 2008).

Chez les animaux, des rates OVX ont montré des taux de corticostérone plus faibles que des rates normales (Atkinson & Waddell, 1997; Seale *et al.*, 2004) et ces effets ont été réversés par les estrogènes (Suzuki *et al.*, 2001). D'autres études ont montré que l'estradiol inhibe les réponses de l'axe HPA au stress (Young *et al.*, 2001). Ces effets adverses peuvent être dus aux différences d'action des estrogènes sur RE α ou RE β . En effet, il a été démontré que l'estradiol ainsi que le PPT (*propyl pyrazole triol* - agoniste RE α) augmentent les taux de corticostérone et d'ACTH induits par le stress alors que le DPN (*diarylpropionitrile* - agoniste RE β) les diminue (Weiser & Handa, 2009). L'E2 ainsi que le PPT diminuent la capacité du dexaméthasone à inhiber les altérations de l'axe HPA liées au stress. Les auteurs ont conclu que l'estradiol a la capacité d'inhiber le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA et ceci via RE α (Weiser & Handa, 2009).

3.5. Les estrogènes et les pathologies intestinales

Dans les MICI, bien qu'il n'y ait pas de prédominance sexuelle nette, il semble que les femmes soient plus atteintes lorsque les études cliniques se focalisent sur les cas familiaux (Baumgart & Sandborn, 2007). Pendant la période pré-menstruelle, 93% des femmes rapportent une exacerbation des symptômes associés aux MICI (la plupart avec une MC) (Okoro & Kane, 2009). Dans la RCH en revanche, il n'existe pas de prépondérance liée au sexe.

Une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour le RE β a été démontrée dans 2 modèles animaux de colite et dans des biopsies de patients atteints de MICI. Cette diminution de l'expression du RE β était associée à une augmentation de la perméabilité

intestinale (Looijer-van Langen *et al.*, 2011) confirmant le rôle protectif des estrogènes vis-à-vis de la perméabilité intestinale et la réponse inflammatoire dans une colite (Houdeau *et al.*, 2007; Braniste *et al.*, 2009).

La prédominance de SII chez la femme est très clairement établie par un ratio femme/homme de 2 à 3 selon les études. Les études cliniques dans l'ensemble ont échoué à montrer des différences de genre dans les seuils perceptifs à la distension du rectum chez les patients avec un SII (Ragnarsson *et al.*, 1999; Sloots *et al.*, 2000; Soffer *et al.*, 2000). Cependant, les études sur les variations des symptômes du SII en fonction du cycle menstruel plaident fortement en faveur d'un rôle majeur des hormones (Heitkemper & Jarrett, 1992; Jackson *et al.*, 1994; Houghton *et al.*, 2002). En effet, une diminution du seuil de la sensibilité viscérale apparaît progressivement au début de la phase lutéale, s'aggrave dans la période périmenstruelle et atteint l'intensité maximale au début des menstruations (période caractérisée par des faibles taux d'estrogènes circulants) (Heitkemper *et al.*, 2003) (*Figure 19*). De plus, les douleurs stomacales et pelviennes, les nausées et les diarrhées sont plus fréquentes pendant les règles dans un groupe de femmes avec SII que dans un groupe contrôle (Heitkemper & Jarrett, 1992; Heitkemper *et al.*, 1993).

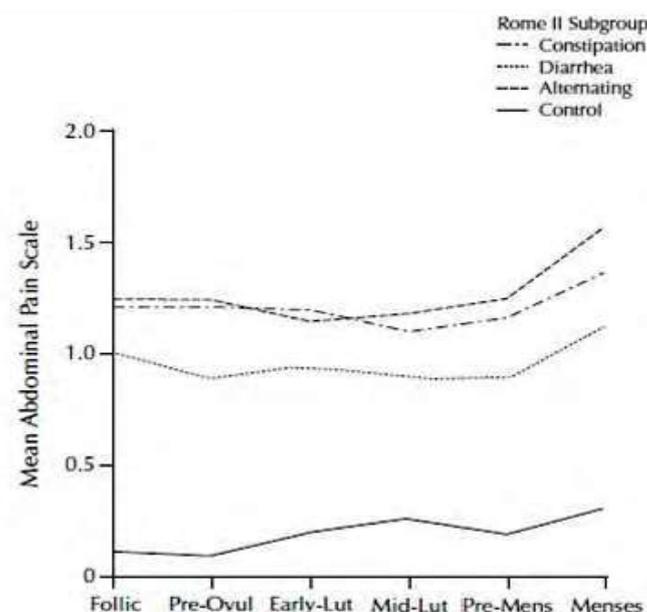


Figure 19. Variations de la douleur abdominale au cours du cycle menstruel chez les patientes souffrantes du SII

(différents sous-groupes selon les critères de Rome II - constipés, diarrhéiques, alternés)
 Follic – phase folliculaire ; Pre-Ovul – phase préovulatoire ; Early-Lut – phase lutéale précoce ; Mid-Lut – phase mi-lutéale ; Pre-Mens – phase de pré-menstruations ; Menses – menstruations (Heitkemper *et al.*, 2003)

CHAPITRE VI

LE GERME DE SOJA FERMENTÉ - UN INGRÉDIENT INNOVANT

1. Introduction

Les populations occidentales ont connu au cours des deux derniers siècles des évolutions sans précédent de leur mode de vie en général et de leur alimentation en particulier. Dans ce paysage, et suite à des conséquences négatives de ces évolutions sur la santé avec l'apparition des maladies dites « de civilisation », la réflexion sur la prévention de la santé est devenue indissociable de la réflexion sur l'alimentation. En effet, l'alimentation est susceptible de moduler diverses fonctions de l'organisme, et peut aussi contribuer à diminuer le risque de certaines pathologies. Dans ce contexte, la notion de l'aliment fonctionnel est apparue. Ainsi, un aliment peut être considéré comme fonctionnel lorsqu'il est démontré qu'il affecte de façon bénéfique une ou plusieurs fonctions de l'organisme, en plus de ses effets nutritionnels propres, de telle façon qu'il améliore l'état du bien-être et diminue le risque de maladie (Roberfroid, 2000).

En se basant sur cette définition et pour sa composition spécifique en divers nutriments, le soja appartient aujourd'hui à cette classe d'aliments. En effet, le soja (*Glycine max* (L.) Merrill) présente un profil très intéressant de composés bénéfiques pour la santé humaine. Une alimentation à base de soja est pauvre en graisses saturées et en cholestérol, et apporte peu de calories par rapport à une alimentation à base de viande ou de produits laitiers (Messina, 1999). La graine de soja est riche en vitamines A, B, E, K et en minéraux, dont le calcium, le fer, le zinc, le potassium, le phosphore et contient une quantité importante de composés mineurs issus du métabolisme secondaire de la plante.

Un des composés du soja qui a reçu une attention considérable est celui des isoflavones qui sont responsables de plusieurs effets bénéfiques vis-à-vis de la carcinogénèse, l'athérosclérose et l'ostéoporose (Messina *et al.*, 1994; Cooke *et al.*, 1998; Messina *et al.*, 2002; Cassidy *et al.*, 2006; Kim, 2008). En plus des isoflavones, les phytates, les stérols, les saponines et les inhibiteurs de protéases font partie de ces composés potentiellement responsables des propriétés préventives du soja vis-à-vis d'un grand nombre de pathologies.

Le germe de soja présente un profil de nutriments unique par rapport à toutes les autres fractions de la graine, offrant aux fabricants de compléments alimentaires la possibilité d'apporter une valeur ajoutée intéressante aux formulations basiques des produits dérivés du soja. Le germe de soja ne représente que 2 à 3% du poids total de la graine (*Figure 20*), mais

contient à lui seul de 15 à 20 % des isoflavones totales de la graine et présente aussi une plus forte concentration en saponines, phytostérols, acides gras polyinsaturés et vitamine E que les cotylédons (Schryver, 2002).



Figure 20. Description macroscopique de la graine de soja

Grâce à sa teneur élevée en isoflavones, il peut être utilisé comme additif dans les matrices alimentaires avec un taux d'inclusion faible, typiquement de l'ordre de 1 à 2 %, ce qui permet de l'ajouter aux formulations liquides, aux produits laitiers, dermatologiques ou cosmétiques sans modifier la saveur ou l'odeur du produit final (Tiziani & Vodovotz, 2005).

Bien que les résultats issus des études cliniques et expérimentales examinant l'impact de la consommation des produits à base de soja sur la santé humaine soient contradictoires, il est tout de même important de souligner quelques résultats prometteurs quant à la valorisation du « germe de soja » : Il a été démontré que le germe de soja permet de maintenir l'équilibre du profil hormonal de la femme post ménopausée (Petri Nahas *et al.*, 2004), et de réduire le nombre de bouffées de chaleur survenant au moment de la ménopause (Szkutnik-Fiedler *et al.*, 2010). Cet ingrédient permet également d'augmenter les lipoprotéines de haute densité (HDL) correspondant au « bon cholestérol », et de diminuer la pression sanguine (Bruckert & Rosenbaum, 2011; Liu *et al.*, 2011). L'administration de germe de soja a été associée également à des propriétés préventives vis-à-vis du développement de tumeurs au niveau des cellules mammaires chez le rat (Zaizen *et al.*, 2000).

La plupart des effets du germe de soja reportés dans la littérature sont associés à la présence d'isoflavones, mais d'autres métabolites pourraient contribuer ou renforcer leur

activité biologique. Il apparaît probable que la matrice entière du germe de soja soit à considérer avec autant d'attention que des molécules individuelles isolées.

2. Les isoflavones

Parmi les composés mineurs du soja possédant des effets bénéfiques sur la santé apparaît particulièrement une classe de phytoestrogènes non stéroïdiens appelés isoflavones. La structure moléculaire des isoflavones comprend 2 cycles benzéniques liés par un noyau pyranne hétérocyclique (*Figure 21*). Cette structure est proche de celle de l'estradiol humain, naturellement sécrété chez la femme au niveau des ovaires jusqu'à la ménopause.

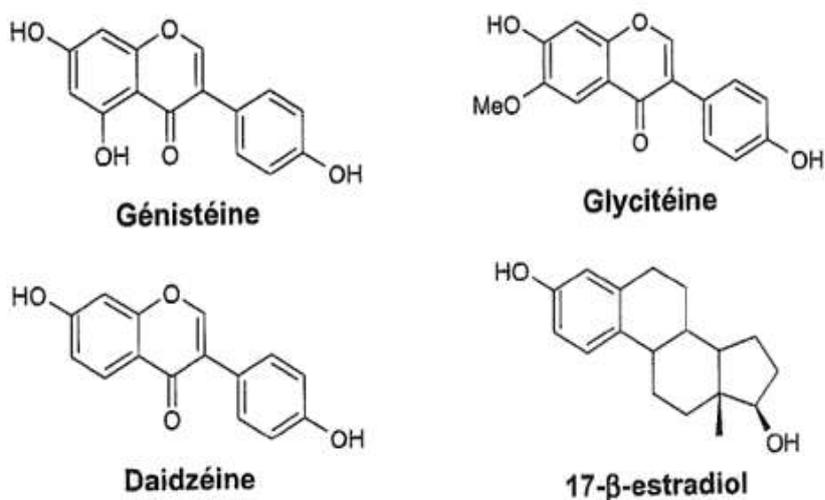


Figure 21. Comparaison structurale des phytoestrogènes du soja et du 17- β -estradiol

Dans la graine de soja, il existe 12 structures chimiques réparties en trois familles dérivées de la daidzéine, de la glycitéine et de la génistéine. Ces trois isoflavones existent sous formes : aglycones, dite «forme simple», ou «conjuguée» : glucosides, acétylglucosides, et malonyl-glucosides (Kudou *et al.*, 1991). Dans le soja non fermenté, les isoflavones se retrouvent souvent sous leur forme conjuguée ; alors que dans le soja fermenté, ce sont les formes aglycones qui dominent (Wang & Murphy, 1994).

La concentration des isoflavones dépend fortement des variétés de soja, des conditions géographiques et environnementales de culture (Rasolohery *et al.*, 2008), ainsi que des procédés industriels utilisés lors de la transformation des graines (Coward *et al.*, 1998). La concentration massique des isoflavones totales dans le germe de soja varie de 2 à 3%, ce qui représente une teneur 10 fois supérieure à celle des cotylédons (Tsukamoto *et al.*, 1995). Leur

profil est totalement différent entre ces deux fractions. Dans le germe, la daidzéine et la glycitéine représentent respectivement 40-60% et 25-40% des isoflavones totales ; alors que dans les cotylédons, la génistéine, largement majoritaire, représente 50-70% des isoflavones totales (Hubert *et al.*, 2005).

2.1. Estimation des apports en isoflavones dans diverses populations

L'estimation des apports alimentaires en isoflavones est essentielle pour l'évaluation, aussi bien sur le plan de la sécurité que celui du bénéfice éventuel de ces substances. En terme de sécurité, la connaissance de l'exposition de la population à ces substances permet de situer les apports par l'alimentation actuelle par rapport aux doses auxquelles des effets indésirables pourraient être observés. De même, en terme de bénéfice, cette estimation permet de comparer les apports aux doses auxquelles des effets favorables peuvent être observés.

Les populations asiatiques ont traditionnellement une consommation élevée en légumes et particulièrement en soja qui représente un aliment de base de l'alimentation chinoise et japonaise depuis plus de 4 000 ans. Les aliments asiatiques traditionnels à base de soja apportent 1-3 mg d'isoflavones/g de protéines et une portion de ces aliments fournit 25-40 mg d'isoflavones (Messina, 1999). Les apports moyens en isoflavones aglycones sont de : 45 mg/jour au Japon, 35 mg/jour dans les zones urbaines de Chine, 9 mg/jour dans les zones rurales de Chine, 15 mg/jour en Corée et 13 mg/jour à Singapour (AFSSA, 2005).

Les populations européennes ont globalement une alimentation de type occidental, c'est-à-dire riche en protéines et en graisses animales et pauvre en produits céréaliers et végétaux. Il est estimé que les apports moyens en isoflavones aglycones dans une alimentation occidentale typique représentent 0,4 mg/jour environ (de 0 à 2 mg/jour) dans les populations européennes et américaines. Les apports en génistéine et daidzéine dans la population française chez les non consommateurs de soja sont de 0,026 mg/j en moyenne chez les adultes et de 0,018 mg/j chez les enfants de 3 à 15 ans (AFSSA, 2005).

2.2. Biodisponibilité des isoflavones

La biodisponibilité dépend de plusieurs facteurs et de plusieurs étapes. Ces facteurs et étapes incluent : la forme chimique de la molécule lors de son absorption, les processus mis en œuvre lors de son absorption et de son métabolisme, et enfin son transport dans l'organisme jusqu'aux cellules où l'activité peut se produire. La biodisponibilité est également le reflet de l'élimination des composés. La quantité de composés biodisponibles est

ainsi la résultante d'une absorption orale, d'un métabolisme, d'une résorption intestinale et d'une élimination fécale et urinaire.

Parmi les éléments à souligner de prime abord, notons que les isoflavones ne sont généralement pas présents dans les plantes sous une forme biologiquement active (Setchell, 1998). Ils sont présents sous forme glucosides (génistine, daidzine et glycitine) (*Figure 22*). Ils acquièrent leur activité estrogénique à la suite d'une transformation métabolique par la flore bactérienne intestinale (Xie *et al.*, 2003), ou par les enzymes entérocytaires. La voie d'administration est donc cruciale, et un composé actif par voie orale comme par exemple la fomononétine, peut ne pas l'être par voie intraveineuse (Braden *et al.*, 1967). Des études ont mis en évidence que les structures glycosylées des isoflavones ont une meilleure biodisponibilité que les structures aglycones (Setchell *et al.*, 2001), alors que d'autres ont attribué aux aglycones une meilleure biodisponibilité (Izumi *et al.*, 2000). Les isoflavones glycosylées sont plus difficilement absorbées que leurs formes aglycones en raison de leur caractère hydrophile plus marqué et de leur plus haut poids moléculaire (Izumi *et al.*, 2000). Après ingestion, ces structures ne sont pas absorbées directement mais hydrolysées en leurs formes actives (aglycones) sous l'action des bactéries intestinales (Tsuchihashi *et al.*, 2008). Les structures aglycones ainsi libérées sont alors absorbées à travers l'épithélium intestinal (Setchell *et al.*, 2002). La fraction non hydrolysée atteint ensuite le côlon où les structures conjuguées seront à leur tour dégradées par des enzymes bactériennes avant d'être absorbées ou métabolisées en d'autres composés (Wiseman *et al.*, 2004). La différence de biodisponibilité entre les formes aglycones et glycosylées tient ainsi essentiellement à leur délai d'apparition dans le sang (résorption), la forme d'ingestion jouant donc probablement un rôle essentiellement en terme de cinétique de délivrance de la molécule absorbée au site d'action.

Le temps nécessaire pour atteindre le pic des concentrations plasmatiques après ingestion des isoflavones aglycones est de 4 à 7 h ; alors que lorsque les formes glucosides sont ingérées, le pic est observé entre 8 et 11 h (Setchell *et al.*, 2001). Chez l'Homme, les concentrations plasmatiques moyennes mesurées après une exposition chronique sont supérieures chez les Occidentaux à celles mesurées chez les Asiatiques pour une prise alimentaire comparable. Il se pourrait donc que, chez les Asiatiques après une exposition chronique, des mécanismes se mettent en place soit pour réduire l'absorption soit pour accélérer l'élimination. De même, il a été démontré une différence entre Asiatiques et Occidentaux dans l'activité bactérienne intestinale métabolisant la daidzéine (Zheng *et al.*,

2003) ; ce qui laisse supposer qu'une proportion significative de sujets asiatiques possède une flore intestinale capable de cataboliser rapidement la daidzéine. Ce mécanisme est peut-être responsable des différences notées sur les taux plasmatiques.

A noter qu'une ingestion de 10 mg/kg poids corporel/j chez un rat entraîne des concentrations plasmatiques de 1µM. Chez l'Homme, cette même concentration est atteinte avec moins de 1mg/kg pc/j. En règle générale, les quantités ingérées doivent être 10 fois supérieures, au moins chez les rongeurs, par rapport à celles qui sont nécessaires chez l'Homme.

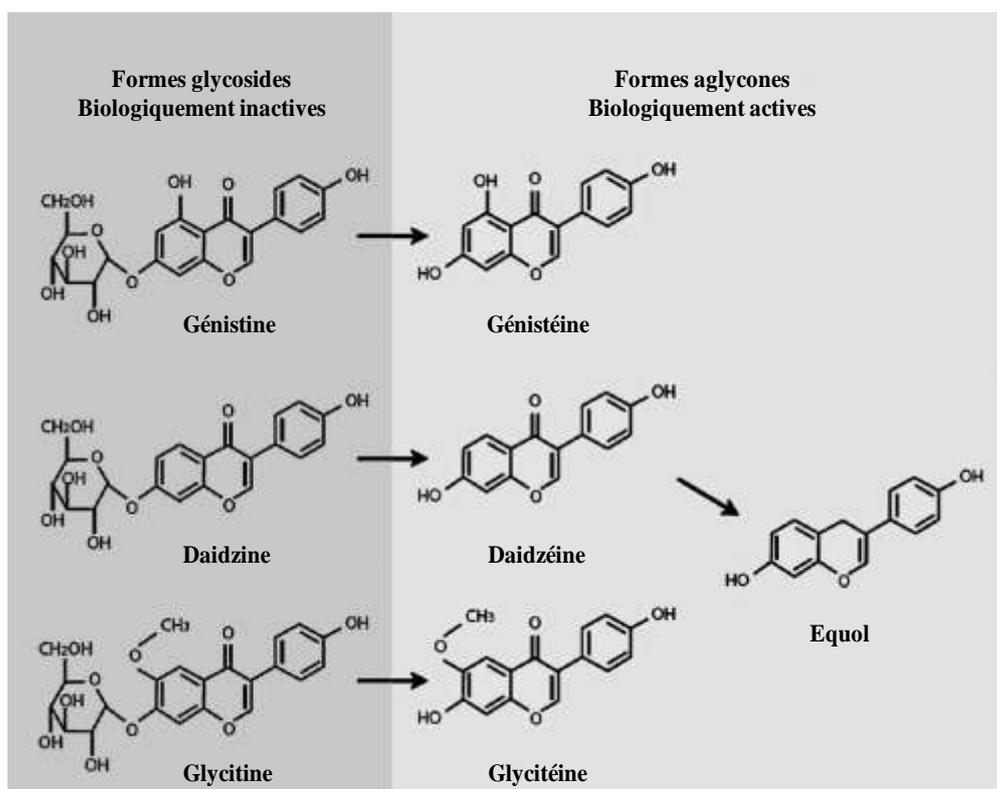


Figure 22. Biotransformation des isoflavones
(Cederroth & Nef, 2009)

2.3. Interaction avec les récepteurs aux estrogènes

Les isoflavones exercent des effets de type estrogénique, notamment chez les mammifères ; cette action étant liée à une parenté chimique structurale avec le 17β-estradiol (Price & Fenwick, 1985; Knight & Eden, 1996; Barnes *et al.*, 2000). La présence du noyau biphenolique apparaît essentielle pour la liaison avec les récepteurs aux estrogènes (REs) (Miksicek, 1995).

Les isoflavones se fixent aux deux types de REs avec une affinité plus élevée pour REβ (Kuiper *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998; Pfitscher *et al.*, 2008). La génistéine possède

une affinité 30 fois plus élevée au RE β que RE α (Kuiper *et al.*, 1998; Morito *et al.*, 2001), semblable à celle du 17 β -estradiol. L'affinité des autres isoflavones est d'environ 100 à 500 fois inférieure à celle de 17 β -estradiol. A noter que l'équol présente une affinité 10 à 80 fois plus élevée que la daidzéine pour RE α et RE β (Gruber *et al.*, 2002). Les isoflavones agissent donc comme des agonistes des REs, mais leur activité est plus faible que celle du 17 β -estradiol. À des taux suffisamment élevés (environ 100 nmol/l pour génistéine), l'effet des isoflavones peut approcher l'effet du 17- β endogène-estradiol (Kuiper *et al.*, 1998). L'effet des isoflavones dépend également du niveau d'estradiol endogène, puisque les isoflavones et l'estradiol entrent en compétition pour se lier aux REs.

2.4. Effets des isoflavones sur les cellules épithéliales intestinales, les jonctions serrées et la réponse immunitaire

Plusieurs études *in vitro* ont montré un effet protecteur de la génistéine sur les jonctions serrées de la barrière épithéliale intestinale (revue (Suzuki & Hara, 2011)). La génistéine prévient le dysfonctionnement des protéines des jonctions serrées dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Une diminution significative de l'hyper-perméabilité induite par le stress oxydatif sur des lignées humaines de cellules épithéliales intestinales (Caco-2) après exposition à la génistéine a été démontrée (Rao *et al.*, 2002). De même, la génistéine semble protéger l'intégrité de l'épithélium en réduisant le dysfonctionnement des jonctions serrées induit par l'acétaldéhyde dans des cellules Caco-2 (Atkinson & Rao, 2001; Sheth *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que la génistéine participe à la maintenance de la structure et de la fonction de la barrière épithéliale intestinale dans un modèle de porcelet (Donovan *et al.*, 2009). Satsu *et al.* ont montré que des fractions de soja riches en isoflavones inhibent la production d'IL-8 induite par le TNF- α dans les cellules Caco-2 (Satsu *et al.*, 2009). De même, l'utilisation des isoflavones pures, tels que la génistéine et la daidzéine peut inhiber la production d'IL-8 et d'IL-6 (Masilamani *et al.*, 2012).

Récemment, les études se sont focalisées sur les propriétés anti-inflammatoires des isoflavones pour leur utilisation comme complément alimentaire pour améliorer les maladies inflammatoires de l'intestin. Il a été démontré qu'une préparation riche en daidzéine protège des souris C57BL / 6 de la colite induite par le sodium de sulfate de dextrane (DSS). Les isoflavones alimentaires réduisent la production de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IFN- γ , l'IL-12 et de l'IL-6, mais augmentent la sécrétion d'IL-10 à partir des ganglions mésentériques lymphatiques (Morimoto *et al.*, 2009). De même, la génistéine réduit les

marqueurs de l'inflammation dans un modèle de colite aigüe induite par le 2,4,6-trinitro-l'acide (TNBS) en diminuant l'infiltration neutrophilaire (MPO) dans le côlon (Seibel *et al.*, 2009). Sakai *et al.* ont trouvé un effet opposé : la génistéine, la daidzéine et l'équol aggravent la colite induite par le DSS chez des souris Balb / c. L'effet de l'équol était plus prononcé que les autres isoflavones dans cette étude (Sakai *et al.*, 2011). De même, une étude a montré qu'un régime riche en phytoestrogènes pendant la période périnatale possède un effet délétère pour la descendance, en induisant des lésions tissulaires sévères lorsque la colite est induite à l'âge adulte, traduites par une augmentation d'infiltration neutrophilaire et la diminution d'expression de l'enzyme COX-2 normalement rapidement induite dans la zone inflammée (Seibel *et al.*, 2008).

En effet, les isoflavones peuvent devenir indésirables dans certains produits à base de soja couramment utilisés en alimentation, tels que les préparations infantiles de substitution que l'on utilise dans les cas d'intolérance au lait, ou l'alimentation des femmes enceintes (Setchell *et al.*, 1998; Whitten & Naftolin, 1998; Fitzpatrick, 2000; This *et al.*, 2001; Giampietro *et al.*, 2004; Todaka *et al.*, 2005; Zlotkin, 2006). Pour ces raisons, l'AFSSA (agence française de la sécurité sanitaire des aliments) recommande actuellement une dose maximale quotidienne d'isoflavones dans les aliments à base de soja (lait de soja, miso, tofu, yaourts et autres desserts au soja), limitée à 1 mg/kg du poids corporel et déconseille l'utilisation de formulations infantiles concentrées à plus de 1 mg/L en isoflavones.

2.5. Mécanismes d'action

En se basant sur leur structure similaire avec le 17β -estradiol, les isoflavones sont capables de se lier aux REs (Barnes *et al.*, 2000). L'activation des REs entraîne une cascade de mécanismes intracellulaires tels que le contrôle de l'activité des protéines G, l'adénylate cyclase, la phospholipase ou la protéine kinase (Simoncini *et al.*, 2003). L'activation de ces cascades induit des effets rapides sur le métabolisme cellulaire, y compris des changements dans la perméabilité membranaire, la concentration d'ions, la production d'oxyde nitrique (NO), etc. Ce mécanisme d'action est supposé jouer un rôle important dans les tissus qui ne sont pas considérés comme des cibles classiques de l'action d'estradiol. Dans le système cardio-vasculaire, ce mécanisme est associé à une vasodilatation des vaisseaux sanguins en raison d'une activité accrue des NO-synthases (Liu *et al.*, 2004; Pechanova & Simko, 2007; Vera *et al.*, 2007). Au niveau des cellules épithéliales, la génistéine semble supprimer la phosphorylation de la kinase induite par les stress oxydatif ou l'acétaldéhyde

empêchant ainsi la dissociation des protéines de jonctions serrées telles que ZO-1 et occludine et par conséquent l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (Suzuki & Hara, 2011) (Figure 23).

Un second mécanisme des isoflavones est leur capacité d'inhibition de l'activité d'enzymes spécifiques telles que les tyrosines kinases ou les ADN-topoisomérases I et II impliquées dans la prolifération cellulaire (Brown & Lamartiniere, 2000). Leur pouvoir antioxydant leur permettrait aussi d'inhiber la production de peroxyde d'hydrogène et la propagation des radicaux libres ou d'espèces oxygénées hautement réactives impliquées dans l'altération de l'ADN (Wei *et al.*, 1995; Ruiz-Larrea *et al.*, 1997; DiSilvestro *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2005).

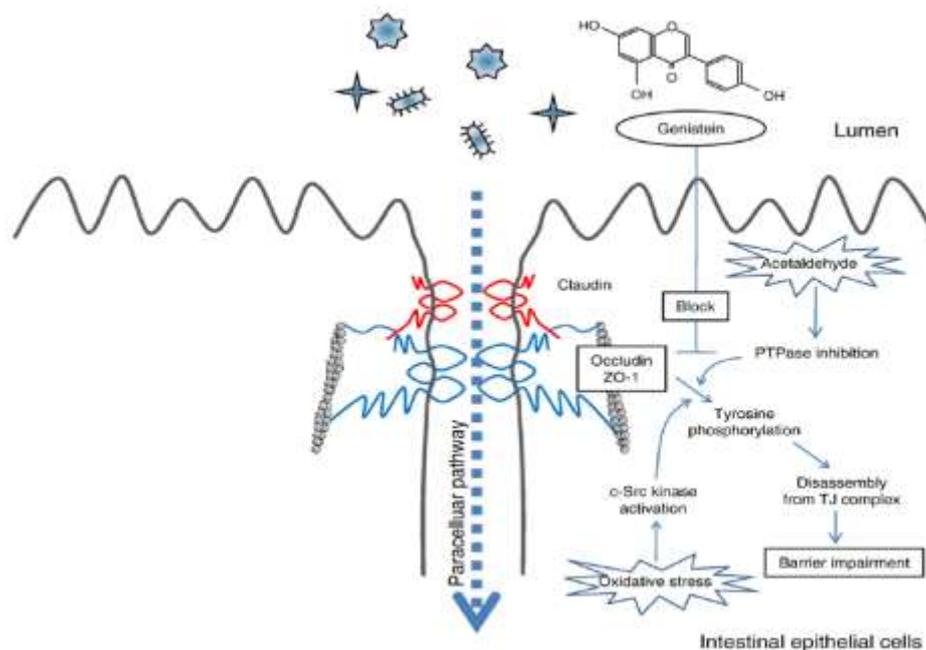


Figure 23. Mécanismes d'action impliqués dans les effets de la génistéine sur la fonction de la barrière intestinale.

La génistéine protège la barrière intestinale contre le stress oxydatif et l'acétaldéhyde. Le stress oxydatif et l'acétaldéhyde induisent la phosphorylation de la tyrosine suite à une activation des c-Src kinases ou à l'inhibition des PTPs conduisant à une altération barrière. La génistéine normalise la phosphorylation des tyrosines en inhibant protéines tyrosine kinases dont les c-Src kinases.

(Suzuki & Hara, 2011)

Les isoflavones pourraient réguler le métabolisme lipidique par une activation des PPARs (*peroxisome proliferator activated receptors*) (Dang *et al.*, 2003). Leur pouvoir antioxydant leur permettrait aussi d'agir directement contre l'hypertension et les phénomènes de coagulation sanguine (Matsuo, 2004; Park *et al.*, 2005a).

3. Les inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases ont d'abord été étudiés en raison de leurs propriétés anti-nutritionnelles, mais depuis plusieurs années, ces composés suscitent un grand intérêt en raison de leur potentiel anticancéreux, observé *in vitro* et *in vivo*.

Les plus connus sont l'inhibiteur de Bowman-Birk (BBI) et l'inhibiteur de Kunitz (KI). Le BBI est un petit peptide de 8 KDa dont 14 de ces 71 acides aminés sont des cystéines formant des ponts disulfures. Le BBI a la capacité d'inhiber l'activité de la trypsine et de la chymotrypsine (Figure 24), alors que le KI est un inhibiteur de trypsine uniquement (Birk, 1985; Koepke *et al.*, 2000).

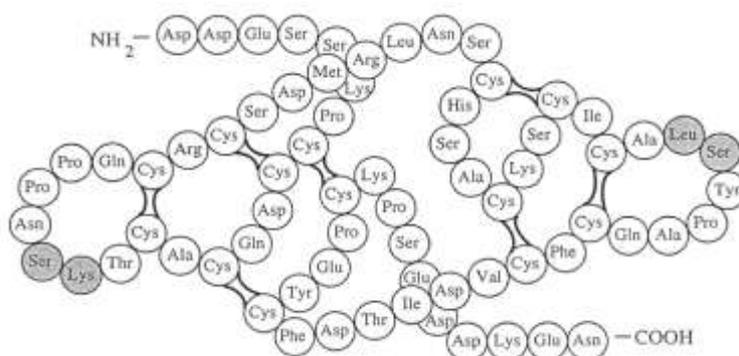


Figure 24. Structure du BBI

Le site inhibiteur de chymotrypsine apparaît sur la droite (Leu-Ser) et le site inhibiteur de trypsine apparaît sur la gauche (Lys-Ser).

(Odani & Ikenaka, 1973; Kennedy, 1998)

Les inhibiteurs de protéases sont localisés dans la fraction protéique des graines de soja (Friedman *et al.*, 1991). La concentration du BBI dans les graines entières de soja a été évaluée à 3,56 µg/g (Park *et al.*, 2005b). Des teneurs moyennes en KI et en BBI de 6,8 µg/mL et 8,2 µg/mL respectivement, ont été détectées dans des formules infantiles à base de soja (Brandon *et al.*, 2004).

L'action protectrice du BBI contre les dommages causés par les radiations ou les radicaux libres a été mise en évidence sur des cultures cellulaires de différents organes ou tissus ainsi que chez le rat, offrant un potentiel préventif sur plusieurs types de cancers, dont le cancer du côlon, des poumons, de la peau ou de la cavité buccale (Ware *et al.*, 1999; Frank & Meyskens, 2001; Kennedy *et al.*, 2002; Dittmann *et al.*, 2005). Une étude clinique a même révélé un effet protecteur du BBI contre l'hyperplasie bénigne de la prostate (Kennedy & Wan, 2002) et une diminution de l'atrophie musculaire provoquée par un étirement prolongé

des muscles chez le rat (Morris *et al.*, 2005). De même, un essai clinique récent a montré des effets bénéfiques d'un traitement par un concentré de BBI chez des patients souffrant de la RCH (Lichtenstein *et al.*, 2008).

Cependant, son mécanisme d'action n'est pas encore clairement établi. Sa capacité à inhiber les protéases, enzymes dont l'activité augmente fortement dans les cellules tumorales et les tissus précancéreux, pourrait être directement impliquée pour ralentir la propagation de la cancérogenèse (Wan *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005). Ses propriétés anti-inflammatoires pourraient également être impliquées, puisque différentes protéases libérées par les cellules de l'inflammation, telles que l'élastase, la chymase ou la cathepsine G, sont inhibées par le BBI, au même titre que la formation de peroxyde d'hydrogène et d'anion superoxyde dans les cellules inflammatoires (Larionova *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 2005).

4. Influence de la fermentation sur la composition du germe de soja

L'influence du procédé de fermentation lactique du germe de soja sur sa composition a été déterminée (*Tableau 3*).

La concentration totale des isoflavones est conservée avant et après fermentation : les pourcentages relatifs de chaque famille d'isoflavone (daidzéine, glycitéine et glycyfésoléine) sont maintenus. Cependant, des modifications importantes au niveau de leur profil de conjugaison ont été observées. Les formes aglycones, ne représentant que 3,6 % des isoflavones totales dans le germe natif, deviennent majoritaires après fermentation, au détriment des formes malonylglucosides et β -glucosides qui ne représentent plus que 36,9 % et 11,3 % des isoflavones totales dans le germe fermenté (*Tableau 3*).

Les isoflavones conjuguées ont donc été transformées en leur forme aglycone correspondante sous l'action de microorganismes possédant une activité β -glucosidase, ce qui peut être un avantage puisqu'il a été décrit dans la littérature que les structures aglycones sont plus facilement assimilées par l'organisme que les structures glucosides et que les isoflavones issues de produits fermentés présentent une meilleure biodisponibilité (Hutchins *et al.*, 1995; Izumi *et al.*, 2000).

Macronutriments et métabolites secondaires		Germe de soja non fermenté	Germe de soja fermenté
Protéines (% massique)		36,3 – 40,7	37,0 – 40,0
Lipides (% massique)		12,0 – 15,6	12,0 – 15,0
Glucides (% massique)		26 - 32	16
Minéraux (% massique)		4 - 5	4 - 5
Fibres (% massique)		10	10
Isoflavones	Total (µmol/g)	37,9	46,7
	Total (% massique, éq aglycone)	1,3	1,2
	Daidzéine (% éq aglycone)	57,8	55,2
	Glycitéine (% éq aglycone)	27,9	32,1
	Génistéine (% éq aglycone)	14,3	12,7
	β-glucosides (%)	36,8	11,3
	Malonylglucosides (%)	58,2	36,9
	Acétylglucosides (%)	1,4	1,9
	Aglycones (%)	3,6	50,0
	Saponines	Total (µmol/g)	45,3
Total (% massique, éq aglycone)		5,1	5,1
Saponine A (% éq aglycone)		55,4	52,0
Saponine B (% éq aglycone)		44,6	48,0
DDMP (% des saponines B)		75,7	45,8
Tocophérols	Total (% massique)	0,04	0,01
Phytostérols	Total (% en poudre)	0,5	0,5
Saccharose (% en poudre)		5,2	0,5
α-galacto-oligosaccharides	Stachyose (% en poudre)	9,0	6,2
	Verbascose (% en poudre)	0,3	0,3
	Raffinose (% en poudre)	1,3	0,5
Phosphore	Phosphore libre (% en poudre)	0,17	0,35
	Acide phytique	0,85	0,55
Facteur de Bowman-Birk	Eq BBI inhibition trypsine (%)	2	2
	Eq BBI inhibition chymotrypsine	0,5	0,5
Acides organiques	Acide lactique (% en poudre)	Non détecté	5,81
	Acide acétique (% en poudre)	Non détecté	0,11

Tableau 3. Influence d'un procédé de fermentation lactique sur la composition du germe de soja.
Fiche technique GENIBIO, 2005

Les α-galactooligosaccharides représentent 10,6 % de la masse sèche du germe de soja natif. Après fermentation, leur teneur totale est de 7,0 % du germe, indiquant qu'une partie de ces sucres a été consommée par les bactéries lactiques. Par contre, le saccharose a été presque entièrement consommé au cours du procédé de fermentation, sa teneur initiale dans le germe non fermenté étant de 5,2 %, et sa teneur finale à l'issue du procédé de 0,5 % (Tableau 3). De même, une quantité importante d'acide lactique a été libérée par les microorganismes,

représentant 5,8 % de la masse sèche du germe fermenté. La réduction significative des α -galactooligosaccharides est un avantage du produit fermenté, puisque la mauvaise digestibilité des produits dérivés du soja leur a souvent été attribuée (Leske *et al.*, 1993).

Les teneurs totales en saponines, phytostérols et en minéraux n'ont pas été affectées par le procédé de fermentation développé chez GENIBIO. Cependant, une modification du profil de conjugaison des saponines du groupe B liées à un groupement DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-méthyl-4H-pyran-4-one) a été observée. Leur concentration a varié de 75,7% des saponines B totales dans le germe natif à 45,8% dans le germe fermenté (*Tableau 3*), ce qui suggère que l'amélioration du goût dans la poudre fermentée peut être en partie due à la libération de molécules de maltol, reconnues pour leur arôme « caramélisé » (*Figure 25*).

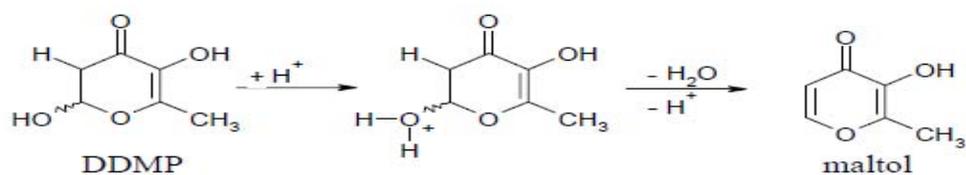


Figure 25. Mécanisme de libération du maltol en milieu acide

D'après le *Tableau 3*, la concentration massique de l'acide phytique dans le germe de soja natif est de 0,85%, et de 0,55% dans la poudre finale fermentée, indiquant que le germe de soja a perdu environ un tiers de sa teneur en phytates.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le tube digestif assure deux fonctions principales: i) propulser le bol alimentaire et absorber les nutriments ingérés qui seront métabolisés par la suite, ii) exercer une fonction de protection contre les agents luminaux indésirables (bactéries, virus, antigènes, toxines, xénobiotiques...).

De nombreux facteurs tels que le stress et l'inflammation altèrent l'intégrité de la fonction de barrière de l'intestin qui peut se traduire par une augmentation de la perméabilité épithéliale intestinale, ayant des conséquences sur la sensibilité viscérale à la distension ou encore sur l'activation de l'immunité de la muqueuse.

Une rupture de l'intégrité de la barrière intestinale a été observée aussi bien chez les patients atteints de SII que de MICI. Par ailleurs, une corrélation positive a été rapportée entre l'augmentation de la perméabilité intestinale et la douleur viscérale chez les patients SII. De plus, la sévérité des symptômes dans le cadre de ces deux maladies digestives est exacerbée par les événements de vie stressants. Le profil hormonal, et en particulier, les estrogènes, exercent un rôle dans ces pathologies compte tenu de leur capacité à réguler la perméabilité épithéliale intestinale et à moduler la réaction inflammatoire. Dans le cadre de ces deux types de pathologies digestives, des travaux récents rapportent également une augmentation de l'activité protéolytique du contenu intestinal. Toutefois, les traitements thérapeutiques disponibles à l'heure actuelle pour le SII sont peu satisfaisants probablement à cause du caractère multifactoriel de cette pathologie. Concernant les MICI, les traitements disponibles sont lourds et non dépourvus d'effets secondaires. Dans ce cas, un prolongement des périodes de rémission peut représenter un bénéfice non négligeable pour le patient.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude était d'évaluer les propriétés d'un ingrédient fermenté à base de germe de soja à l'aide de modèles animaux mimant le SII et les MICI respectivement afin de sa valorisation par un apport préclinique pour des futures allégations santé. Le rationnel de l'évaluation de cet ingrédient était basé sur sa composition intéressante, à savoir, sa teneur en composés à propriétés phytoestrogéniques (isoflavones) et sa capacité à inhiber les protéases (BBI).

Plus particulièrement, nous avons déterminé l'influence d'un traitement par l'ingrédient fermenté à base de germe de soja sur les altérations de la barrière épithéliale intestinale et de la sensibilité viscérale lors d'un stress aigu et d'une colite expérimentale chez le rat femelle. Enfin, les mécanismes d'action dépendants de la capacité phytoestrogénique et/ou d'inhibition de protéases ont été évalués dans ces deux modèles.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

**A NEW SOY GERM FERMENTED INGREDIENT DISPLAYS
ESTROGENIC AND PROTEASE INHIBITOR ACTIVITIES ABLE TO
PREVENT IRRITABLE BOWEL SYNDROME-LIKE SYMPTOMS IN
STRESSED FEMALE RATS**

Introduction et buts de l'étude: Le syndrome de l'intestin irritable, dont les symptômes sont exacerbés par des événements de vie stressants, est le plus souvent associé à une augmentation de la sensibilité viscérale et de la perméabilité intestinale. La prévalence de ce syndrome est plus élevée chez la femme, suggérant l'influence du milieu hormonal dans la symptomatologie. Chez l'animal, le stress augmente la perméabilité paracellulaire intestinale, la sensibilité viscérale et l'activité protéolytique colique. Les estrogènes sont capables de moduler la perméabilité paracellulaire et la sensibilité viscérale chez des rates ovariectomisées. Toutefois la capacité des hormones ovariennes à moduler l'hyperperméabilité intestinale et l'hypersensibilité viscérale induites par les stress n'a pas reçu d'attention. Des récepteurs aux estrogènes sont exprimés dans les cellules épithéliales intestinales où les estrogènes jouent un rôle dans le renforcement de la barrière épithéliale.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets d'un traitement par du germe de soja fermenté (SG) sur l'hypersensibilité viscérale, l'augmentation de la perméabilité intestinale ainsi que d'autres symptômes chez des rates stressées au cours du cycle sexuel et d'étudier les mécanismes d'action impliqués dans ces effets.

Méthodes: Dans un premier temps, nous avons évalué chez des rates adultes intactes les effets d'un traitement pendant 15 jours par du SG ou du 17β -estradiol benzoate (EB) en présence ou en absence de l'antagoniste des récepteurs aux estrogènes (REs) (ICI182,780) sur l'hypersensibilité viscérale et l'augmentation de la perméabilité intestinale induites par un stress de contrainte. La perméabilité paracellulaire totale a été mesurée à l'aide d'une macromolécule marquée, le $^{51}\text{CR-EDTA}$ administré par gavage oral et exprimée en % récupéré dans les urines de 24h. La sensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale progressive de 0 à 1,2 ml (intervalles de 0,4 ml) a été réalisée à l'aide d'une sonde de Fogarty. L'activité myoélectrique a été enregistrée comme index de la sensibilité viscérale à l'aide d'électrodes préalablement implantées au niveau des muscles abdominaux.

Dans un second temps, l'activité protéolytique fécale, le niveau de corticostérone plasmatique, l'expression de l'occludine (par western blotting) ainsi que de la RMCPII (rat

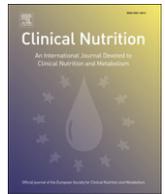
mast cell protease II) (par immunohistochimie) ont été mesurés sous les différentes conditions de traitement par le SG, l'EB, en présence ou en absence de l'ICI182,780.

Résultats: Les observations montrent que le stress augmente la perméabilité paracellulaire intestinale (en diminuant l'expression de l'occludine), la sensibilité viscérale, l'activité protéolytique et le taux de corticostérone plasmatique quelle que soit la phase du cycle. Indépendamment de la période du cycle, l'exposition chronique au SG ou EB est capable de diminuer l'hyperperméabilité intestinale et l'hypersensibilité viscérale sans changer le taux de corticostérone plasmatique. Comme pour l'EB, l'effet du SG sur la perméabilité intestinale est dû à une surexpression de la protéine transmembranaire des jonctions serrées, l'occludine. De même, SG diminue l'augmentation de l'activité protéolytique et de la densité des mastocytes induites par les stress. Les effets du SG, excepté ceux sur l'activité protéolytique, ont été bloqués par l'administration de l'ICI182,780 confirmant l'implication des REs.

Conclusion: Un traitement de deux semaines par SG ou EB supprime l'augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale et l'hyperalgésie viscérale induites par un stress aigu chez des rates intactes par une voie RE-dépendante et indépendante. Ces données suggèrent l'intérêt d'un complément alimentaire à base du germe de soja fermenté dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.elsevier.com/locate/clinu)

Clinical Nutrition

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/clinu>

A new soy germ fermented ingredient displays estrogenic and protease inhibitor activities able to prevent irritable bowel syndrome-like symptoms in stressed female rats[☆]

Lara Moussa^{a,b}, Valérie Bézirard^a, Christel Salvador-Cartier^a, Valérie Bacquié^a, Eric Houdeau^a, Vassilia Théodorou^{a,*}

^aNeuro-Gastroenterology & Nutrition Group, Toxalim, UMR 1331 INRA/INPT, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France

^bGENIBIO, 09190 Lorp-Sentaraille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 July 2011

Accepted 8 May 2012

Keywords:

Acute stress

Visceral pain

Soy

Estradiol

Intestinal paracellular permeability

SUMMARY

Background & aims: Irritable Bowel syndrome (IBS) often associated with psychological distress, is characterized by increased gut permeability and visceral sensitivity. In animals, stress increases intestinal paracellular permeability (IPP), visceral sensitivity and colonic proteolytic activity. Estradiol reduces IPP and affects visceral sensitivity in non-stressed ovariectomized rats, but whether estrogens affect stress-induced hyperpermeability and hypersensitivity in cyclic females remains unclear. We aimed to evaluate (i) the effects of a phytoestrogen-rich soy germ fermented ingredient (SG) on visceral hypersensitivity, hyperpermeability and other symptoms in stressed intact female rats, (ii) the mechanisms of action involved on the basis of both estrogenic and protease inhibitor activities of SG.

Methods: Female rats received orally for 15-d either SG, 17 β -estradiol benzoate (EB), or vehicles, with or without the estrogen receptor (ER) antagonist ICI182.780 before stress. Visceral sensitivity, IPP, faecal proteolytic activity, plasma corticosterone, rat mast cell protease II immunostaining, and occludin expression were assessed.

Results: Stress increased IPP (concomitantly to a drop in occludin expression), visceral sensitivity, faecal proteolytic activity and plasma corticosterone. Similarly to EB, SG prevented the stress-induced hyperpermeability, and hypersensitivity, without changes in plasma corticosterone. SG inhibited the increase in faecal proteolytic activity, enhanced occludin expression, and reduced the colonic mast cell density. All SG effects, except decrease on faecal proteolytic activity, were blocked by ICI182.780.

Conclusion: A 2-wk oral treatment with SG prevented the stress-induced hyperpermeability and visceral hypersensitivity in cyclic rats through ER activation, and blocked the increase in colonic proteolytic activity, suggesting that SG can be promising in IBS management.

© 2012 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

1. Introduction

Irritable bowel syndrome (IBS), is a functional bowel disorder often associated with psychological distress¹ and characterized by altered bowel habits, abdominal pain,² hypersensitivity to rectal

distension,³ and intestinal hyperpermeability.⁴ Women in reproductive age are more susceptible to develop IBS than men, and gender differences exist concerning symptoms.^{5,6} In addition, women patients report variations in abdominal pain across the menstrual cycle, exacerbated at menses when compared to other cycle periods.⁷ Since amplification of pain sensitivity overlaps a peri-menses drop in ovarian hormones, ovarian steroids have been suggested as protective against exacerbation of IBS pain before menses.⁸ In rats, stress-induced hyperpermeability is responsible for visceral hypersensitivity,⁹ and a sexual cycle-related fluctuation of permeability has been shown in the rat colon.¹⁰ High circulating estrogens decrease gut permeability during the follicular period of the cycle.¹⁰ Estradiol administered to ovariectomized (OVX) rats enhances epithelial tight junctions (TJ) sealing, leading to a decrease of paracellular permeability.¹⁰ In IBS, increased

Abbreviations: IBS, Irritable Bowel Syndrome; SG, Soy Germ; CRD, ColoRectal Distension; ERs, Estrogen Receptors; BBI, Bowman Birk inhibitor; IPP, Intestinal Paracellular Permeability.

[☆] Conference presentation: Les Journées Francophones d'Hépatho-gastro-entérologie et d'Oncologie Digestive, Paris, France (25–28 March 2010), Digestive Disease Week, New Orleans, USA (2–5 May 2010), Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie, Nantes, France (10–11 June 2010), 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona, Spain (23–27 October 2010).

* Corresponding author. Tel.: +33 561285159; fax: +33 561285145.

E-mail address: vtheodor@toulouse.inra.fr (V. Théodorou).

0261-5614/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2012.05.021>

Please cite this article in press as: Moussa L, et al., A new soy germ fermented ingredient displays estrogenic and protease inhibitor activities able to prevent irritable bowel syndrome-like symptoms in stressed female rats, *Clinical Nutrition* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2012.05.021>

intestinal permeability has been found correlated with symptoms severity.¹¹ In women IBS patients, elevated plasma cortisol both at baseline and in response to stress has been reported.¹² IBS colonic biopsies and faecal supernatants have elevated serine-protease activity vs healthy subjects.^{13,14} Mucosal application of IBS faecal supernatants increases visceral sensitivity and intestinal permeability in mice involving serine-protease activity.¹⁵ In addition, a greater number of mast cells has been observed in ileal, colonic or rectal IBS biopsies vs healthy subjects.¹⁶ Mast cell degranulation evokes hypersensitivity in rodents similar to those observed in IBS.¹⁷ Estrogen receptors (ERs) are expressed in the gastrointestinal tract, with ER β the predominant ER in the colonic mucosa.¹⁸ Estrogens through ER β activation contribute to a normal colonic epithelial barrier development in rats and humans,¹⁸ and decrease colonic permeability.¹⁰ The soy germ fermented ingredient (SG) tested contains daidzein, glycitein and genistein present in aglycone forms resulting from fermentation¹⁹ which represent the gut absorbable isoflavone forms.²⁰ Isoflavones are phytoestrogens with similar structure to 17 β -estradiol, and higher affinity for the ER β .²¹ Further, SG contains a highly stable soy-derived protease inhibitor called Bowman Birk inhibitor (BBI).²² A clinical study showed a beneficial effect of treatment with a concentrate of BBI in patients with ulcerative colitis (UC),²³ a pathology characterized by increased serine-protease activity in the colonic lumen vs healthy controls.¹⁴

The purpose of the present study was to evaluate (i) the effects of a soy germ fermented ingredient in intact female rats on visceral hypersensitivity, hyperpermeability and other symptoms in a restraint stress IBS model, and (ii) the mechanisms of action involved on the basis of both total phytoestrogenic and protease inhibitor properties of the SG.

2. Materials and methods

2.1. Animals and sexual cycle stage determination

Female Wistar rats (Janvier SA, Le Genest St Isle, France) weighing 175–200 g were housed in a temperature-controlled room (21 \pm 1 °C) with free access to water and fed standard pellets (UAR pellets, Epinay, France). Estrous cycle stages were assessed through vaginal smears as previously described.¹⁰ Only rats displaying regular cycles were used. The local committee for animal use and care had approved all experimental protocols.

2.2. Soy germ fermented ingredient

The SG, is a new soy germ fermented ingredient upcoming from GENIBIO (Lorp-Sentaraille, France) research for soy germ development as health promoting ingredient. SG industrially processed as ground powder under the trademark Primasoy[®], had an average content of isoflavones of 34.7 μ mol/g of product (55% daidzein, 30% glycitein and 15% genistein in aglycone forms). BBI was quantified in chymotrypsin inhibitory (CI) units, where 1 CI is the amount needed to inhibit 1 mg of bovine pancreatic chymotrypsin.²⁴

Soybean germ which is the raw material used for SG processing, is a fraction of the soybean seed accounting only 2% of the total seed weight and is a remarkable source of several phytochemicals.²⁵ For example, soy germ is naturally 6–10-fold more concentrated in total isoflavones than cotyledons. The fermentation processing used for the SG has been validated previously¹⁹ as appropriate for expected conversion of glycosylated isoflavones into aglycones (highly bioavailable forms), global preservation of total amounts of isoflavones and BBI as well as for increase in the antioxidant activity of the final product.

The SG powder was diluted in water and prepared daily in order to administer in 1 ml volume, 0.45 mg isoflavone aglycone forms equivalent/d/rat and 1 BBI CI/d/rat.

2.3. Animal preparation

Rats were surgically prepared for abdominal muscle electromyography.²⁶ Briefly, animals were equipped with three groups of three NiCr wire electrodes (60 cm in length, 80 μ m in diameter) implanted into the abdominal external oblique musculature. Electrodes were exteriorized on the back of the neck and protected by a glass tube attached to the skin. The myoelectric activity was recorded on an electromyograph (EMG) (Mini VIII; Alvar, Paris, France) using a short time constant (0.03 s) to remove low-frequency signals (<3 Hz).

2.4. Acute stress

Stress sessions were performed at the same time of day (between 10 am and 12 noon) to minimize influence of circadian rhythms. Stress effects were studied using the wrap partial restraint stress (PRS) model.²⁷ This acute model of stress is commonly used on the basis of hypersensitivity to colorectal distension and gut barrier impairment similar to those occurring in IBS patients.^{28,29} Animals were lightly anesthetized with diethyl-ether and their fore shoulders, upper forelimbs, and thoracic trunk were wrapped in a confining harness of paper tape to restrict, but not to prevent body movements during 2 h. Rats recovered from ethyl-ether within 2–3 min and immediately moved around in their cage, although the restricted mobility of their forelimb prevented grooming behavior. Non-stressed rats, considered as controls, were not wrapped and were allowed to move freely in their cages.

2.5. Intestinal paracellular permeability

Intestinal paracellular permeability (IPP) was performed using ⁵¹Cr-EDTA (Perkin–Elmer Life Sciences, Paris, France) as a marker of tight junctions paracellular permeation.³⁰ To determine total gut permeability, 0.7 μ Ci of ⁵¹Cr-EDTA were diluted in 500 μ l of saline given *per os* directly after PRS. Animals were placed in metabolic cages for faeces and urine separated collection during 24 h. The radioactivity in urine was measured on a gamma counter (Cobra II, Packard Meriden, CT, USA). Permeability to ⁵¹Cr-EDTA was expressed as percentage of administered radioactivity recovered in urine.

2.6. Colorectal distension

Rats were accustomed to be in polypropylene tunnels (6 cm diameter, 25 cm length) for 2-d before colorectal distension (CRD). A balloon (2 mm diameter; 2 cm length) consisting of an arterial embolectomy catheter (Fogarty, Edwards Laboratories Inc., Santa Anna, CA, USA) was introduced at 1 cm from the anus and fixed at the base of the tail. The balloon was progressively inflated in stepwise of 0.4 ml, from 0 to 1.2 ml, each step of inflation lasting for 5 min. The balloon was filled with tepid water to avoid temperature contrast.²⁶

2.7. Western blot analysis for occludin

After sacrifice, colonic samples were collected in dry ice and stored at –80 °C until processed. Proteins were extracted with RIPA buffer and protein concentrations assessed using the BCA-200 Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Equal amounts of protein extracts were separated in 10% SDS–polyacrylamide gel and

transferred onto 0.45 µm nitrocellulose membrane (Whatman, Dominique Deutscher, Brumath, France). The membrane was blocked 1 h with Odyssey blocking buffer (Rockland, Tebu-bio, France), then incubated overnight at 4 °C with either a primary rabbit polyclonal antibody directed against occludin (65 kDa) 1/1000 (Zymed; Cergy Pontoise, France) or against GAPDH (35 kD) 1/1000 (Cell Signaling Technology, Ozyme, St Quentin-en Yvelines, France) used as an internal standard. After washing, membranes were incubated with fluorescent CF770 anti rabbit 1/10,000 antibody (Biotium, Hayward, CA) with gentle rocking and protected from light. Finally, they were scanned and band intensity was analyzed on infrared imaging system Odyssey (Li-Cor, Lincoln, NE). Occludin expression was assessed relative to GAPDH for each sample analyzed.

2.8. Plasma corticosterone

Blood was collected in EDTA-coated tubes, kept on ice then centrifuged (10 min, 5000 g), and plasma was stored at –80 °C until assay. Plasma levels of corticosterone were measured using a commercially available HS EIA kit (Immunodiagnostic Systems EURL, Paris, France) according to the manufacturer's instructions.

2.9. Faecal proteolytic activity

Supernatants of faecal homogenates (25 µl) were incubated with 1 ml of reaction buffer (0.15 M/L NaCl and 20 mmol/L Tris–HCl, pH 8.5) and 1 ml of 0.5% (w/v) azocasein (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) at 37 °C. The reaction was stopped after 20 min with 1 ml of 10% (v/v) trichloroacetic acid (Sigma). Following centrifugation, absorption of the clear supernatant was measured at 366 nm. Proteolytic activity of the supernatants was normalized to protein content.

2.10. Rat mast cell protease II immunohistochemistry

Colonic tissue samples were fixed in 4% formalin and immersed for 24 h in 30% of sucrose at 4 °C. Samples were embedded in Tissue Tek medium (Euromedex, Souffelweyheim, France) and frozen in isopentane at –45 °C. Cryostat sections (7 µm) were post-fixed with acetone (10 min, –20 °C) and hydrated in phosphate-buffered saline (PBS)-Tween. After incubation in blocking solution (PBS-Tween-BSA 1% – donkey serum 2%), sections were incubated overnight at 4 °C with sheep anti-rat mast cell protease (RMCP) II (1/500) (Moredun, Midlothian, UK) antibodies. Sections were then washed in PBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with Alexa fluor 594-conjugated immunoglobulin G (IgG) donkey anti-sheep (1/2000) antibodies (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Sections were mounted in Vectashield Hard set mounting medium (Clinisciences, Montrouge, France) and examined under a Nikon 90i fluorescence microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). Mast cells number per mm² of mucosa and the area of mast cells (µm²) were quantified using Nikon-Elements-Ar software.

2.11. Experimental protocol

In three series of experiments, 10 groups of eight female rats were treated orally for 15-d with either SG (groups 1, 5 and 9), 17β-estradiol benzoate (EB; 0.6 mg/kg/day; groups 2, 6 and 10), SG vehicle (1 ml water; groups 3 and 7), or EB vehicle (0.2 ml of oil; groups 4 and 8) (Fig. 1). An ER antagonist ICI182.780 (2 mg/kg/day, s.c; groups 9, 10) was administered from day 10–15 of treatment. At day 15, rats were subjected to PRS (groups 5–10) or not (groups

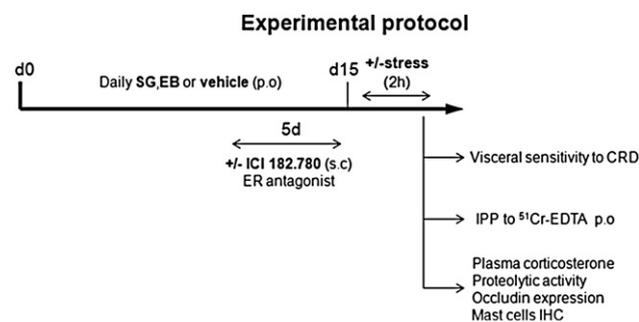


Fig. 1. Experimental setting of the study depicting the period of treatments and time points for analysis. p.o: per os; IHC: immunohistochemistry.

1–4). In the first series of experiments, rats were equipped with electrodes and CRD was applied in either the follicular (proestrus and estrus rats) or the luteal (metestrus and diestrus rats) period of the sexual cycle 20 min after the stress session. In the second series, rats in the follicular or the luteal phase of the cycle received ⁵¹Cr-EDTA orally at the end of the stress session for IPP assessment. In the last series of experiments, animals were sacrificed and blood samples were collected to assess plasma corticosterone level. Faecal pellets and colonic segments were collected for proteolytic activity assessment, immunohistochemistry and Western blotting respectively (Fig. 1).

2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was done by running GraphPad Prism software (version 4; GraphPad San Diego, USA). One-way ANOVA was used to examine the effects of the different treatments on IBS-like symptoms. When ANOVA showed significant effects, the differences between means were determined post hoc by using Tukey's honestly difference test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

3. Results

3.1. Effects of SG and EB on stress-induced increase of intestinal paracellular permeability

All non-stressed female rats receiving the SG or EB vehicle exhibited a lowered IPP to ⁵¹Cr-EDTA during the follicular phase of the sexual cycle vs the luteal period ($p < 0.05$) (Fig. 2). In the same rats, acute stress increased IPP ($p < 0.05$ vs non-stressed vehicle rats) (Fig. 2), and this increase was higher when stress was applied during the luteal period of the cycle ($p < 0.05$ vs follicular). The oral SG treatment totally prevented the stress-induced increase in IPP whatever the period of the sexual cycle (Fig. 2A, $p < 0.01$ vs stressed vehicle rats). A similar effect was observed with the oral EB treatment (Fig. 2B). Both SG and EB inhibitory effects on stress-induced hyperpermeability were blocked by the co-administration of ICI182.780 (Fig. 2).

3.2. Effects of SG and EB on stress-induced visceral hypersensitivity

Acute stress enhanced ($p < 0.01$) visceral sensitivity to high volume distensions (0.8 and 1.2 ml) in the vehicle groups (Fig. 3) vs controls. When sensitivity to CRD was assessed during the sexual cycle, the abdominal response was greater ($p < 0.05$) in rats during the follicular vs the luteal phase in non-stressed vehicle groups (Fig. 3A). The SG treatment, similarly to EB, decreased ($p < 0.01$) the

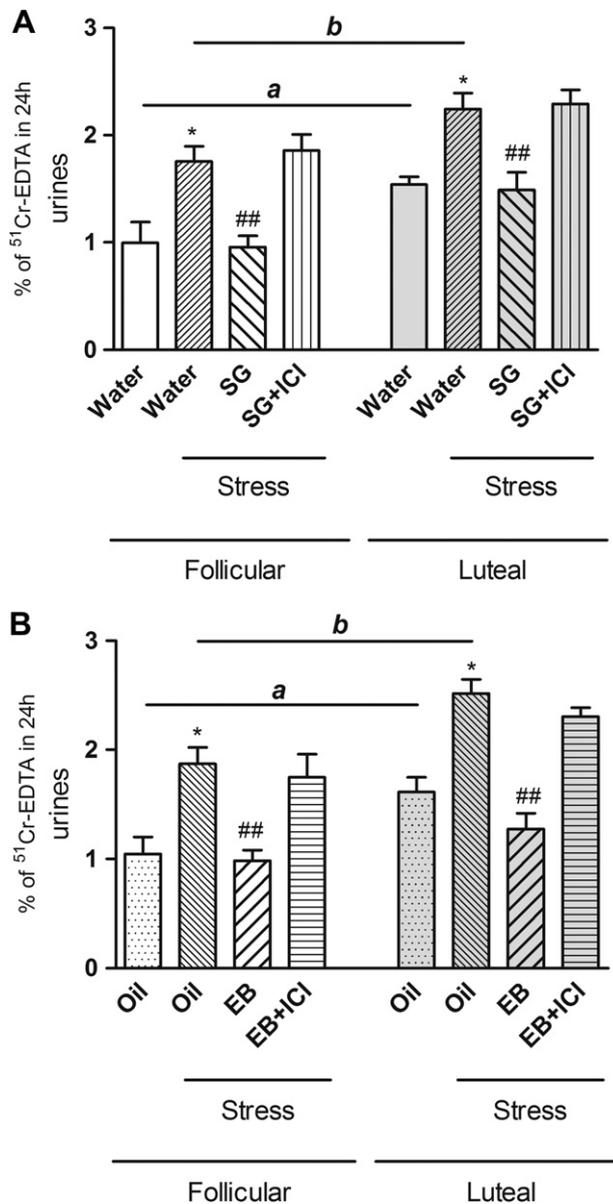


Fig. 2. Effects of SG (A) and EB (B), in presence or absence of the ER antagonist ICI182.780, on intestinal paracellular permeability in stressed female rats during the sexual cycle. Data are expressed as means \pm SEM. One way-ANOVA with post hoc comparison by Tukey test was used to analyze the data. * $p < 0.05$ vs non-stressed vehicle, ## $p < 0.01$ vs stressed vehicle; ^a $p < 0.05$ vs non-stressed vehicle and ^b $p < 0.05$ vs stressed vehicle in follicular phase.

stress-induced hypersensitivity to CRD (Fig. 3), while concomitant treatment with ICI182.780 completely reversed the inhibitory effects of SG and EB (Fig. 3B, C).

3.3. Effects of SG and EB on occludin expression in stressed rats

In basal conditions, SG and EB treatment did not affect the protein expression of occludin compared to the vehicle group (Fig. 4). Acute stress induced a sharp decrease in occludin expression compared to non-stressed animals ($p < 0.01$), while SG, similarly to EB, totally prevented the stress-induced decrease of occludin expression (Fig. 4). Co-administration of ICI182.780 reversed the effect of SG and EB on the stress-induced decrease of occludin expression (Fig. 4).

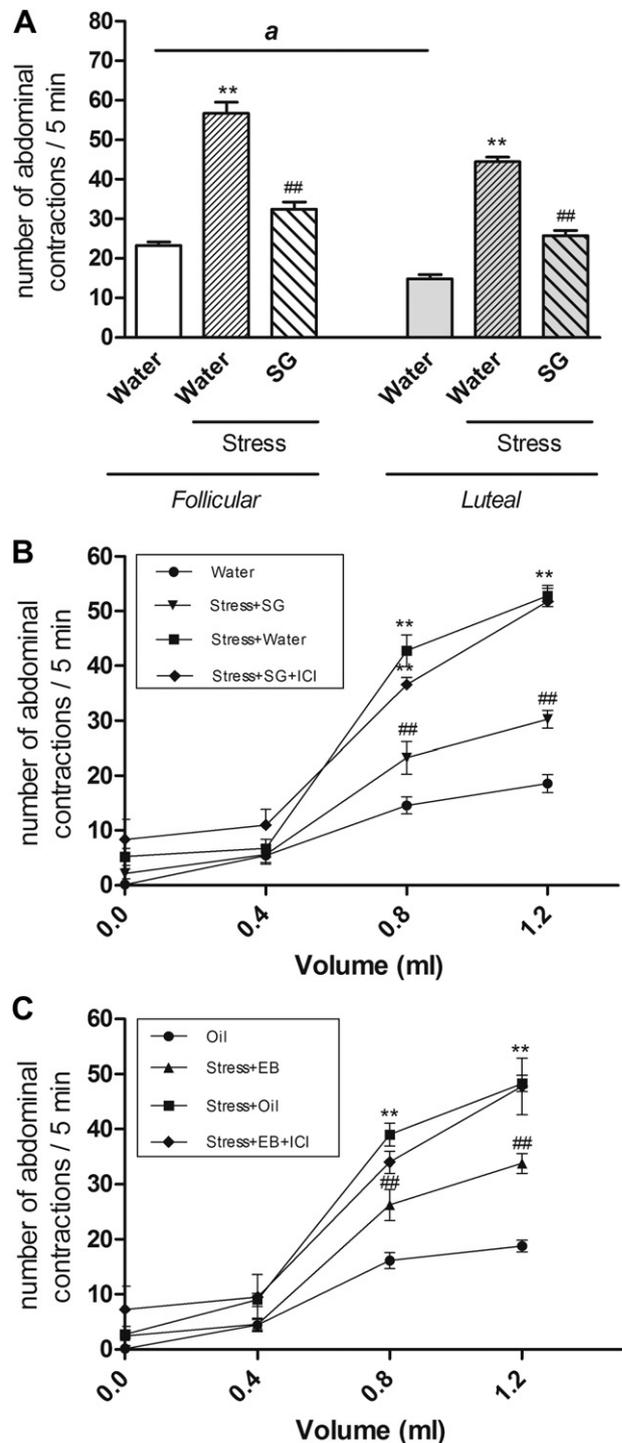


Fig. 3. Influence of sexual cycle periods on stress-induced visceral hypersensitivity in response to CRD in SG treated rats at 1.2 ml of distension (A). Effects of SG (B) and EB (C) in presence or absence of the ER antagonist ICI182.780 on visceral sensitivity in response to CRD in stressed cyclic female rats. Data are expressed as means \pm SEM. One way-ANOVA with post hoc comparison by Tukey test was used to analyze the data. * $p < 0.01$ vs non-stressed vehicle, ## $p < 0.01$ vs stressed vehicle, ^a $p < 0.05$ vs non-stressed vehicle in follicular phase.

3.4. Effects of SG on plasma corticosterone level and of SG and EB on faecal proteolytic activity

In basal conditions, non-stressed rats receiving SG did not exhibit changes in plasma corticosterone level compared to vehicle

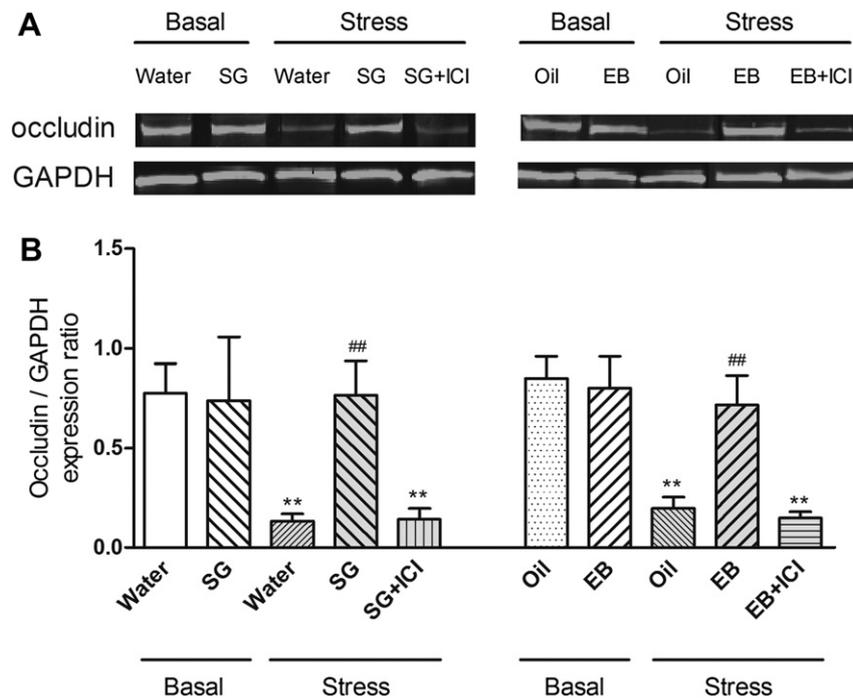


Fig. 4. Western blot for the evaluation of the effects of SG and EB treatment on occludin expression in the colon of stressed cyclic female rats in presence or absence of the ER antagonist ICI182.780. (A) Western blotting for occludin and GAPDH expression. (B) Occludin/GAPDH expression ratio. Data are expressed as means \pm SEM. One way-ANOVA with post hoc comparison by Tukey test was used to analyze the data. ** $p < 0.01$ vs non-stressed vehicle, ## $p < 0.01$ vs stressed vehicle.

controls (Fig. 5A). Moreover, no changes in faecal proteolytic activity was observed after SG or EB treatment in basal conditions (Fig. 5B). Acute stress increased both parameters ($p < 0.01$) (Fig. 5). Both stress-induced increase in plasma corticosterone and faecal proteolytic activity were not affected by sexual cycle phases (data not shown). The SG treatment did not change the stress-induced enhancement of plasma corticosterone level compared to stressed vehicle group (Fig. 5A), while a sharp depletion in the faecal proteolytic activity was observed after SG or EB treatment in the stressed group (Fig. 5B), reaching similar levels to those observed in non-stressed vehicle rats. ICI182.780 did not affect the SG/EB-induced decrease in faecal proteolytic activity of stressed rats (Fig. 5B).

3.5. Effects of SG and EB on colonic mast cells

Mast cell area immunolabelled for RMCPII and density of RMCPII-positive cells in the colonic mucosa were used for determination of mast cell activation and mastocytosis, respectively (Fig. 6). No change in these two parameters was observed during the sexual cycle in non-stressed vehicle rats (data not shown). In stressed rats, the immunolabelled cell surface for RMCPII decreased vs non-stressed vehicle controls ($p < 0.01$) (Fig. 6A). SG and EB treatment did not prevent the stress-induced drop in mast cell area (Fig. 6A). In contrast, while an acute stress did not change the density of RMCPII-positive cells in the colonic mucosa compared to non-stressed vehicle (Fig. 6B), SG, similarly to EB, decreased the density of RMCPII-positive cells vs the vehicle controls ($p < 0.05$) (Fig. 6B). Co-treatment with ICI182.780 in stressed rats blocked the SG/EB-induced decrease in RMCPII-positive mast cell density (Fig. 6B).

4. Discussion

This study shows that a daily oral treatment of female cyclic rats with a soy germ fermented ingredient, namely SG, prevents

intestinal hyperpermeability and visceral hypersensitivity induced by an acute stress. The inhibitory effects of SG on both stress-related symptoms mimicked those of oral treatment with estradiol, and were reversed by the ER antagonist ICI182.780, suggesting that the preventive effects of SG involve soy isoflavones acting on ERs. SG reduced the density of colonic resident mast cells of stressed rats through ER-ligand activity, and prevented the stress-induced increase in faecal proteolytic activity. The latter mechanism was not supported by estrogenic activity of soy isoflavones, but likely involved the protease inhibitor activity of BBI present in the SG. All SG effects appeared without changes in plasma corticosterone, suggesting that these effects do not occurred through down-regulation of the HPA axis response to stress. We show that an oral treatment by SG in cyclic female rats may reverse acute stress-induced IBS-like symptoms through two distinct pathways involving ERs in the gastrointestinal (GI) tract and BBI protease inhibitor activity.

IBS is characterized by chronic abdominal pain associated with altered bowel habits,² both influenced by hormonal status in women patients.^{8,31} Increased gut permeability is also reported in IBS.⁴ The exacerbation of IBS symptoms is often associated with anxiety and stressful life events.³² In rats, stress also increases IPP and visceral sensitivity.⁹ We show that these IBS-like symptoms are influenced by hormonal changes across the sexual cycle. In stressed and non-stressed rats, IPP was lower in the follicular phase of the cycle compared to luteal, as recently observed.¹⁰ ERs are widely distributed in the gut with predominant expression of ER β in epithelial cells.³³ Estradiol reduces intestinal permeability through ER β -mediated upregulation of TJ protein expression in the rat colon.¹⁰ We show that an oral SG treatment in intact female rats prevented the stress-induced hyperpermeability whatever the period of the cycle. This effect appeared concomitantly to increased occludin expression, a TJ protein target for estradiol-mediated enhancement of gut epithelial barrier.¹⁰ The preventive effect of SG on stress-increased IPP was mimicked by estradiol, and occurred through ER-ligand activity since the co-administration of the ER

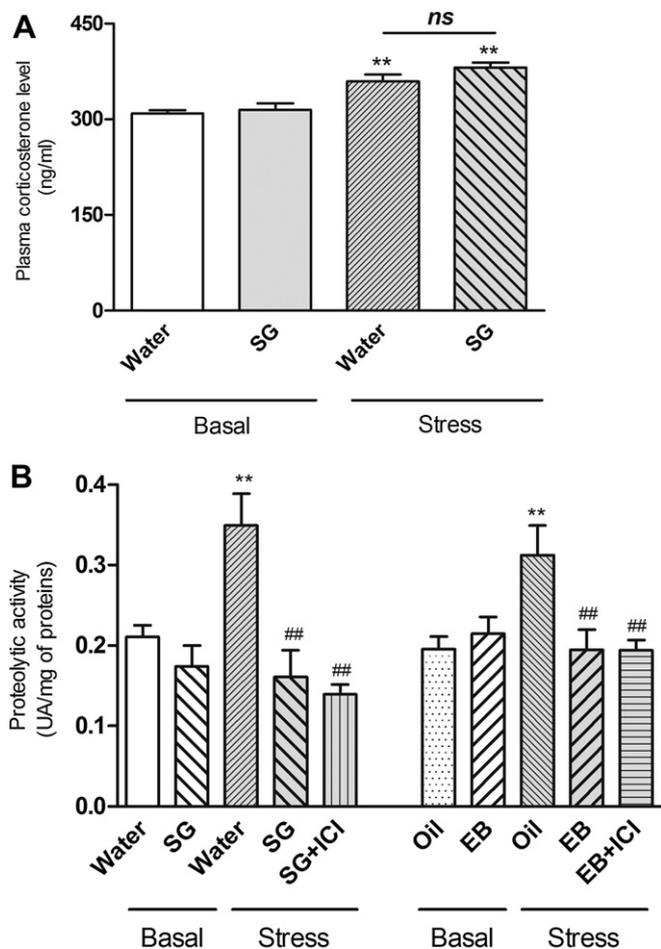


Fig. 5. Effects of SG treatment on stress-induced changes in plasma corticosterone level (A), and of SG and EB on faecal proteolytic activity (B) in female rats in presence or absence of the ER antagonist ICI182.780. Data are expressed as means \pm SEM. One way-ANOVA with post hoc comparison by Tukey test was used to analyze the data. ** $p < 0.01$ vs non-stressed vehicle, ## $p < 0.01$ vs stressed vehicle, ns = non significant.

antagonist ICI182.780 blocked these effects. The SG treatment used is concentrated in isoflavones, mainly daidzein and genistein, two classes of phytoestrogens with higher affinity for ER β .³⁴ These data strongly suggest that estrogenic activity of SG isoflavones is involved in the prevention of stress-induced hyperpermeability.

IBS patients show a lowered threshold for visceral pain perception,³ exacerbated by stress and anxiety.^{35,36} The menstrual cycle-related hormonal fluctuations influence visceral sensitivity.⁸ In animals, estradiol enhances visceral sensitivity, prevented by ovariectomy and reversed by estradiol in OVX rats.³⁷ This pronociceptive effect of estradiol occurs through a systemic modulation of spinal cord processing and reflex responses to colorectal stimuli.³⁷ We confirm an increase in the abdominal response during the follicular phase in non-stressed rats vs the luteal period, and we show that acute stress did not affect the sexual cycle-related fluctuations in visceral sensitivity. SG treatment in cyclic rats sharply inhibited the stress-induced visceral hypersensitivity, showing antinociceptive properties of SG in stressed females under natural sex steroid impregnation. To confirm that this preventive effect was due to estrogenicity of SG, we report that estradiol orally administered to cyclic rats decreased stress-induced visceral hypersensitivity, and that both SG and estradiol effects were blocked by the ICI182.780. Further, the SG efficacy in lowering visceral hypersensitivity appeared without changes in plasma corticosterone suggesting that this SG effect involves ER-ligand

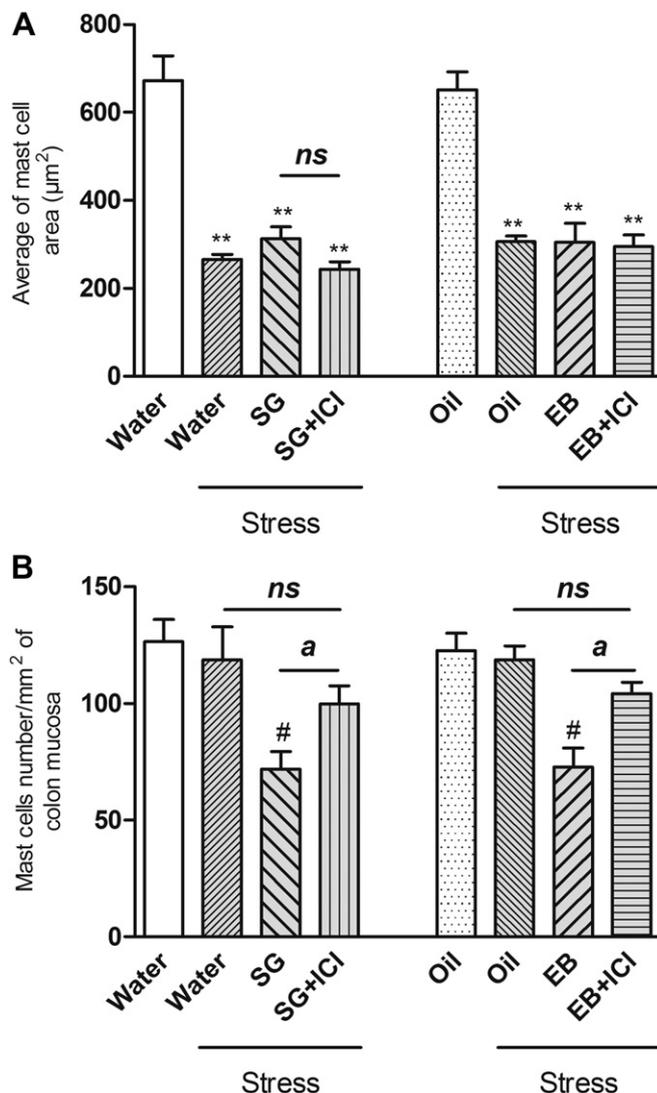


Fig. 6. Effects of SG and EB treatment on stress-induced changes in colonic mast cell area (RMCP11 immunostaining) (A) and mast cell density (number of RMCP11 positive cells) (B) in presence or absence of the ER antagonist ICI182.780 in cyclic female rats. Data are expressed as means \pm SEM. One way-ANOVA with post hoc comparison by Tukey test was used to analyze the data. ** $p < 0.01$ vs non-stressed vehicle, # $p < 0.05$ vs stressed vehicle, ns = non significant, ^a $p < 0.05$ between groups.

isoflavone activity in the intestine. It is surprising that chronic oral administration in cyclic rats of a phytoestrogen rich ingredient, as well as estradiol, decreased the stress-induced hypersensitivity, whereas a single subcutaneous injection of estradiol in OVX rats induced pronociceptive response.³⁷ If ovariectomy in falling gonadal hormone levels reveals an estrogen-mediated enhancement of spinal cord processing to noxious distension,³⁷ our study shows that estradiol or SG orally administered to cyclic rats did not influence the already primed nociceptive pathway by endogenous sex hormones. In contrast to OVX rats³⁸ or postmenopausal women,³⁹ isoflavones administration does not alter circulating estradiol in intact rats.⁴⁰ Herein, it is likely that the high bioavailability of isoflavones in the gut after SG treatment triggers intestinal epithelial ERs-ligand activity, resulting in decreased visceral sensitivity linked to SG-mediated decrease of IPP. Indeed, it has been shown that stress-induced visceral hypersensitivity results from enhanced epithelial permeability.⁹ Increased gut permeability may lead to an excessive uptake of luminal agents able to activate mucosal immune cells, releasing mediators that sensitize afferent

nerve terminals, leading to visceral hypersensitivity. In IBS, a similar correlation between gut permeability and visceral sensitivity occurs.¹¹ Interestingly, we also report that SG treatment through ERs signaling prevents visceral hypersensitivity and gut hyperpermeability induced by a chronic stress, namely neonatal maternal deprivation (supplementary data), another animal model of IBS.^{41,42} This suggests that SG estrogenic properties may also counteract chronic stress-induced gut barrier alterations. We specify that the preventive effects of SG were obtained by a daily oral exposure to very low dose of isoflavones equivalent aglycone forms (0.45 mg/rat/day), close to the daily authorized isoflavone intake in humans (1 mg/kg/day) by European safety guidelines.

Mast cells are mucosal immune cells playing a pivotal role in the gut response to stress. Acute stress induces CRF dependent mucosal mast cell degranulation⁴³ and/or activation.⁴⁴ We show that mucosal mast cell area was reduced in stressed rats whereas the mast cell density remained unchanged, suggesting that stress induces a mast cell degranulation without affecting mucosal mast cell number. The SG treatment did not prevent stress-induced mast cell degranulation but significantly decreased resident mast cell density, an effect also mediated by ERs. Genistein and daidzein are able to inhibit mast cell proliferation and growth.⁴⁵ The SG-induced reduction in resident mast cells may lead to less global mediators release after stress-induced mast cell degranulation. Local application of isoflavonoids such as equol prevents mast cell infiltration in cutaneous inflammation.⁴⁶ Daidzein is the major isoflavone contained in the SG (55%), and equol is its main bioavailable metabolite in the gut after bacterial biotransformation.⁴⁷ We hypothesize that SG encompassing daidzein and genistein in their bioactive aglycone forms may promote inhibition of mucosal mastocytosis.

A second mechanism for SG effects is linked to the presence of BBI, known as protease inhibitor. The BBI is an 8-kDa protein, of which 14 of its 71 amino acid residues are cysteines forming intramolecular disulfide bonds. This tightly disulfide-bonded structure contributes to the high stability of BBI, which can withstand boiling temperatures without losing activity and can survive intestinal transit.⁴⁸ BBI inhibits activated tissue proteases in colitic rats.⁴⁹ A clinical trial reports a beneficial effect of treatment by a concentrate of BBI in patients with UC²³ a pathology characterized by increased serine-protease activity in the colonic lumen.¹⁴ IBS is also characterized by increased faecal serine-protease activity.¹⁴ Mucosal application of IBS faecal supernatant induces visceral hypersensitivity and hyperpermeability in mice through proteinase activated receptor (PAR)-2 receptor activation.¹⁵ Noteworthy, acute stress triggers pancreatic trypsin secretion leading to increased proteolytic activity in the colonic lumen blocked by protease inhibitors and a PAR-2 antagonist.⁵⁰ SG prevented the stress-increased faecal proteolytic activity but it did not affect basal proteolytic activity in non-stressed rats suggesting that SG treatment containing 1 CI of BBI can be considered as safe. Accordingly, a 12-wk BBI concentrate treatment in UC patients at 100 CI/d did not show adverse effects.²³

Finally, the SG treatment exerts beneficial effects on stress-induced visceral hypersensitivity and epithelial barrier impairment through (i) its ability to exert a local estrogenic-like effect linked to the isoflavones presence and (ii) the faecal proteolytic activity inhibition by the BBI. These data suggest that SG can be promising in the IBS management.

Statement of authorship

LM carried out the study, sample analysis, data analyzes, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. VBe, CS-C and VBa helped to carry out the study. EH and VT conceived the

study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

None of the authors has a conflict of interest to disclose.

Acknowledgments

Part of the first author PhD fellowship was funded by GENIBIO. Operating costs of this work were funded partly by INRA, GENIBIO, Midi-Pyrenees Region, ANRT (Association Nationale de Recherche et de Technologie) and supported by a grant from "Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie".

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2012.05.021>.

References

- Longstreth GF. Definition and classification of irritable bowel syndrome: current consensus and controversies. *Gastroenterol Clin North Am* 2005;**34**:173–87.
- Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999;**45**(Suppl. 2):II43–7.
- Ritchie J. Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* 1973;**14**:125–32.
- Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, et al. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000;**47**:804–11.
- Osterberg E, Blomquist L, Krakau I, Weinryb RM, Asberg M, Hultcrantz R. A population study on irritable bowel syndrome and mental health. *Scand J Gastroenterol* 2000;**35**:264–8.
- Thompson WG, Heaton KW, Smyth GT, Smyth C. Irritable bowel syndrome in general practice: prevalence, characteristics, and referral. *Gut* 2000;**46**:78–82.
- Smith YR, Stohler CS, Nichols TE, Bueller JA, Koeppe RA, Zubietta JK. Pronociceptive and antinociceptive effects of estradiol through endogenous opioid neurotransmission in women. *J Neurosci* 2006;**26**:5777–85.
- Houghton LA, Lea R, Jackson N, Whorwell PJ. The menstrual cycle affects rectal sensitivity in patients with irritable bowel syndrome but not healthy volunteers. *Gut* 2002;**50**:471–4.
- Ait-Belgnaoui A, Bradesi S, Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L. Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* 2005;**113**:141–7.
- Braniste V, Leveque M, Buisson-Brenac C, Bueno L, Fioramonti J, Houdeau E. Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *J Physiol* 2009;**587**:3317–28.
- Zhou Q, Zhang B, Verne GN. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* 2009;**146**:41–6.
- Chang L, Sundaresh S, Elliott J, Anton PA, Baldi P, Licudine A, et al. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2009;**21**:149–59.
- Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, et al. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 2007;**117**:636–47.
- Roka R, Rosztochy A, Leveque M, Izbeki F, Nagy F, Molnar T, et al. A pilot study of fecal serine-protease activity: a pathophysiologic factor in diarrheal-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;**5**:550–5.
- Gecse K, Roka R, Ferrier L, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, et al. Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 2008;**57**:591–9.
- Weston AP, Biddle WL, Bhatia PS, Miner Jr PB. Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1993;**38**:1590–5.
- Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L. Mast cell degranulation induces delayed rectal allodynia in rats: role of histamine and 5-HT. *Dig Dis Sci* 1998;**43**:727–37.
- Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y, et al. Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:2959–64.

19. Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F, Daydé J. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem* 2008;**109**:709–21.
20. Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2002;**76**:447–53.
21. Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, et al. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull* 2001;**24**:351–6.
22. Birk Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *Int J Pept Protein Res* 1985;**25**:113–31.
23. Lichtenstein GR, Deren JJ, Katz S, Lewis JD, Kennedy AR, Ware JH. Bowman-Birk inhibitor concentrate: a novel therapeutic agent for patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2008;**53**:175–80.
24. Kennedy AR, Szuhaj BF, Newberne PM, Billings PC. Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, Bowman-Birk inhibitor concentrate. *Nutr Cancer* 1993;**19**:281–302.
25. Schryver T. Increasing health benefits using soy germ. *Cereal Food World* 2002;**47**:185–8.
26. Morteau O, Hachet T, Caussette M, Bueno L. Experimental colitis alters visceromotor response to colorectal distension in awake rats. *Dig Dis Sci* 1994;**39**:1239–48.
27. Williams CL, Peterson JM, Villar RG, Burks TF. Corticotropin-releasing factor directly mediates colonic responses to stress. *Am J Physiol* 1987;**253**:G582–6.
28. Ait-Belgnaoui A, Han W, Lamine F, Eutamene H, Fioramonti J, Bueno L, et al. Lactobacillus farciminis treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction. *Gut* 2006;**55**:1090–4.
29. Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats. *Neurogastroenterol Motil* 2002;**14**:75–82.
30. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995;**108**:1566–81.
31. Heitkemper MM, Cain KC, Jarrett ME, Burr RL, Hertig V, Bond EF. Symptoms across the menstrual cycle in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003;**98**:420–30.
32. Drossman DA, Ringel Y, Vogt BA, Leserman J, Lin W, Smith JK, et al. Alterations of brain activity associated with resolution of emotional distress and pain in a case of severe irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2003;**124**:754–61.
33. Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vantoros G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, et al. Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* 2003;**39**:1251–8.
34. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998;**139**:4252–63.
35. Drossman DA, McKee DC, Sandler RS, Mitchell CM, Cramer EM, Lowman BC, et al. Psychosocial factors in the irritable bowel syndrome. A multivariate study of patients and nonpatients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1988;**95**:701–8.
36. Whitehead WE, Bosmajian L, Zonderman AB, Costa Jr PT, Schuster MM. Symptoms of psychological distress associated with irritable bowel syndrome. Comparison of community and medical clinic samples. *Gastroenterology* 1988;**95**:709–14.
37. Ji Y, Murphy AZ, Traub RJ. Estrogen modulates the visceromotor reflex and responses of spinal dorsal horn neurons to colorectal stimulation in the rat. *J Neurosci* 2003;**23**:3908–15.
38. Kawakita S, Marotta F, Naito Y, Gumaste U, Jain S, Tsuchiya J, et al. Effect of an isoflavones-containing red clover preparation and alkaline supplementation on bone metabolism in ovariectomized rats. *Clin Interv Aging* 2009;**4**:91–100.
39. Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann Med* 1997;**29**:95–120.
40. Weber KS, Setchell KD, Stocco DM, Lephart ED. Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5alpha-reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J Endocrinol* 2001;**170**:591–9.
41. Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 2004;**53**:501–6.
42. Gareau MG, Jury J, Perdue MH. Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;**293**:G198–203.
43. Castagliuolo I, Lamont JT, Qiu B, Fleming SM, Bhaskar KR, Nikulasson ST, et al. Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *Am J Physiol* 1996;**271**:G884–92.
44. Eutamene H, Theodorou V, Fioramonti J, Bueno L. Acute stress modulates the histamine content of mast cells in the gastrointestinal tract through interleukin-1 and corticotropin-releasing factor release in rats. *J Physiol* 2003;**553**:959–66.
45. Alexandrakis MG, Kyriakou DS, Kempuraj D, Huang M, Boucher W, Seretakis D, et al. The isoflavone genistein inhibits proliferation and increases histamine content in human leukemic mast cells. *Allergy Asthma Proc* 2003;**24**:373–7.
46. Bandara M, Arun SJ, Allanson M, Widyarini S, Chai Z, Reeve VE. Topical isoflavonoids reduce experimental cutaneous inflammation in mice. *Immunol Cell Biol* 2010;**88**:727–33.
47. Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, et al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 2001;**131**:1362S–75S.
48. Billings PC, St Clair WH, Maki PA, Kennedy AR. Distribution of the Bowman Birk protease inhibitor in mice following oral administration. *Cancer Lett* 1992;**62**:191–7.
49. Hawkins JV, Emmel EL, Feuer JJ, Nedelman MA, Harvey CJ, Klein HJ, et al. Protease activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats. *Dig Dis Sci* 1997;**42**:1969–80.
50. Demaude J, Leveque M, Chaumaz G, Eutamene H, Fioramonti J, Bueno L, et al. Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: involvement of pancreatic trypsin. *Life Sci* 2009;**84**:847–52.

**A LOW DOSE OF FERMENTED SOY GERM ALLEVIATES GUT
BARRIER INJURY, HYPERALGESIA AND FAECAL PROTEASE
ACTIVITY IN A RAT MODEL OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE**

Introduction et buts de l'étude: Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des pathologies digestives d'étiologie multifactorielle. Des perturbations de l'immunité intestinale accompagnée d'une barrière épithéliale participent à la pathogénicité des MICI et l'hyperperméabilité associée, particulièrement pendant les phases actives de la maladie. Les estrogènes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et diminuent la perméabilité intestinale via leurs récepteurs aux estrogènes (REs). Toutefois la capacité des estrogènes à réduire l'hyperperméabilité intestinale et l'hyper sensibilité viscérale associées à l'inflammation n'a pas reçu d'attention.

Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer les effets d'un traitement par du germe de soja fermenté (SG, riche en phytoestrogènes) sur la réponse inflammatoire, l'augmentation de la perméabilité intestinale et l'hyper sensibilité viscérale induites par une colite expérimentale chez le rat femelle et d'examiner si ces effets impliquent l'activité estrogénique du SG.

Méthodes: Dans un premier temps, nous avons évalué chez des rates adultes intactes les effets d'un traitement par du SG sur la réponse inflammatoire. Pour cela, une colite a été induite sur des rates Wistar adultes par instillation intra-colique de TNBS/éthanol (80 mg/kg). Les animaux ont reçu per os pendant 15j avant et 5j après induction de la colite, soit le SG (0,45 mg d'isoflavones équivalent formes aglycones/rat/jour), soit le solvant (1 ml d'eau) en présence ou en absence de l'antagoniste des REs, le ICI 182,780 (2 mg/kg/j ; s.c), administré depuis le 11ème jour du traitement. Les animaux ont été sacrifiés 24h, 3 et 5 jours après l'induction de l'inflammation. Des segments de côlon ont été prélevés pour évaluer les scores lésionnels macroscopiques (SLM) et microscopiques (SM), l'activité myéloperoxydase (MPO) tissulaire utilisée comme témoin de l'infiltration neutrophilaire, le taux des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et MIF) et anti-inflammatoires (IL-10). L'activité protéolytique fécale ainsi que l'expression du PAR-2 colique (par immunohistochimie) ont été mesurées.

Dans un second temps, la perméabilité paracellulaire totale a été mesurée à J1, 3 et 5 post-TNBS à l'aide d'une macromolécule marquée, le ⁵¹CR-EDTA administré par gavage oral et exprimée en % récupéré dans les urines de 24h. De même, la sensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale (DCR ; volumes appliqués par paliers de 5 min de 0 à 60

mmHg, incrément 15 mmHg) a été évaluée, 5J post-TNBS, chez des animaux préalablement équipés d'électrodes NiCr implantées au niveau du muscle abdominal.

Résultats: L'instillation intra-colique de TNBS/éthanol augmente, comparativement au groupe contrôle, les SLM, l'activité MPO, les SM, l'activité protéolytique, l'expression de PAR-2 colique et la perméabilité paracellulaire intestinale à J1, 3 et 5 post-TNBS. Les taux de MIF et d'IL-1 β ont été augmentés pendant la phase aiguë de la colite alors qu'une hypersensibilité viscérale en réponse à la DCR a été observée 5J après TNBS à partir de 30 mmHg. L'exposition chronique au SG diminue les SLM, l'activité MPO, les SM, l'activité protéolytique, l'expression de PAR-2 colique et la perméabilité paracellulaire intestinale à J1, 3 et 5 post-TNBS. De même, le traitement par le SG prévient l'hypersensibilité viscérale mesurée à J5 post-TNBS. A noter que le taux d'IL-10 était augmenté chez les rates traitées par le SG. Les effets du SG, excepté ceux sur l'activité protéolytique et l'expression de PAR-2, ont été bloqués par l'administration de l'ICI182,780 confirmant l'implication des REs.

Conclusion: Un traitement per os de deux semaines par le SG réduit la sévérité de la colite en diminuant la réponse inflammatoire Th1 et en augmentant la sécrétion d'IL-10. De même, le SG prévient l'augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale et l'hyperalgésie viscérale. Ces effets s'exercent via une voie RE-dépendante et indépendante.

A Low Dose of Fermented Soy Germ Alleviates Gut Barrier Injury, Hyperalgesia and Faecal Protease Activity in a Rat Model of Inflammatory Bowel Disease

Lara Moussa^{1,2}, Valérie Bézirard¹, Christel Salvador-Cartier¹, Valérie Bacquié¹, Corinne Lencina¹, Mathilde Lévêque¹, Viorica Braniste¹, Sandrine Ménard¹, Vassilia Théodorou^{1,9}, Eric Houdeau^{1,*}

1 Neuro-Gastroenterology and Nutrition, Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1331 Toxalim, INRA/INPT/UPS, Toulouse, France, **2** GENIBIO, Lorp-Sentaraille, France

Abstract

Pro-inflammatory cytokines like macrophage migration inhibitory factor (MIF), IL-1 β and TNF- α predominate in inflammatory bowel diseases (IBD) and TNBS colitis. Increased levels of serine proteases activating protease-activated receptor 2 (PAR-2) are found in the lumen and colonic tissue of IBD patients. PAR-2 activity and pro-inflammatory cytokines impair epithelial barrier, facilitating the uptake of luminal aggressors that perpetuate inflammation and visceral pain. Soy extracts contain phytoestrogens (isoflavones) and serine protease inhibitors namely Bowman-Birk Inhibitors (BBI). Since estrogens exhibit anti-inflammatory and epithelial barrier enhancing properties, and that a BBI concentrate improves ulcerative colitis, we aimed to evaluate if a fermented soy germ extract (FSG) with standardized isoflavone profile and stable BBI content exert cumulative or synergistic protection based on protease inhibition and estrogen receptor (ER)-ligand activity in colitic rats. Female rats received orally for 15 d either vehicle or FSG with or without an ER antagonist ICI 182.780 before TNBS intracolonic instillation. Macroscopic and microscopic damages, myeloperoxidase activity, cytokine levels, intestinal paracellular permeability, visceral sensitivity, faecal proteolytic activity and PAR-2 expression were assessed 24 h, 3 d and 5 d post-TNBS. FSG treatment improved the severity of colitis, by decreasing the TNBS-induced rise in gut permeability, visceral sensitivity, faecal proteolytic activity and PAR-2 expression at all post-TNBS points. All FSG effects were reversed by the ICI 182.780 except the decrease in faecal proteolytic activity and PAR-2 expression. In conclusion, the anti-inflammatory properties of FSG treatment result from two distinct but synergic pathways i.e an ER-ligand and a PAR-2 mediated pathway, providing rationale for potential use as adjuvant therapy in IBD.

Citation: Moussa L, Bézirard V, Salvador-Cartier C, Bacquié V, Lencina C, et al. (2012) A Low Dose of Fermented Soy Germ Alleviates Gut Barrier Injury, Hyperalgesia and Faecal Protease Activity in a Rat Model of Inflammatory Bowel Disease. PLoS ONE 7(11): e49547. doi:10.1371/journal.pone.0049547

Editor: Benoit Foligne, Institut Pasteur de Lille, France

Received: July 27, 2012; **Accepted:** October 10, 2012; **Published:** November 14, 2012

Copyright: © 2012 Moussa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by GENIBIO, Midi Pyrenees Region, ANRT (Association Nationale de Recherche et de Technologie). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have the following interests. This work was partly funded by GENIBIO, the employer of Lara Moussa. The fermented soy germ ingredient (FSG) used in the study was industrially processed as ground powder under the trademark Primasoy[®] by GENIBIO. There are no further patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* E-mail: Eric.Houdeau@toulouse.inra.fr

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD), namely Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are chronic and relapsing inflammatory conditions characterized by an abnormal immune response to microbiota, impaired epithelial barrier function, tissue damage, and abdominal pain [1,2,3]. In both disorders, mucosal immune cells produce large amounts of chemokines and cytokines, including macrophage migration inhibitory factor (MIF), IL-1 β and TNF- α , both orchestrating the immuno-inflammatory process leading to epithelial barrier defect, tissue damage [3]. On the other hand, proteases originated from various cell populations such as trypsin, trypsin, thrombin and cathepsin G may act as inflammatory mediators [4,5] by cleaving and activating protease-activated receptors (PARs) which represent novel members of the G-protein-coupled receptor family. Among the PARs family, PAR-2 has been largely studied in the context of inflammation.

Interestingly, the levels of potential activators of PAR-2 such as serine-proteases are increased in the colonic tissue of IBD patients [4,5,6]. Both PAR-2 activity and proinflammatory cytokines impair epithelial barrier by decreasing tight junction (TJ) protein expression [3,4], hence facilitate the entry of luminal aggressors perpetuating inflammation and pain [7].

A variety of medical therapies have been used for treatment of IBD patients. Among them immunosuppressive medications are prominent [8], with benefits observed in both clinical remission and mucosal healing. However, beside these conventional therapies, patients with IBD often question clinicians about dietary suggestions to improve their symptoms and quality of life [9]. During the last decade, soy extracts have attracted attention because of their anti-inflammatory properties in animal models of IBD [10] partly due to a reduced expression of inflammatory mediators [11]. Soy extracts are mainly characterized by the presence of isoflavones and their content of a family of serine

protease (trypsin-like) inhibitors known as Bowman-Birk Inhibitors (BBI) [12]. However, the isoflavone profile and concentration as well as the BBI content vary according to the extract considered. A beneficial effect in terms of rates of remission and clinical response has been observed in patients with UC treated with a concentrate of BBI [13]. Soy isoflavones such as genistein, daidzein and its metabolite equol exhibit estrogen-like activity [14]. In the colon, estrogen receptors (ERs) signalling enhance expression of transmembrane TJ proteins in non-inflamed conditions [15], and decrease proinflammatory cytokine production in experimental colitis [16,17]. Soy isoflavones have been shown to enhance intestinal tight junction (TJ) barrier integrity [18] although the precise mechanism underlying amelioration of TJ barrier remains unclear. If recent attention has been made on the beneficial properties of purified genistein or isoflavone-enriched diet in colitis [10,19], the estrogenic potential of isoflavones to enhance TJ barrier integrity in inflamed tissues remains to be investigated. This study was conducted using a fermented soy-germ (FSG) extract containing daidzein, glycitein and genistein present in aglycone forms resulting from fermentation [20], which represent the gut absorbable isoflavone forms [21], as well as stable levels of BBI.

Regarding the composition of the FSG extract used in this study, we aimed to evaluate whether this compound may exert cumulative or synergistic protection based on protease inhibition and ER-ligand activity in a model of experimental colitis in rats.

Materials and Methods

Ethics statement

All experimental protocols were approved by the Local Animal Care and Use Committee of Institut National de la Recherche Agronomique.

Animals and sexual cycle stage determination

Female Wistar rats (Janvier SA, Le Genest St Isle, France) were housed under controlled conditions of temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and illumination (12 h light, 12 h dark) with free access to water and fed standard pellets (UAR pellets, Epinay, France). Estrous cycle stages were assessed through vaginal smears as previously described [15].

Fermented soy germ ingredient

The FSG was industrially processed as ground powder under the trademark Primasoy[®] by GENIBIO (Lorp-Sentaraille, France). This compound had an average content of isoflavones of 34.7 $\mu\text{mol/g}$ of product (55% daidzein, 30% glycitein and 15% genistein in aglycone forms). Bowman-Birk protease inhibitors were quantified in chymotrypsin inhibitory (CI) units, where 1 CI is the amount needed to inhibit 1 mg of bovine pancreatic chymotrypsin [20].

FSG was diluted in water and prepared daily in order to administer in 1 ml volume, 0.45 mg isoflavone aglycone forms equivalent/d/rat and 1 BBI CI/d/rat as described previously [22].

Induction of experimental colitis

Colitis was induced by an intra-colonic (IC) administration of TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid) at a dose of 80 mg/kg in 50% ethanol. TNBS was infused through a silicone catheter introduced 7 cm into the anus under acepromazine–ketamine anaesthesia, as previously described [23].

Macroscopic damage scores

Immediately after sacrifice, the colon was removed and rinsed with saline. Intestinal damage was scored according to a modified scale of Wallace et al [24]. Briefly, the presence of mucosal hyperemia and bowel wall thickening, the severity and extent of ulceration and necrosis, the tissue adhesion, and the occurrence of diarrhea were rated according to a macroscopic damage score (MDS) ranging from 0 (normal appearance) to 13 (severe lesions).

Microscopic damages

To evaluate microscopic damages (MD), samples of the distal colon were fixed in Duboscq-brazil solution during 24 h, dehydrated and embedded in paraffin. Samples were then cut into 5 μm thick transversal sections, mounted on glass slides, stained with hematoxylin and eosin, then observed with a light microscope (Nikon 90i, Nikon, France). The MD were assessed according to a modified histological grading scale described by Fabia and al [25]. Several parameters were observed as ulceration, mucus cell depletion, oedema, inflammatory cell infiltration and vessel dilatation. Each parameter estimated was graded 0–3 depending on the severity of the changes found: (0) no change, (1) mild, (2) moderated or (3) severe changes. MD were calculated by adding the scores of all parameters cited above.

Myeloperoxidase activity assay

The activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO), a marker of polymorphonuclear primary granules, was determined in the colon. Immediately after sacrifice, a distal colonic segment (1 cm long) was taken off, suspended in potassium phosphate buffer (KH_2PO_4 44 mM, K_2HPO_4 6 mM, pH 6.0), homogenized on ice with Polytron (PCU-2, Kinematica GmbH, Lucerne, Switzerland) and submitted to three cycles of freezing and thawing. Homogenates were then centrifuged at 10000 rpm for 15 min at 4°C . The pellets were resuspended in hexadecyl trimethylammonium bromide buffer (0.5% (wt/vol) in potassium phosphate buffer) to release MPO from polymorphonuclear neutrophil primary granules. These suspensions were sonicated (Büchi, Flawil, Switzerland) on ice and centrifuged at 10000 rpm for 15 min at 4°C . Supernatant fractions were diluted in potassium phosphate buffer containing 0.167 mg O-dianisidine dihydrochloride/ml and 0.00005% (vol/vol) H_2O_2 . MPO from human neutrophils (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France; 0.1 U/ml) was used as a standard. Changes in absorbance at 450 nm were recorded with a spectrophotometer (mc2UV, Safas, Monaco) every 10 s over 2 min. One unit of MPO activity was defined as the quantity of MPO degrading 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ at 25°C . Protein concentrations (mg/ml) were determined using a modified method of Lowry (Detergent Compatible Assay, BioRad, Ivry/Seine, France) and MPO activity was expressed as MPO units/g protein.

Tissue protein extraction and ELISA

Tissue proteins were extracted with RIPA buffer (1% Igepal, 0.5% deoxycholic acid, and 0.1% sodium dodecyl sulfate in Tris-buffered saline 1x; pH 7.4) with protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Clear lysates were prepared by centrifugation at 10000 g for 10 min, and protein concentrations were assessed using the BC Assay Uptima kit (Interchim). Samples were then processed for ELISA using commercial kits to determine colonic contents of IL-1 β , and IL-10 (ELISA kits, Duoset R&D Systems, Lille, France). Data were expressed as concentration per mg of total proteins.

MIF expression by Western blot

Briefly, tissue proteins were extracted with RIPA buffer as above, and equal protein amounts of each extract were separated in 15% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto 0.45 µm nitrocellulose membranes (Whatman, Dominique Deutscher, Brumath, France). Membranes were blocked with Odyssey blocking buffer (Rockland, Tebu-bio, France), then incubated overnight at 4°C with the rabbit anti-MIF antibody (Torrey Pines Biolabs; 1/1000) or anti-GAPDH antibody (Cell signaling Technology, Ozyme, St Quentin-en Yvelines, France; 1/1000) used as internal standard. After washing, fluorescent CF770 anti-rabbit antibody (Biotium, Hayward, CA; 1/1000) was added for 1 hour at room temperature and protected from light. Membranes were scanned and the intensity of bands was analysed on infrared imaging system Odyssey (Li-Cor, Lincoln, NE). MIF expression was assessed relative to GAPDH for each sample analysed.

Faecal proteolytic activity assay

Supernatants of faecal homogenates (25 µl) were incubated with 1 ml of reaction buffer (0.15 M/L NaCl and 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5) and 1 ml of 0.5% (w/v) azocasein (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) at 37°C. The reaction was stopped after 20 min with 1 ml of 10% (v/v) trichloroacetic acid (Sigma). Following centrifugation, absorption of the clear supernatant was measured at 366 nm. Proteolytic activity of the supernatants was normalized to protein content.

PAR-2 immunohistochemistry

Colonic tissue samples were fixed in 4% formalin and incubated for 24 h in 30% of sucrose at 4°C. Samples were embedded in Tissue Tek medium (Euromedex, Souffelweyeshem, France) and frozen in isopentane at -45°C. Cryostat sections (7 µm) were post-fixed with acetone (10 min, -20°C) and hydrated in phosphate-buffered saline (PBS)-milk (0.1%). After incubation in blocking solution (PBS-0.25% Triton X100-0.1% BSA), sections were incubated overnight at 4°C with primary goat polyclonal antibody for PAR-2 (1/1000) (SantaCruz, California, USA). Sections were then washed in PBS-milk (0.1%) and incubated for 1 h at room temperature with biotinylated donkey anti-goat secondary antibody (1/1000) (Interchim, Montluçon, France), then 45 min at room temperature with FITC-avidine (1/500) (Clinisciences, Montrouge, France). Sections were mounted in Vectashield Hard set mounting medium (Clinisciences, Montrouge, France) and examined under a Nikon 90i fluorescence microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). PAR-2 area fraction per µm² of epithelium was quantified using Nikon-Elements-Ar software.

Intestinal paracellular permeability

Intestinal paracellular permeability (IPP) was performed using ⁵¹Cr-EDTA (Perkin-Elmer Life Sciences, Paris, France) as a marker of tight junctions paracellular permeation. ⁵¹Cr-EDTA (0.7 µCi) was diluted in 500 µl of saline and administered *per os* 24 h, 3 d or 5 d after induction of colitis. Animals were placed in metabolic cages, and faeces and urine were collected separately during 24 h. The radioactivity in urine was measured on a gamma counter (Cobra II, Packard Meriden, CT, USA). Permeability to ⁵¹Cr-EDTA was expressed as percentage of administered radioactivity recovered in 24 h urines.

Surgical procedure

Animals were surgically prepared for abdominal striated muscle electromyography according to a previously described technique

[23]. Briefly, rats were equipped with three groups of three NiCr wire electrodes (60 cm in length, 80 µm in diameter) implanted into the abdominal external oblique musculature. Electrodes were exteriorized on the back of the neck and protected by a glass tube attached to the skin.

Distension procedure and electromyographic recordings

Rats were accustomed to be in polypropylene tunnels (6 cm diameter, 25 cm length) for 2 d before colorectal distension (CRD). A balloon (2 mm diameter; 4 cm length) consisting of a latex condom was introduced into the anus, fixed at the base of the tail and connected to a computerized barostat INRA [26]. The balloon was inflated progressively in steps of 15 mmHg, each step of inflation lasting 5 min. Colorectal pressure and balloon volume (referring to the intestinal compliance) were continuously monitored on a potentiometric recorder (L6517; Linseis, Selb, Germany) with a paper speed of 1 cm.min⁻¹. The striated muscle spike bursts, related to abdominal cramps, were recorded on an electroencephalograph machine (Mini VIII; Alvar, Paris, France) from implanted electrodes. Differential amplification, using a short time constant (0.03s), allow us to detect high frequency spike bursts corresponding to abdominal cramps.

Experimental protocol

Female Wistar rats were divided into 11 groups (n = 10 per group) and received orally for 15 d either vehicle (Ve; 1 ml of water) or FSG, with or without the ER antagonist ICI 182.780 (2 mg/kg/day, s.c) administered from day 11 until 15 of the treatment. Colitis was induced by IC instillation of TNBS/ethanol (80 mg/kg) on day 15 of the treatment. Non-inflamed rats received IC instillation of sterile saline solution. Body weight was evaluated every 2 days from the beginning of the treatment until 5 d post-TNBS. In a first series, animals were sacrificed 24 h, 3 d and 5 d post-colitis. MDS were determined at all time points post-TNBS. Colonic samples were taken for (i) MD and MPO activity assessments, (ii) IL-1β, IL-10 level measurements, (iii) MIF and PAR-2 expression. Faecal pellets were collected for proteolytic activity assessment. In a second series, IPP to oral ⁵¹Cr-EDTA was measured 24 h, 3 and 5 d post-TNBS in 24 h urines. Finally, in a last series at 5 d post-TNBS, visceral sensitivity in response to CRD was evaluated in animals previously equipped with NiCr electrodes implanted in the abdominal muscle.

Two additional sets of experiments were also conducted. In the first one, a group of 10 male Wistar rats received orally for 15 d the FSG treatment. On day 15, TNBS colitis was induced as described above, and MPO activity was evaluated 24 h and 3 d post-TNBS. In the second one, to test curative effects of FSG treatment, 10 female Wistar rats were orally given FSG starting the day of TNBS instillation until 5 days post-TNBS. MPO activity was evaluated on days 1, 3 and 5 post-TNBS.

Table 1. Body weight loss (g) in Ve or FSG-treated colitic rats.

Days post-TNBS	Ve-treated group	FSG-treated group
1	13 ± 1.7	10 ± 1.3
3	39 ± 3.6**	35 ± 2.7**
5	33 ± 4.1*	29 ± 3.5*

Values are presented as means ± SEM.

*p < 0.05 vs body weight before TNBS administration,

**p < 0.01 vs body weight before TNBS administration.

(One way-ANOVA followed by Tukey test).

doi:10.1371/journal.pone.0049547.t001

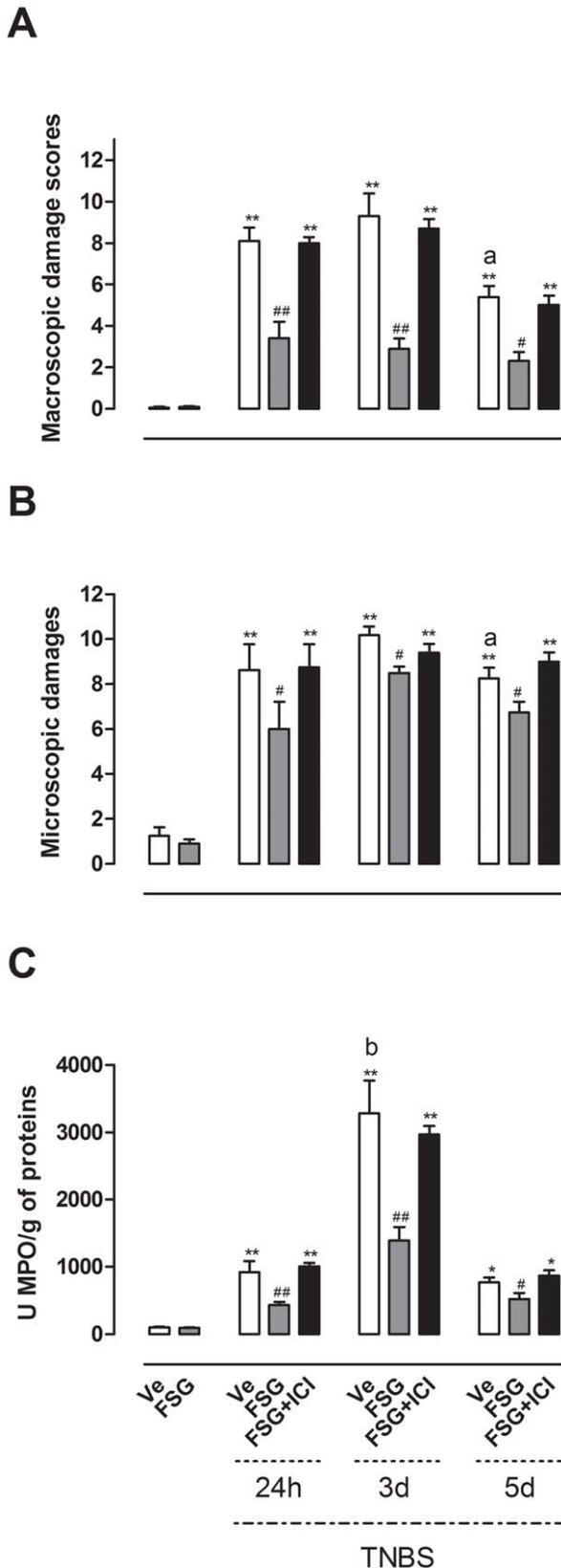


Figure 1. Effects of FSG treatment on the severity of TNBS-induced colitis. (A) MDS, (B) MD, (C) MPO activity were evaluated in presence or absence of the ER antagonist ICI 182,780. Values are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed by One

way-ANOVA with post hoc comparison by Tukey test. * $p < 0.05$ vs noninflamed group, ** $p < 0.01$ vs noninflamed group, # $p < 0.05$ vs inflamed vehicle, ## $p < 0.01$ vs inflamed vehicle, ^a $p < 0.05$ vs Ve-treated rats 3 d post-TNBS, ^b $p < 0.05$ vs Ve-treated rats 24 h and 5 d post-TNBS. doi:10.1371/journal.pone.0049547.g001

Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM. Statistical analysis were performed using Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, CA). One-way ANOVA followed by Tukey’s post-test was used to examine the effects of FSG treatment on TNBS-evoked IBD-like symptoms. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Effects of FSG on body weight

After 15 days of treatment with FSG, animals did not show any difference in body weight compared with control rats orally treated with Ve (data not shown). Body weight loss started 24 h after TNBS induction of colitis, to reach $\sim 13\%$ on day 3 post-TNBS compared to non-inflamed rats, then started increasing ($\sim 3\%$) 5 d after TNBS administration. Rats treated with FSG showed similar body weight loss after TNBS administration compared to Ve-treated colitic rats (Table 1).

FSG treatment attenuates the severity of TNBS-induced colitis

TNBS administration resulted in colon inflammation associated with hyperemia, ulceration and bowel wall thickening, leading to a significant increase ($p < 0.01$) in MDS 24 h, 3 d and 5 d after colitis induction compared with non colitic animals (Figure 1A). Oral FSG treatment significantly decreased MDS from days 1 to 5 after TNBS ($p < 0.05$) (Figure 1A).

Microscopic damage evaluation by histology has shown that colitic rats exhibited disruption of the epithelial barrier, oedema, vessel dilatation and a marked infiltration of inflammatory cells on days 1, 3 and 5 post-TNBS, corroborating MDS (Figure 1B). FSG-treated rats revealed a pronounced reduction in MD ($p < 0.05$) compared with TNBS rats (Figure 1B). Colonic inflammation was also associated with increased mucosal neutrophil infiltration since colitic rats displayed an increase in MPO activity 24 h, 3 d and 5 d post-TNBS when compared to control non-inflamed rats ($p < 0.05$). However, this increase was significantly higher ($p < 0.05$) on day 3 post-TNBS *vs* 24 h and 5 d post-TNBS (Figure 1C). The oral treatment by FSG significantly reduced TNBS-induced increase in colonic MPO activity at all time points after induction of colitis ($p < 0.05$) (Figure 1C). However, the effects of FSG treatment on MDS, MD and MPO activity did not reflect a total inhibition since values obtained for these parameters remained higher than in rats without colitis (Figure 1). All FSG effects on TNBS-induced colitis were blocked in the presence of the ER antagonist ICI 182,780 (Figure 1). Of note, FSG treatment in non-colitic rats had no effect *per se* on all inflammatory parameters evaluated compared with Ve-treated rats without TNBS colitis (Figure 1).

In a distinct series of experiments conducted in male rats, the preventive treatment with FSG decreased MPO activity at 24 h ($p < 0.05$) and 3 d ($p < 0.01$) post-TNBS when compared to corresponding Ve-treated colitic rats (see Figure S1). In addition, FSG given in a curative way in female rats (from TNBS administration until 5 days post-TNBS) decreased MPO activity on days 3 ($p < 0.01$) and 5 ($p < 0.05$) after induction of colitis (see Figure S2).

FSG treatment affects cytokine profile in TNBS-colitic rats

In this set of experiments, we investigated the effects of oral treatment with FSG on the expression or release of the pro-inflammatory cytokines MIF and IL-1 β , as well as the anti-inflammatory cytokine IL-10 in colonic tissues. MIF was significantly over-expressed only 24 h after TNBS administration ($p < 0.05$) (Figure 2A) while colonic levels of IL-1 β were markedly increased at 24 h, 3 d and 5 d after TNBS-induced colitis ($p < 0.01$) (Figure 2B). FSG treatment did not affect colonic concentrations of MIF and IL-1 β in non-colitic rats (Figures 2A, B). In contrast, the oral FSG treatment significantly decreased MIF expression 24 h after colitis ($p < 0.05$) and IL-1 β levels on days 1 and 3 post-TNBS ($p < 0.05$; $p < 0.01$ respectively) compared to corresponding values obtained in colitic rats (Figures 2A, B). The effects of FSG on MIF expression and IL-1 β release were reversed in the presence of ICI 182.780 (Figures 2A, B). Interestingly, in non-colitic rats, as well as in colitic animals at 24 h, 3 d and 5 d post-TNBS, the FSG treatment significantly increased IL-10 release ($p < 0.05$) (Figure 2C). The FSG-induced effects on IL-10 colonic levels were reversed following ICI 182.780 (Figure 2C).

FSG prevents TNBS-induced increase in intestinal paracellular permeability

Further, we assessed whether FSG treatment could improve TNBS-induced rise in intestinal permeability. TNBS administration significantly increased the IPP during the whole post-colitis period evaluated (Figure 3). This effect was more pronounced at 24 h and 3 d post-TNBS ($p < 0.01$) than at 5 d ($p < 0.05$). Moreover, no difference in TNBS-induced IPP changes was observed in colitic rats according to the phase of the sexual cycle (data not shown). FSG oral treatment strongly reduced the TNBS-induced increase of intestinal permeability ($p < 0.01$) at all time points post-TNBS (Figure 3). The FSG effect on IPP in colitic rats was reversed by the ICI 182.780 administration (Figure 3).

FSG prevents TNBS-induced visceral hypersensitivity

In a final set of experiments, we investigated the ability of FSG treatment to prevent the inflammation-associated visceral hypersensitivity. Five days after TNBS administration, the number of abdominal contractions at applied pressures of 30, 45 and 60 mmHg was significantly increased ($p < 0.01$) in comparison with Ve-treated non-colitic group of rats (Figure 4A). FSG treatment strongly decreased ($p < 0.05$) the TNBS-induced hypersensitivity to CRD (Figure 4A), while concomitant treatment with ICI 182.780 reversed this effect of FSG (Figure 4A). As expected, TNBS administration resulted in a decrease of colonic compliance ($p < 0.05$) when compared to Ve-treated non colitic group (Figure 4B). FSG treatment did not affect colonic compliance in basal conditions (i.e. non-inflamed rats) in comparison with the Ve-treated non-colitic group (Figure 4B). Similarly, colonic compliance remained unchanged in FSG-treated *vs* Ve-treated colitic rats, indicating that the effect of FSG treatment on visceral sensitivity did not result from changes in muscle compliance.

FSG treatment prevents TNBS-induced increase of faecal proteolytic activity and colonic PAR-2 over-expression

Taking into account the BBI content of the FSG, we investigated its influence on intestinal proteolytic activity. Faecal proteolytic activity was significantly increased in colitic rats ($p < 0.05$) from 24 h to 5 d post-TNBS (Figure 5). FSG treatment fully prevented this effect at all time-points post-TNBS (Figure 5). ICI 182.780 administration failed to reverse this FSG effect

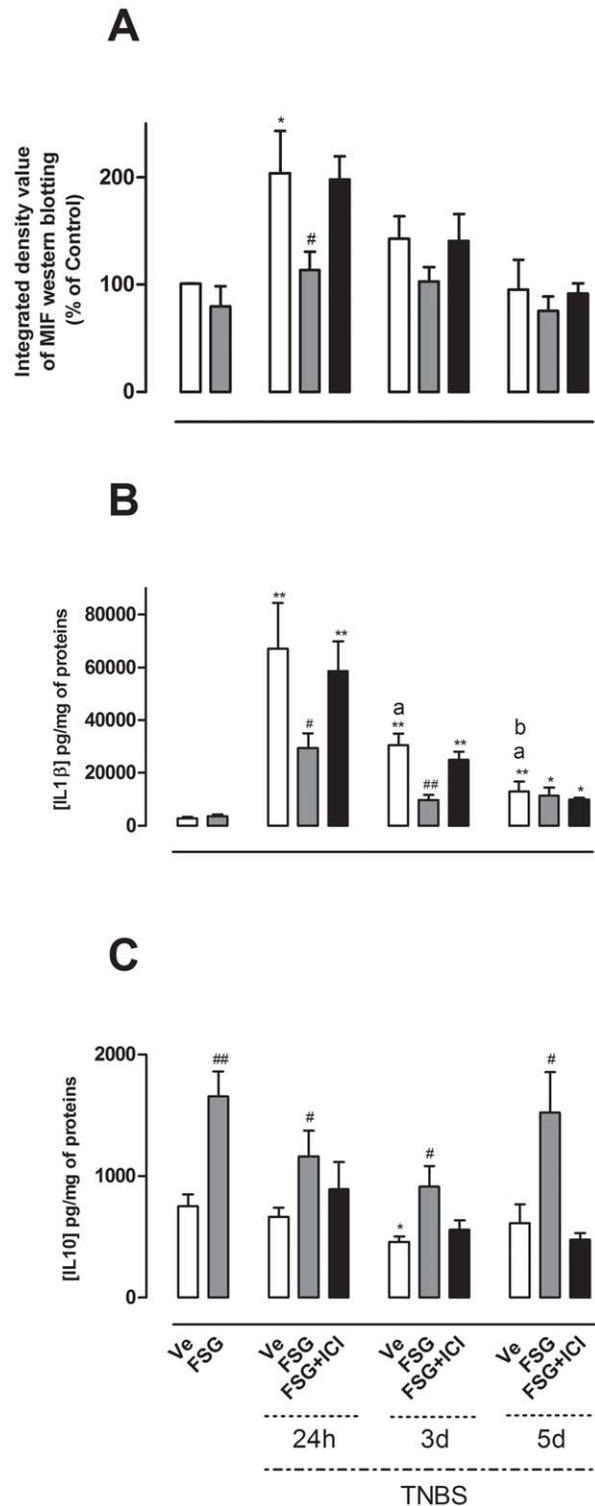


Figure 2. Effects of FSG treatment on cytokine profile after TNBS colitis. Effects of FSG on (A) MIF expression, (B) IL-1 β , (C) IL-10 levels were evaluated in non inflamed colon and 24 h, 3 d, 5 d after TNBS-induced colitis in presence or absence of the ER antagonist ICI 182.780. Values are presented as means \pm SEM. Statistical analysis were performed by One way-ANOVA with post hoc comparison by Tukey test. * $p < 0.05$ vs non inflamed group, ** $p < 0.01$ vs non inflamed group, # $p < 0.05$ vs inflamed vehicle, ## $p < 0.01$ vs inflamed vehicle, ^a $p < 0.05$ vs Ve-treated rats 24 h post-TNBS, ^b $p < 0.05$ vs Ve-treated rats 3 d post-TNBS.

doi:10.1371/journal.pone.0049547.g002

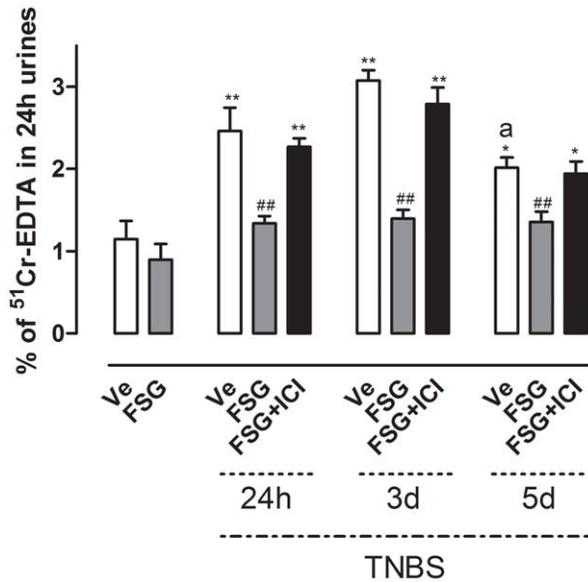


Figure 3. Effects of FSG treatment on TNBS-induced changes in intestinal paracellular permeability ± ER antagonist ICI182.780. Values are presented as means ± SEM. Statistical analysis were performed by One way-ANOVA with post hoc comparison by Tukey test. *p<0.05 vs non inflamed group, **p<0.01 vs non inflamed group, ##p<0.01 vs inflamed vehicle, ^ap<0.05 vs Ve-treated rats 3 d post-TNBS. doi:10.1371/journal.pone.0049547.g003

(Figure 5). Further, in basal conditions (i.e. non-colitic rats), a 15 d oral treatment by FSG did not affect faecal proteolytic activity since values obtained were similar to those obtained in Ve-treated non colitic rats (Figure 5). PAR-2 expression was increased in TNBS treated rats as reflected by immunohistochemistry from 24 h to 5 d post-TNBS (Figure 6). In basal conditions, FSG treatment did not affect PAR-2 expression in comparison to controls, whereas this treatment significantly reduced the TNBS-induced PAR-2 over-expression at all time-points post-TNBS evaluated (Figure 6).

Discussion

Inflammatory bowel diseases, including CD and UC, are chronic inflammatory gastrointestinal conditions characterized by an inappropriate innate and adaptive immune systems response [2], increased luminal protease activity [6], over-expression of PAR-2 [27], epithelial barrier defects [3] and abdominal pain [1]. In this study, we show that an oral treatment with a fermented soy germ ingredient (FSG) reduces inflammatory response, intestinal permeability and visceral hypersensitivity in a rat model of colitis through two distinct pathways. These protective effects occurred partly through a phytoestrogen-derived ER-signalling in the gut, able to reduce pro-inflammatory cytokine profile and to enhance epithelial barrier function. Additionally, the protease inhibitor activity of the FSG compound prevented the increase of luminal protease activity, and decreased colonic epithelial PAR-2 over-expression in colitic rats, independently of ER-ligand activity. Overall, these preventive effects occurred with a daily-administered dose of isoflavones equivalent aglycone forms (0.45 mg per day/rat) close to the authorized isoflavone daily intake in humans according to the European safety guidelines (1 mg/kg BW/day).

TNBS intracolonic administered to rats induces immunologic responses and gut barrier defects reproducing symptoms characterising chronic and relapsing IBD conditions [28]. For

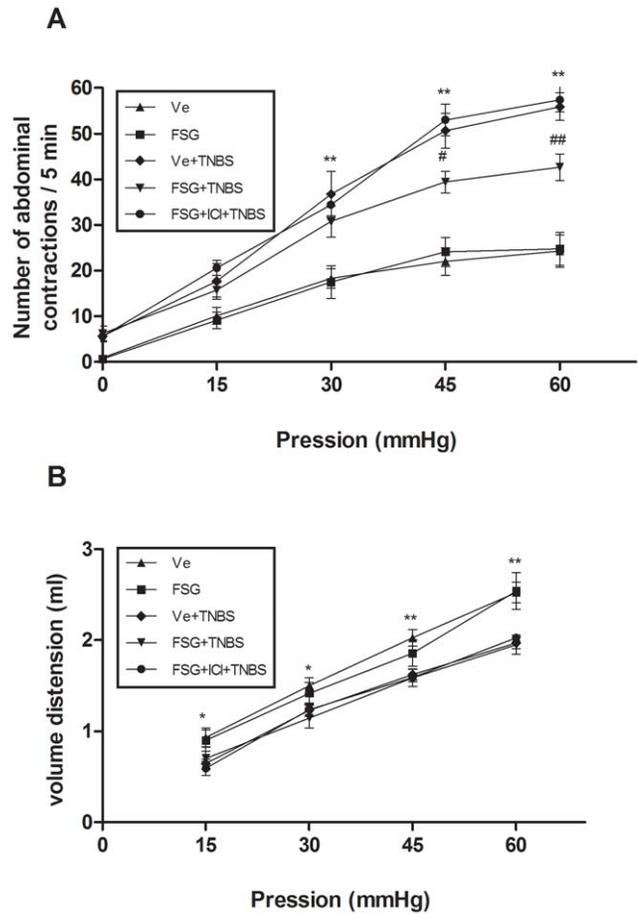


Figure 4. Effects of FSG treatment on (A) TNBS-induced visceral hypersensitivity in response CRD (B) colonic compliance. Abdominal response and colonic compliance were determined on 5th day post-TNBS in presence or absence of the ER antagonist ICI 182.780. Values are presented as means ± SEM. Statistical analysis were performed by One way-ANOVA with post hoc comparison by Tukey test. *p<0.05 vs non inflamed group, **p<0.01 vs non inflamed group, #p<0.05 vs inflamed vehicle, ##p<0.01 vs inflamed vehicle. doi:10.1371/journal.pone.0049547.g004

example, pro-inflammatory cytokines including IL-1β, TNF-α or IL-6 are consistently elevated in IBD [29], and high serum levels of MIF are detected in patients with active CD [30]. MIF stimulates the T Helper (TH) 1 cytokine network (mainly IL-1β and TNF-α) involved in the acute inflammatory response and its maintenance [30,31]. Similarly, these cytokines are produced in TNBS colitis [16]. In addition, transmural infiltration of neutrophils is a pathological feature of IBD [32]. TNBS colitis also increases MPO activity in the colonic mucosa, an index of neutrophil infiltration. Our study shows that FSG treatment prevented the colitis-induced increase in IL-1β and MIF in the rat colon. Concomitantly, the preventive FSG treatment prevented the increase in MPO activity in female and male rats, indicating inhibition of neutrophil influx in inflamed tissues. Since both MIF and IL-1β induce neutrophil recruitment [33,34], and that blockade of MIF activity down-regulates IL-1β [31,35], it is likely that the decrease of neutrophil influx and IL-1β release in the inflamed areas would result from FSG-mediated inhibition of MIF production in the acute phase of colitis. In addition, increased IL-10 limits TH1 immune responses [36], and deficiency in human IL-10 function related to IL-10 or its receptor IL-10R mutations was reported in the IBD patho-

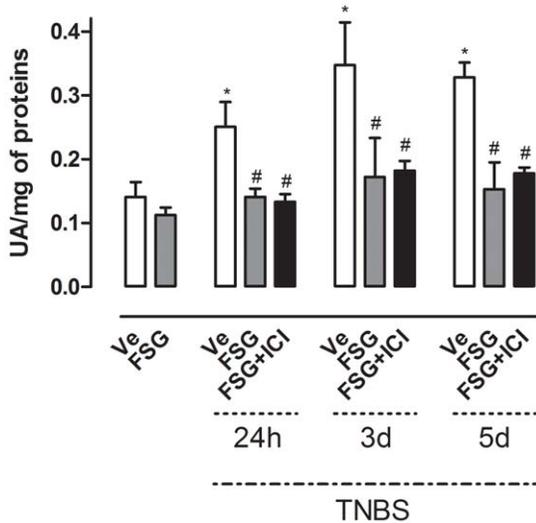


Figure 5. Effects of FSG treatment on TNBS-induced changes in faecal proteolytic activity ± ER antagonist ICI182.780. Data are expressed as means ± SEM. One way-ANOVA with post hoc comparison by Tukey test was used to analyse the data. *p<0.05 vs non inflamed group, #p<0.01 vs inflamed vehicle. doi:10.1371/journal.pone.0049547.g005

genesis [37]. FSG treatment increased basal IL-10 release and this effect was maintained in colitic rats. Since IL-10 production can inhibit pro-inflammatory cytokines release [38], we suggest that this mechanism also contributes to the preventive properties of FSG treatment, through downstream modulation of the TNBS-induced TH1 immune response. Interestingly, a reduction in the severity of TNBS colitis was also observed after curative treatment with FSG. Indeed, oral administration of FSG starting from the day of TNBS instillation to 5 days later resulted to a significant decrease in MPO activity on days 3 and 5 post-colitis (see Figure S2). This finding highlights that the anti-inflammatory effect exerted by the FSG treatment is mainly linked to early inflammatory cascade prevention in the colonic mucosa above reported in TNBS colitis.

In IBD as well as in experimental colitis models, oxidative stress has been incriminated in the inflammatory response. One may hypothesize that the antioxidant activity of FSG may contribute to alleviate TNBS injury. However, previous studies report that prevention of colonic inflammation through reduction of the reactive oxygen species (ROS) depends on the severity of colitis. Indeed, transgenic mice overproducing an antioxidant enzyme (CuZn-SOD) exhibit fewer lesions when submitted to mild, but not severe colitis [39]. The TNBS colitis used in the current study is considered as severe regarding the massive mucosal insult observed, mimicking acute IBD. In a study comparing the protective effects of different flavonoids against photo-oxidative stress, isoflavones demonstrate amplification of the photodamage, probably linked to their weak ability to scavenge ROS [40]. This is in agreement with previous literature showing that the structure of isoflavones confers weaker antioxidant properties when compared with other flavonoids [41]. Taken together, these data suggest that the anti-inflammatory effect of the FSG treatment reported herein is unlikely to be linked to its antioxidant properties.

Several studies report that estrogens have anti-inflammatory activity in colitis [16,17,42], partly occurring through ER-dependent down-regulation of MIF production by epithelial cells and macrophages [16]. ERs are widely expressed in the gut with marked expression of ERβ in colonic epithelial cells [43]. An ERβ agonist, ERB-041 displayed anti-inflammatory activity in the HLA-B27 transgenic rat model of IBD [42]. Of note, isoflavones such as genistein and daidzein act primarily through ERβ [14], and the aglycone forms are the gut absorbable forms [21]. Interestingly, the FSG compound tested, contains 85% of these phytoestrogens present in aglycone forms. Oral genistein displayed curative properties in TNBS colitic rats [10]. In this study, we show that the FSG anti-inflammatory effects as well as the increase on basal IL-10 release were blocked by the ER antagonist ICI 182.780, demonstrating that these properties are linked to ER-ligand activity.

Intestinal paracellular permeability (IPP) is increased in TNBS colitic rats, a situation that mimics epithelial barrier defect in IBD [3,44]. IPP is mainly regulated by tight junction (TJ) proteins [45]. In IBD, the release of pro-inflammatory cytokines increases intestinal permeability [46,47], partly through reduced expression of TJ proteins and/or disassembly of TJ protein complex [48]. We

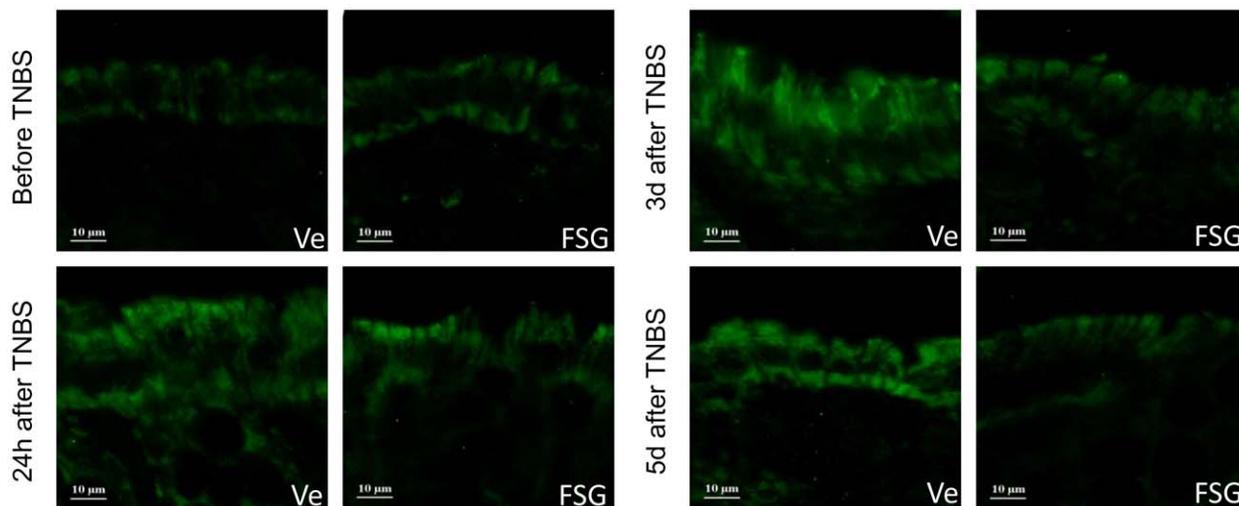


Figure 6. Immunohistochemical staining of longitudinal colonic section for PAR-2 expression. PAR-2 expression was evaluated in colonic epithelial cells in non inflamed colon and 24 h, 3 d, 5 d after TNBS-induced colitis in vehicle (Ve) or FSG treated rats. doi:10.1371/journal.pone.0049547.g006

found that the FSG treatment limits the TNBS-induced increase of gut permeability, and this effect was blocked by ICI 182,780, highlighting involvement of an ER-ligand signalling pathway. These data are consistent with studies showing a protective role of isoflavones on intestinal TJ barrier [18]. ER β signalling pathways in the colon decrease intestinal permeability through up-regulation of TJ protein expression, *in vivo* and *in vitro* [15]. Interestingly, estrogenic activity of FSG has been shown to counteract increased gut permeability by enhancing TJ protein expression in a stress rat model [22]. On the other hand, down-regulation of IL-10 contributes to increased intestinal permeability in colitis [49]. We suggest that FSG may enhance junctional complexes leading to prevention of IPP.

In addition to estrogenic properties, FSG contains BBI (a highly heat stable protease inhibitors) that may contribute to the anti-inflammatory activity. This characteristic (which is absent in phytoestrogen-enriched diets or a simple mixture of isolated isoflavones) is of importance since BBI have been reported to inhibit activated tissue proteases in colitic rats [50], and a concentrate of BBI exerts beneficial effects in UC patients [13]. In UC patients, increased faecal serine protease and colonic PAR-2 expression have been reported [27]. Herein, we show for the first time that TNBS exacerbates the PAR-2 expression in the rat colon during the whole post-TNBS period. This is in agreement with previous animal studies showing that PAR-2 deficiency protects from the development of inflammation induced by three different models of colitis, including TNBS [51]. In our study, we report that anti-inflammatory properties of FSG are also linked to blockade of PAR-2 over-expression in the inflamed rat colon, whereas this treatment did not change PAR-2 expression in basal conditions. Since PAR-2 activation by PAR agonists leads to increased intestinal permeability in rodents [4], we suggest that the FSG ability to inhibit protease activity and PAR-2 expression pattern in colitic rats contributes in synergy with the ER-ligand activity pathway to its anti-inflammatory properties.

Abdominal pain and spasms are common symptoms in IBD. In UC patients as well as in experimental colitis, rectal hypersensitivity and lowering of pain thresholds have been observed [1,23]. We show that FSG treatment prevents TNBS-induced hypersensitivity to CRD without changes in colonic compliance, indicating that this antinociceptive effect did not result from changes in colonic muscular tone. Further, FSG treatment prevents TNBS-induced visceral hypersensitivity through an ER-ligand activity pathway since this effect was reversed by ICI 182,780. This result contrasts with previous data showing that in ovariectomized (OVX) colitic rats, estradiol replacement enhances visceral signal processing following colonic inflammation [52]. A possible explanation to this discrepancy may be attributed to (i) the hormonal status of animals, i.e. OVX *vs* cyclic female rats used herein or (ii) the route of administration, i.e. subcutaneous injection *vs* chronic oral treatment. For instance, chronic FSG or estradiol oral treatment in stressed cyclic rats prevents stress-induced hypersensitivity, suggesting that these compounds orally absorbed did not influence the already primed nociceptive pathway by endogenous sexual steroids [22]. In our study, the FSG-induced decrease in pain sensitivity may be linked to its anti-inflammatory

properties as well as its ability to decrease TNBS-induced rise in intestinal permeability. Indeed, FSG treatment decreases IL-1 β release in colitic rats, a cytokine able to sensitize the capsaicin receptor TRPV1 involved in inflammatory hyperalgesia [53]. Additionally, serine proteases such as cathepsins released during colitis, activate nociceptors to induce visceral pain via PAR-2 [54], and FSG may limit this pathway. Overall, the FSG-mediated improvement of epithelial barrier integrity restricts the passage of luminal agents, thus the release of pro-inflammatory mediators able to sensitize nerve afferences, thus leading to downstream visceral pain.

In conclusion, the anti-inflammatory properties of FSG treatment result from two distinct but synergic pathways linked to its composition. The phytoestrogenic property activates the ER-ligand activity related pathway, whereas the presence of BBI involves a PAR-2 mediated pathway. Highlighting these mechanisms of action provide rationale for potential use of this compound as adjuvant therapy in IBD.

Supporting Information

Figure S1 Effects of FSG treatment on the severity of TNBS-induced colitis in male rats. Male Wistar rats were given orally for 15 d either vehicle or FSG treatment. Induction of TNBS colitis was performed on day 15 of the treatment as reported in females (see Materials and Methods section). Rats were sacrificed 24 h and 3 d post-colitis. Colon samples were taken for myeloperoxidase activity (MPO) assessments as described in Materials and Methods. Colonic MPO level showed significant neutrophil infiltration 24 h and 3 d post-TNBS in comparison to non-inflamed male rats ($p < 0.01$). As observed in females (Figure 1C), FSG pretreatment resulted in decreased MPO activity ($p < 0.05$) at 24 h and 3 d post-colitis compared to Ve-treated animals. Values are means \pm SEM. ** $p < 0.01$ *vs* basal, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ *vs* corresponding Ve group, ^a $p < 0.05$ *vs* Ve group of rats at 24 h post-TNBS. (TIF)

Figure S2 Curative effect of FSG treatment in female rats submitted to TNBS colitis. Female Wistar rats were orally given daily either vehicle or FSG from the day of TNBS colonic instillation until sacrifice at 24 h, 3 d and 5 d post-colitis. TNBS administration induced a significant increase in MPO activity at 24 h, 3 d and 5 d post-colitis ($p < 0.01$). Interestingly, a daily oral treatment with FSG beginning the day of TNBS administration induced a drop of colonic MPO levels at 3 and 5 d post-TNBS in comparison to Ve control rats ($p < 0.05$). Values are means \pm SEM. ** $p < 0.01$ *vs* basal, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ *vs* corresponding Ve group, ^a $p < 0.05$ *vs* Ve group of rats at 3 d post-TNBS. (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LM VT EH. Performed the experiments: LM V. Bézirard CS-C V. Bacquière CL ML V. Braniste SM. Analyzed the data: LM. Wrote the paper: LM VT EH.

References

- Drewes AM, Frokjaer JB, Larsen E, Reddy H, Arendt-Nielsen L, et al. (2006) Pain and mechanical properties of the rectum in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 12: 294–303.
- Shih DQ, Targan SR (2008) Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14: 390–400.
- Soderholm JD, Streutker C, Yang PC, Paterson C, Singh PK, et al. (2004) Increased epithelial uptake of protein antigens in the ileum of Crohn's disease mediated by tumour necrosis factor alpha. *Gut* 53: 1817–1824.
- Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, et al. (2003) Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol* 170: 4296–4300.

5. Raithel M, Winterkamp S, Pacurar A, Ulrich P, Hochberger J, et al. (2001) Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 36: 174–179.
6. Roka R, Rosztochy A, Leveque M, Izbeki F, Nagy F, et al. (2007) A pilot study of fecal serine-protease activity: a pathophysiologic factor in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5: 550–555.
7. Bueno L, Fioramonti J, 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.
8. Baumgart DC, Sandborn WJ (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369: 1641–1657.
9. Brown AC, Rampertab SD, Mullin GE (2011) Existing dietary guidelines for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 5: 411–425.
10. Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T, Laudenbach-Leschowski U, Diel P (2009) Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis. *Eur J Nutr*.
11. Young D, Ibuki M, Nakamori T, Fan M, Mine Y (2012) Soy-derived di- and tripeptides alleviate colon and ileum inflammation in pigs with dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Nutr* 142: 363–368.
12. Birk Y (1985) The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *Int J Pept Protein Res* 25: 113–131.
13. Lichtenstein GR, Deren JJ, Katz S, Lewis JD, Kennedy AR, et al. (2008) Bowman-Birk inhibitor concentrate: a novel therapeutic agent for patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 53: 175–180.
14. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, et al. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139: 4252–4263.
15. Braniste V, Leveque M, Buisson-Brenac C, Bueno L, Fioramonti J, et al. (2009) Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *J Physiol* 587: 3317–3328.
16. Houdeau E, Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Waget A, et al. (2007) Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology* 132: 982–993.
17. Verdu EF, Deng Y, Bercik P, Collins SM (2002) Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G27–36.
18. Suzuki T, Hara H (2011) Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *J Nutr Biochem* 22: 401–408.
19. Morimoto M, Watanabe T, Yamori M, Takebe M, Wakatsuki Y (2009) Isoflavones regulate innate immunity and inhibit experimental colitis. *J Gastroenterol Hepatol*.
20. Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F, Daydé J (2008) Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem* 109: 709–721.
21. Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, et al. (2002) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 76: 447–453.
22. Moussa L, Bezirard V, Salvador-Cartier C, Bacquie V, Houdeau E, et al. (2012) A new soy germ fermented ingredient displays estrogenic and protease inhibitor activities able to prevent irritable bowel syndrome-like symptoms in stressed female rats. *Clin Nutr*.
23. Morteau O, Hachet T, Caussette M, Bueno L (1994) Experimental colitis alters visceromotor response to colorectal distension in awake rats. *Dig Dis Sci* 39: 1239–1248.
24. Wallace JL, Keenan CM, Cucala M, Murgridge KG, Parente L (1992) Mechanisms underlying the protective effects of interleukin 1 in experimental nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* 102: 1176–1185.
25. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willen R, et al. (1993) Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 54: 248–255.
26. Hachet T, Caussette M (1993) A multifunctional and programmable computerized barostat. *Gastroenterol Clin Biol* 17: 347–351.
27. Kim JA, Choi SC, Yun KJ, Kim DK, Han MK, et al. (2003) Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 9: 224–229.
28. Appleyard CB, Wallace JL (1995) Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am J Physiol* 269: G119–125.
29. Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, et al. (1993) Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 94: 174–181.
30. de Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, et al. (2001) Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* 2: 1061–1066.
31. Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horieki N, Onji M (2002) Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 128: 504–510.
32. Alzogaibi MA (2005) Neutrophil expression and infiltration into Crohn's intestine. *Saudi J Gastroenterol* 11: 63–72.
33. Arai Y, Takahashi H, Kitagawa H, Okayasu I (1998) Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Cytokine* 10: 890–896.
34. Makita H, Nishimura M, Miyamoto K, Nakano T, Tanino Y, et al. (1998) Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 573–579.
35. Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, et al. (2002) Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* 123: 256–270.
36. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683–765.
37. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, et al. (2009) Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 361: 2033–2045.
38. Paul G, Khare V, Gasche C (2012) Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *Eur J Clin Invest* 42: 95–109.
39. Kruidenier L, van Meeteren ME, Kuiper I, Jaarsma D, Lamers CB, et al. (2003) Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Free Radic Biol Med* 34: 753–765.
40. Filipe P, Silva JN, Haigle J, Freitas JP, Fernandes A, et al. (2005) Contrasting action of flavonoids on phototoxic effects induced in human skin fibroblasts by UVA alone or UVA plus cyanemazine, a phototoxic neuroleptic. *Photochem Photobiol Sci* 4: 420–428.
41. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81: 230S–242S.
42. Harnish DC, Albert LM, Leathurby Y, Eckert AM, Ciarletta A, et al. (2004) Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G118–125.
43. Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vandoros G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, et al. (2003) Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* 39: 1251–1258.
44. Hering NA, Fromm M, Schulzke JD (2012) Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol* 590: 1035–1044.
45. Turner JR (2006) Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 169: 1901–1909.
46. Adams RB, Planchon SM, Roche JK (1993) IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J Immunol* 150: 2356–2363.
47. Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, et al. (2005) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 166: 409–419.
48. Weber CR, Turner JR (2007) Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall? *Gut* 56: 6–8.
49. Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD, et al. (1999) Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* 5: 262–270.
50. Hawkins JV, Emmel EL, Feuer JJ, Nedelman MA, Harvey CJ, et al. (1997) Protease activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats. *Dig Dis Sci* 42: 1969–1980.
51. Hyun E, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Vergnolle N (2008) Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* 57: 1222–1229.
52. Ji Y, Tang B, Traub RJ (2005) Modulatory effects of estrogen and progesterone on colorectal hyperalgesia in the rat. *Pain* 117: 433–442.
53. Eijkelkamp N, Heijnen CJ, Elsenbruch S, Holtmann G, Schedlowski M, et al. (2009) G protein-coupled receptor kinase 6 controls post-inflammatory visceral hyperalgesia. *Brain Behav Immun* 23: 18–26.
54. Cattaruzza F, Lyo V, Jones E, Pham D, Hawkins J, et al. (2011) Cathepsin S is activated during colitis and causes visceral hyperalgesia by a PAR2-dependent mechanism in mice. *Gastroenterology* 141: 1864–1874 e1861–1863.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Notre travail s'inscrit dans la perspective d'apporter des allégations fonctionnelles à un ingrédient naturel innovant, issu du broyage et de la fermentation du germe de soja, pour l'amélioration des pathologies digestives à caractère inflammatoire comme les MICI et non inflammatoire ou micro-inflammatoire comme les troubles fonctionnels digestifs, plus particulièrement le SII. Ces deux pathologies digestives sont multifactorielles. Ainsi, des facteurs psychologiques, des états post-infectieux ou encore des paramètres alimentaires sont incriminés dans leur étiologie. Ces pathologies présentent toutefois en commun une hypersensibilité viscérale à la distension de la paroi intestinale, tout comme une augmentation de la perméabilité intestinale et des altérations de la réponse immunitaire dans les muqueuses, ainsi qu'une augmentation de l'activité protéasique dans les fécès. Un intérêt croissant pour l'évaluation, en particulier, des propriétés anti-inflammatoires des différentes préparations à base de soja a été observé depuis les 10 dernières années. En effet, la graine de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), dans ses différentes fractions y compris le germe, présente non seulement des propriétés estrogéniques portées par les isoflavones, mais aussi une famille d'inhibiteurs de sérines protéases connue sous le nom de Bowman Birk Inhibitor (BBI) rendant le produit intéressant pour évaluer ses effets vis-à-vis des pathologies intestinales et le valoriser en tant que complément alimentaire à visée au moins préventive. Ainsi notre objectif était d'évaluer les effets et les mécanismes d'action d'un traitement par du germe de soja fermenté (SG) sur l'hyperalgésie viscérale, l'hyperperméabilité intestinale, l'inflammation et l'activité protéasique fécale dans des modèles animaux de SII et de MICI.

Ce travail s'est déroulé en deux temps. Dans un premier temps nous avons étudié les effets préventifs du SG sur l'augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale et l'hyperalgésie viscérale induites par un stress aigu chez le rat. Ce modèle expérimental utilisant le stress de contrainte reproduit pour partie les symptômes du SII et différentes approches pharmacologiques ont été menées pour déterminer les mécanismes d'action impliqués dans les propriétés montrées bénéfiques du SG. Dans un second temps, nous avons évalué si ces mêmes propriétés pouvaient se transposer à un modèle animal de MICI, chez le rat soumis à une inflammation colique induite par le TNBS, également associée à une augmentation marquée de la perméabilité intestinale et à une hyperalgésie viscérale. Dans ces deux modèles expérimentaux, un focus particulier a été porté d'une part, sur la contribution respective des phytoestrogènes (isoflavones) et de l'activité anti-protéasique (BBI) dans l'amélioration des symptômes, d'autre part, sur les propriétés préventives du traitement pour une faible dose de SG, compatible avec une utilisation chez l'homme.

Influence d'un traitement par du germe de soja fermenté sur l'hypersensibilité viscérale et l'hyperperméabilité intestinale induites par un stress de contrainte chez le rat femelle

Plusieurs études se sont intéressées aux effets du stress sur la sensibilité viscérale mais également, plus récemment, sur la perméabilité intestinale ainsi qu'aux mécanismes impliqués dans ces effets. En effet, chez l'animal, un stress aigu s'accompagne d'une hyperalgésie viscérale en réponse à une distension colorectale, impliquant une libération centrale de corticolibérine (CRF) par activation de l'axe HPA, et la dégranulation des mastocytes muqueux (Gue *et al.*, 1997). Par ailleurs, un stress aigu ou chronique induit chez le rat une augmentation de la perméabilité aux macromolécules (Santos *et al.*, 2001; Tache & Perdue, 2004) traduisant des altérations de la barrière épithéliale. Cet effet du stress sur la perméabilité intestinale met également en jeu la dégranulation des mastocytes, puisque chez les rats déficients en mastocytes, l'augmentation de perméabilité en réponse au stress n'a pas été observée (Santos *et al.*, 2001). D'autres données expérimentales ont apporté la preuve d'un lien entre les altérations de la barrière épithéliale et la douleur viscérale induites par le stress. En effet, une augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale serait susceptible de favoriser le passage d'agents indésirables présents dans la lumière intestinale à travers la barrière épithéliale, lesquels à leur tour activeraient le système immunitaire local libérant ainsi des médiateurs capables d'activer et/ou sensibiliser les terminaisons nerveuses sensibles (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005). Une telle sensibilisation traduite par une hyperalgésie viscérale en réponse à une distension colorectale, a été également décrite dans le cadre d'une inflammation expérimentale intestinale, caractérisée par une rupture de la barrière épithéliale et une activation immunitaire (Morteau *et al.*, 1994).

Ainsi, compte tenu du rôle du stress dans l'apparition et/ou l'exacerbation des symptômes du SII, l'utilisation des modèles animaux de stress permettent des approches mécanistiques qui contribuent à la compréhension de la physiopathologie du SII. En effet, les patients souffrant du SII sont caractérisés par une augmentation de la perméabilité intestinale (Marshall *et al.*, 2004) et présentent une hypersensibilité viscérale en réponse à la distension de la paroi intestinale au barostat (Bradette *et al.*, 1994). De plus, ces patients sont caractérisés par des modifications immunitaires locales telles qu'une augmentation du nombre de cellules neuroendocrines, des lymphocytes T et des lymphocytes intra-épithéliaux, et de la densité des mastocytes au niveau de la muqueuse du jéjunum et du côlon (O'Sullivan *et al.*, 2000; Dunlop *et al.*, 2003; Barbara *et al.*, 2004a).

Récemment, un rôle modulateur des estrogènes a été démontré dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire intestinale, *via* une action spécifique sur RE β (Braniste *et al.*, 2009). Les isoflavones ont aussi montré un potentiel protecteur sur les complexes de jonctions serrées, mais par des mécanismes pour la plupart encore incompris (Suzuki & Hara, 2011). L'estradiol affecte par ailleurs la sensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale chez la rate. Ainsi, l'estradiol induit une hyperalgésie chez l'animal ovariectomisé (Ji *et al.*, 2003), alors qu'au contraire il exerce un effet antinociceptif quand l'animal est intact, en agissant spécifiquement sur les RE β (Cao *et al.*, 2012). Si l'ensemble de ces données laissait entrevoir un potentiel bénéfique des isoflavones du soja dans l'intestin (où RE β domine), aucune étude ne s'était intéressée à le démontrer dans les conditions d'une altération de la barrière épithéliale et de la sensibilité viscérale induites par le stress. Dans ce contexte, nos études ont tout particulièrement été focalisées sur la fraction isoflavones du germe de soja fermenté (SG) capables de se lier aux REs, plus particulièrement à RE β (Morito *et al.*, 2001) abondamment exprimé dans les entérocytes (Konstantinopoulos *et al.*, 2003). De plus, grâce au processus de fermentation du germe de soja, les molécules d'isoflavones sont présentes sous formes aglycones, hautement biodisponibles *vs* les formes glycosylées généralement retrouvées dans les différents compartiments de la graine de soja.

Nous avons observé une variation de la perméabilité paracellulaire dans le côlon de rate (stressée ou non) au cours du cycle sexuel, plus faible en phase folliculaire (dominance estrogénique) en comparaison de la phase lutéale (dominance progestéronique), confirmant des résultats précédents obtenus au laboratoire (Braniste *et al.*, 2009). Ces fluctuations de la perméabilité paracellulaire colique reflètent essentiellement les variations plasmatiques des estrogènes au cours du cycle estral, un effet similaire des estrogènes ayant aussi été rapporté au niveau des artères carotides chez le rat (Mullick *et al.*, 2001). Le stress provoque une augmentation significative de la perméabilité intestinale et cette augmentation apparaît plus élevée quand le stress est appliqué pendant la phase lutéale, c'est-à-dire lorsque le niveau plasmatique d'estrogènes s'effondre au profit de la progestérone. Le traitement par le SG, à l'identique de l'estradiol (E2), prévient l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par le stress quelle que soit la phase du cycle. Dans notre étude, nous avons montré que cette protection chez la femelle relevait d'une diminution estrogéno-dépendante de la perméabilité paracellulaire intestinale, car bloquée par l'administration de l'antagoniste ICI 182,780 des REs nucléaires. Le RE β étant le récepteur dominant au niveau du côlon (Campbell-Thompson *et al.*, 2001; Konstantinopoulos *et al.*, 2003), nos résultats ont montré que les propriétés

préventives du SG sur l'hyperperméabilité paracellulaire colique induite par un stress relevait essentiellement des propriétés estrogéniques des isoflavones. Très probablement ces effets bénéfiques résultent de l'activation de la voie RE β , puisque seule une stimulation par un agoniste spécifique de ce récepteur, le DPN (diarylpropionitrile) s'accompagne d'une diminution de la perméabilité paracellulaire dans le côlon (Braniste *et al.*, 2009).

Nous nous sommes attachés par la suite à la caractérisation des altérations de la barrière épithéliale intestinale induite par le stress. La perméabilité paracellulaire intestinale est régulée principalement par les jonctions serrées (JS) intercellulaires constituées d'un complexe de protéines transmembranaires et cytoplasmiques (Fanning *et al.*, 1999; Tsukita & Furuse, 2000). Notre objectif était d'évaluer les effets du SG sur l'expression de l'occludine, une protéine transmembranaire des JS associée au cytosquelette des cellules épithéliales. Chez les rates stressées, nous avons rapporté que le SG ainsi que l'E2 induisaient une surexpression de l'occludine, aboutissant à une réduction des espaces paracellulaires, donc de la perméabilité. Une sur-expression de l'occludine a également été observée au niveau de l'endothélium vasculaire (Ye *et al.*, 2003), de l'épithélium vaginal (Gorodeski, 2001) et du côlon (Braniste *et al.*, 2009) mais essentiellement chez la rate ovariectomisée et en conditions basales, sans stress.

L'épithélium intestinal, qui participe à l'immunité innée comme première ligne de défense physique et sa capacité à produire et libérer des cytokines, est largement impliqué dans le maintien d'une homéostasie intestinale. Les cellules épithéliales, qui forment normalement une barrière « étanche », peuvent être à l'origine d'une activation excessive du système immunitaire en cas de perméabilité intestinale accrue, favorisant l'apparition d'un état inflammatoire (Turner, 2006). Ainsi l'importance de l'hyperperméabilité intestinale dans la pathogenèse et le maintien du SII est aujourd'hui bien reconnue (Piche *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009).

Suivant une récente méta-analyse, la prévalence du SII chez la femme apparaît légèrement plus élevée comparativement aux hommes et ceci demeure relativement stable aussi bien en fonction des critères diagnostiques de Rome utilisés que de la distribution géographique des populations étudiées. Toutefois une différence marquée en fonction du genre, concerne les sous-types du SII, avec une prévalence forte chez la femme du SII à dominance constipation (Lovell & Ford, 2012). Ceci souligne que la prédominance des estrogènes chez la femme ne s'accompagne pas systématiquement d'une diminution du risque de développer la maladie. Par ailleurs, chez la patiente SII en âge de fertilité, la perception

exacerbée de la douleur abdominale en période pré-menstruelle suggère que le seuil de sensibilité viscérale est abaissé en présence de faibles niveaux circulants d'estrogènes et de progestérone, caractéristiques de la fin de cycle (Heitkemper *et al.*, 2003). Une concentration plasmatique élevée en hormones dans les autres périodes du cycle menstruel apparaîtrait alors protectrice vis-à-vis de l'hypersensibilité viscérale associée au SII (Heitkemper & Chang, 2009).

A l'approche des menstruations, l'idée que la chute d'estrogènes plasmatiques puisse contribuer à baisser les seuils de perception de la douleur n'est cependant pas soutenue par la littérature dans les études pharmacologiques chez l'animal castré. En effet, l'estradiol apparaît pronociceptif chez la rate ovariectomisée sous distension colrectale par rapport aux contrôles non traités, un effet partiellement contrebalancé par la progestérone lorsque l'animal reçoit les deux hormones (Ji *et al.*, 2005). Cependant, ces mêmes auteurs ont récemment montré que des femelles intactes étaient beaucoup moins sensibles à la distension colrectale que l'animal ovariectomisé et supplémenté en estradiol, montrant même une hypoalgésie en comparaison des femelles castrées sans stéroïdes (Ji *et al.*, 2008). Pour expliquer ces différences dans les deux modèles, les auteurs ont conclu à un effet protecteur de la progestérone au cours du cycle estral sur la perception de la douleur stimulée par l'estradiol (Ji *et al.*, 2005, 2008). Plus récemment, Cao et collaborateurs ont montré que la réponse viscéromotrice en réponse à une distension colrectale chez la rate intacte ainsi que l'activité neuronale au niveau de la corne dorsale diminuent après administration périphérique d'agonistes sélectifs des RE β . Ces données soulignent qu'une activation des RE β serait responsable de l'effet antinociceptif induit par les estrogènes (Cao *et al.*, 2012).

Nos résultats montrent une augmentation de la sensibilité viscérale pendant la phase folliculaire par rapport à la phase lutéale chez les rates stressées et non stressées. Le traitement par le SG prévient l'hyperalgésie viscérale induite par le stress quelle que soit la période du cycle. Cet effet anti-nociceptif est médié par les REs car bloqué par le ICI 182,780. Récemment, une étude réalisée au laboratoire a montré que l'agoniste spécifique des RE α (PPT – propyl pyrazol triol) ne modifie pas l'hypersensibilité viscérale induite par le stress chez la rate en dioestrus du cycle, alors que l'administration de DPN, un agoniste sélectif des RE β , a complètement bloqué l'hypersensibilité viscérale en réponse aux stimuli nociceptifs (0,8 et 1,2 ml) (données non publiées). Ces effets anti-nociceptifs du DPN ainsi que du SG concourent à présenter la voie RE β comme une cible d'intérêt thérapeutique pour diminuer de

façon concomitante la perméabilité intestinale et la douleur abdominale chez les patients SII, un concept confirmé par les très récents travaux de Cao et al (2012).

Afin de définir si les effets bénéfiques du SG sur l'hypersensibilité viscérale pouvaient relever d'un contrôle spécifique de l'axe HPA en conditions de stress, nous avons mesuré la corticostéronémie en l'absence et en présence du traitement. Cette augmentation n'a pas été prévenue par le traitement au SG, suggérant que les effets anti-nociceptifs du SG ne sont pas le résultat d'une diminution de la réponse de l'axe HPA au stress mais relèvent essentiellement d'une action périphérique RE-dépendante.

Dans l'objectif de valider les effets du traitement par le SG sur les altérations de la perméabilité intestinale et la viscérosensibilité, nous avons également utilisé un modèle de stress chronique, le stress de séparation maternelle, mimant la symptomatologie et physiopathologie du SII (Barreau *et al.*, 2004; Gareau *et al.*, 2007). Les animaux stressés en période néonatale présentaient à l'âge adulte une augmentation de la perméabilité intestinale et une hypersensibilité viscérale en accord avec les données de la littérature (Barreau *et al.*, 2004; Gareau *et al.*, 2007). Par contre, un traitement pendant 15 jours par le SG à l'âge adulte d'animaux ayant subi le stress de séparation maternelle prévient aussi bien l'hyperperméabilité intestinale que l'hypersensibilité viscérale.

Au regard de l'ensemble des résultats obtenus dans les deux modèles de stress utilisés, notre hypothèse est que, chez le rongeur stressé, les isoflavones contenues dans le SG agissent au niveau de l'épithélium intestinal par activation de la voie RE β et renforcent la barrière épithéliale. Ce renforcement conduit par la suite à une diminution de l'hypersensibilité viscérale induite par le stress. En effet, un lien de cause à effet entre l'augmentation de la perméabilité intestinale et l'hypersensibilité viscérale chez la rate stressée a été montré (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2005). Ainsi, l'instillation intra-rectale chez l'animal stressé d'un agent pharmacologique (triaminopyrimidine – TAP) bloquant l'ouverture des JS et par conséquent l'augmentation de la perméabilité intestinale, induit une baisse de l'hypersensibilité viscérale induite par le stress. La prévention de l'hypersensibilité viscérale résultant de la diminution de la perméabilité paracellulaire intestinale pourrait être expliquée par un moindre passage d'agents indésirables provenant de la lumière intestinale susceptibles d'activer l'immunité de la muqueuse et la libération des médiateurs pro-inflammatoires capables à leur tour d'activer et/ou de sensibiliser les terminaisons nerveuses sensibles.

Les mastocytes sont des cellules immunitaires résidentes au niveau de la muqueuse intestinale qui jouent un rôle majeur dans les conséquences digestives induites par le stress, comme l'hypersensibilité viscérale ou l'augmentation de la perméabilité paracellulaire. Par ailleurs, une augmentation de leur nombre à différents sites du tube digestif (Weston *et al.*, 1993; O'Sullivan *et al.*, 2000) ainsi qu'une augmentation en tryptase (enzyme contenue dans les granules des mastocytes) dans la muqueuse colique ont été observées chez les patients atteints de SII (Chadwick *et al.*, 2002; Cenac *et al.*, 2007). Plusieurs études ont montré une proximité anatomique étroite entre les mastocytes et les terminaisons sensibles aussi bien chez l'animal (Stead & Bienenstock, 1990) que dans l'intestin humain (Stead *et al.*, 1989). Cette proximité anatomique constitue le support physique d'une communication bidirectionnelle entre le système nerveux central et l'intestin par laquelle le stress, parmi d'autres facteurs régulateurs, influence l'homéostasie et la perception sensitive intestinale. En effet, les mastocytes peuvent répondre à des neurotransmetteurs et synthétiser et sécréter en retour des médiateurs (CRF, substance P, sérotonine, NGF, ...) susceptibles de moduler la réponse des neurones. Chez l'animal, la stabilisation des mastocytes par administration de doxantrazole diminue l'hypersensibilité viscérale induite par un stress aigu (Gue *et al.*, 1997). La mise en contact des médiateurs provenant des mastocytes muqueux de patients SII avec le ganglion spinal de rat conduit à une augmentation de l'activité de neurones sensitifs et de la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire (Barbara *et al.*, 2007) suggérant une implication de ces médiateurs dans le processus nociceptif chez les patients SII. De plus, une proximité mastocyte muqueux-fibres nerveuses plus importante a été observée au niveau de la muqueuse colique des patients SII vs les sujets sains et cette proximité a été positivement corrélée avec la sévérité et la fréquence de la douleur abdominale chez ces patients (Barbara *et al.*, 2004b).

Les mastocytes ont été également largement incriminés dans les altérations de la barrière épithéliale intestinale induites par le stress. Ainsi, une déficience en mastocytes caractérisant le rat Ws/Ws se traduit par une absence d'augmentation de la perméabilité intestinale induite par un stress chronique (Santos *et al.*, 2001). De la même façon, l'administration d'un antagoniste du CRF chez le rat soumis à un stress physique ou psychologique, prévient l'augmentation de la perméabilité intestinale (Saunders *et al.*, 2002). Parmi les médiateurs libérés par les mastocytes muqueux, une attention particulière a été portée plus récemment à la tryptase. En effet, la tryptase en activant le PAR-2 au niveau des

cellules épithéliales engendre une augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale (Cenac *et al.*, 2003).

Dans notre étude, une diminution de la surface des mastocytes sans modification de leur densité dans les muqueuses a été observée après la session de stress, suggérant la survenue d'une dégranulation de ces cellules sans changement de leur nombre. Dans le modèle du stress de contrainte, une dégranulation (Castagliuolo *et al.*, 1996) et/ou activation (Eutamene *et al.*, 2003) des mastocytes a été observée. Le traitement par le SG n'a pas prévenu la dégranulation des mastocytes induite par le stress, mais par contre, il s'est accompagné d'une diminution significative de leur densité. Cet effet implique également une voie REs-dépendante puisqu'il a été contrebalancé par l'administration de l'antagoniste ICI 182,780 des REs nucléaires. La littérature attribue à la génistéine et la daidzéine (isoflavones ayant une affinité marquée pour les RE β) la capacité d'inhiber la prolifération et la croissance des mastocytes (Alexandrakis *et al.*, 2003). Nous émettons l'hypothèse que le SG riche en génistéine et daidzéine favorise l'inhibition de la mastocytose au niveau de la muqueuse intestinale. Ainsi, la réduction de la densité des mastocytes provoquée par le traitement au SG chez l'animal stressé peut conduire à une moindre libération des médiateurs pro-inflammatoires lors de la dégranulation induite par le stress et par conséquent contribuer à la limitation des effets délétères de ces médiateurs.

Le tractus gastro-intestinal est continuellement exposé à une grande quantité d'enzymes protéolytiques. Les protéases présentes au niveau de la lumière intestinale peuvent être d'origine endogène sécrétées par les glandes digestives et les cellules épithéliales (trypsine, chymotrypsine, élastase-1), les cellules immunitaires (tryptase et élastase neutrophilaire) ou encore d'origine bactérienne (Lin *et al.*, 2000). Les protéases sont capables de réguler les fonctions cellulaires en agissant sur les récepteurs activés par des protéases (PARs) (Vergnolle, 2003). Les PARs constituent une famille de récepteurs largement exprimés dans le tube digestif dont quatre membres ont été clonés : PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-4 (Nystedt *et al.*, 1994). Il s'agit de récepteurs couplés à une protéine G dont l'activation se fait par clivage protéolytique au niveau d'un résidu sérine sur la partie NH₂ terminale du récepteur par une sérine-protéase. Le récepteur PAR-2 présente un fort taux d'expression plus particulièrement au niveau de l'intestin grêle et du côlon et peut être activé par la trypsine ou la tryptase.

Chez l'animal, une perfusion intra-colique d'un agoniste des récepteurs PAR-2 à des doses n'induisant pas une inflammation, provoque une hyperalgésie viscérale (Coelho *et al.*, 2002) et une augmentation de la perméabilité paracellulaire colique (Cenac *et al.*, 2004). Par ailleurs, des études récentes au laboratoire ont montré que les selles de patients SII à prédominance diarrhée (SII-D) présentaient une activité sérine-protéase élevée comparativement aux sujets sains (Roka *et al.*, 2007). De plus, cette activité a été montrée comme responsable de l'augmentation de la perméabilité intestinale et de l'hypersensibilité viscérale chez l'animal recevant une perfusion intra-colique de surnageant fécal des patients SII-D par activation des PAR-2 exprimés par l'épithélium colique (Gecse *et al.*, 2008). Chez l'animal, le stress aigu stimule la sécrétion de la trypsine pancréatique provoquant une augmentation de l'activité protéolytique. Cette augmentation a été prévenue par l'administration d'inhibiteurs de protéases et un antagoniste des PAR-2 (Demaude *et al.*, 2009). Le germe de soja fermenté utilisé dans notre étude contient une famille d'inhibiteurs de sérine-protéases (BBI) (Birk, 1985). Les molécules de cette famille sont des peptides de petite taille (60 à 90 acides aminés) possédant un nombre élevé (7) de ponts disulfures et résistant à la chaleur (Jaulent & Leatherbarrow, 2004). Un essai clinique récent a montré des effets bénéfiques d'un traitement par un concentré de BBI chez des patients souffrant de la RCH (Lichtenstein *et al.*, 2008), pathologie caractérisée également par un niveau d'activité sérine-protéase fécale élevé (Roka *et al.*, 2007). Dans notre étude, conformément à la littérature, nous avons observé une augmentation de l'activité protéolytique dans les fécès des animaux soumis à une session de stress. En revanche, le traitement par le SG a prévenu cette augmentation. Il est important de souligner que, chez l'animal non stressé (conditions basales), le traitement par le SG n'a pas modifié l'activité protéolytique fécale et par conséquent, il peut être considéré dépourvu d'effets délétères consécutifs à une telle diminution en conditions physiologiques.

Les données obtenues par cette première étude montrent que le traitement par le SG prévient l'hyperperméabilité intestinale et l'hypersensibilité viscérale induites par le stress chez le rat femelle. Ces effets impliquent d'une part, la capacité du produit à exercer un effet phytoestrogénique au niveau de l'intestin grâce à la présence des isoflavones et d'autre part, sa capacité à inhiber l'augmentation de l'activité protéolytique induite par le stress grâce à la présence de BBI.

Influence d'un traitement par du germe de soja fermenté sur la sévérité d'une colite expérimentale et l'hypersensibilité viscérale et l'hyperperméabilité intestinale associées

Dans cette deuxième étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires du traitement par le SG à l'aide d'un modèle mimant la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), la colite expérimentale induite par l'instillation intra-rectale de TNBS/éthanol. En effet, l'administration du TNBS/éthanol induit une réponse immunitaire locale et systémique et une rupture de la fonction barrière de l'intestin reproduisant ainsi les symptômes caractéristiques de ces maladies (Appleyard & Wallace, 1995). Les MICI sont des maladies chroniques caractérisées par une réponse immunitaire innée et adaptative inappropriées (Shih & Targan, 2008), une augmentation de l'activité protéasique au niveau de la lumière intestinale (Roka *et al.*, 2007) ainsi qu'une surexpression des PAR-2 dans la muqueuse intestinale (Kim *et al.*, 2003), une augmentation de la perméabilité intestinale (Soderholm *et al.*, 2004) et de la douleur abdominale (Drewes *et al.*, 2006).

Dans cette étude, nous avons observé que la muqueuse colique des animaux traités au TNBS/éthanol se caractérisait par une surexpression des cytokines pro-inflammatoires (MIF et IL-1 β), une diminution de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, ainsi qu'une diminution de l'infiltration tissulaire de polynucléaires neutrophiles. En revanche, le traitement préventif par le SG a réduit la sévérité de la colite et a inversé la balance des cytokines, i.e réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires Th1 (MIF et IL-1 β) et augmentation de l'expression de l'IL-10. Il est important de souligner que, chez les rats témoins, le traitement par le SG augmente également la sécrétion tissulaire d'IL-10. Un effet anti-inflammatoire induit par un traitement oral par la génistéine est également décrit dans la littérature, mais les mécanismes d'action n'avaient pas été abordés dans cette étude (Seibel *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été montré que le MIF ainsi que l'IL-1 β induisent un recrutement de neutrophiles (Arai *et al.*, 1998; Makita *et al.*, 1998), et que le blocage de l'activité du MIF induit une diminution de l'expression de la cytokine IL-1 β (Murakami *et al.*, 2002; Ohkawara *et al.*, 2002). Il est probable alors que la diminution de l'infiltration neutrophilaire et de la production d'IL-1 β dans les zones enflammées chez les rates traitées par le SG résultent de l'inhibition de la production du MIF par ce traitement.

Chez l'homme, une déficience de la sécrétion d'IL-10 ou des mutations de son récepteur IL-10R ont été incriminées dans la pathogénèse des MICI (Glocker *et al.*, 2009).

Des études conduites chez l'animal reportent que la thérapie par IL-10 recombinante exerce un puissant effet anti-inflammatoire dans différents modèles d'inflammation intestinale (Barbara *et al.*, 2000; Asadullah *et al.*, 2003) en limitant en particulier la réponse de type Th1 (Paul *et al.*, 2012). Ainsi, nous suggérons que l'augmentation de l'expression d'IL-10 induite par le traitement au SG contribue à ses propriétés anti-inflammatoires en modulant la réponse Th1.

Aussi bien les effets immunomodulateurs qu'anti-inflammatoires du traitement par le SG ont été bloqués par l'administration de l'antagoniste ICI 182,780 des REs nucléaires, confirmant l'implication d'une voie RE-dépendante dans ces effets. Plusieurs études font référence aux propriétés anti-inflammatoires des estrogènes vis-à-vis de l'inflammation colique (Verdu *et al.*, 2002; Harnish *et al.*, 2004; Houdeau *et al.*, 2007), en partie médiées par une diminution RE-dépendante de la libération de MIF par les cellules épithéliales et les macrophages (Houdeau *et al.*, 2007). De plus, l'administration d'un agoniste spécifique RE β exerce un effet anti-inflammatoire marqué dans le modèle de colite chez le rat transgénique HLA-B27 (Harnish *et al.*, 2004). Compte tenu d'une part, de l'expression marquée des RE β dans les colonocytes et d'autre part, de l'affinité préférentielle des isoflavones pour ce récepteur, nous suggérons que les effets anti-inflammatoires du traitement par le SG pourraient impliquer une voie de signalisation RE β dans les muqueuses de l'intestin.

Une augmentation de la perméabilité intestinale a été observée chez des patients atteints de MICI (May *et al.*, 1993; Peeters *et al.*, 1994; Peeters *et al.*, 1997) et cette augmentation a été également observée dans le modèle de colite induite par le TNBS/éthanol (Soderholm *et al.*, 2004; Hering *et al.*, 2012). Dans notre étude, conformément à la littérature, nous avons observé une augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale chez les rats traités au TNBS/éthanol. Le traitement préventif par le SG a prévenu cette augmentation. De plus, l'effet du traitement par le SG vis-à-vis de l'hyperperméabilité intestinale induite par le TNBS/éthanol a été effacé par l'administration de l'antagoniste ICI 182,780, soulignant de nouveau l'implication d'une voie RE-dépendante. Les travaux de notre équipe montrent désormais que les isoflavones comme l'estradiol diminuent la perméabilité intestinale en modulant l'expression des protéines des JS (Braniste *et al.*, 2009; Moussa *et al.*, 2012). Nous avons en effet montré dans la première étude de notre travail de thèse que le traitement par le SG diminuait l'hyperperméabilité induite par le stress, effet accompagné d'une augmentation de l'expression de l'occludine (Moussa *et al.*, 2012). D'autre part, la diminution de la sécrétion d'IL-10 a été incriminée dans l'augmentation de la perméabilité intestinale (Madsen

et al., 1999; Oshima *et al.*, 2001). Compte tenu de l'ensemble de ces données nous suggérons que le traitement par le SG diminue la perméabilité paracellulaire intestinale au cours de la colite en renforçant préalablement l'expression des protéines des JS.

Une donnée originale de cette étude consiste à montrer pour la première fois une exacerbation de l'expression des PAR-2 au niveau du côlon chez le rat, observée durant toute la période post-TNBS. Ceci est en accord avec la littérature montrant qu'une déficience en PAR-2 limite la sévérité et le développement de la réaction inflammatoire dans différents modèles de colite expérimentale, y compris celui induit par le TNBS/éthanol (Hyun *et al.*, 2008). L'augmentation de la perméabilité intestinale et de l'hypersensibilité viscérale suite à l'activation des PAR-2 est actuellement bien documentée (Adams *et al.*, 1993; Ceponis *et al.*, 2000; Cenac *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). De plus, il est intéressant de souligner que cinq jours après l'induction de la colite, malgré la libération massive des protéases dans la lumière intestinale, nous n'avons pas observé de désensibilisation des PAR-2. Le traitement par le SG doté des propriétés anti-inflammatoires contrebalance l'expression exacerbée des PAR-2 dans le côlon enflammé. Par contre, chez le rat témoin, le traitement par le SG ne modifie pas l'expression constitutive des PAR-2 au niveau de la muqueuse colique. En tenant compte de l'ensemble de nos données, nous proposons que l'effet anti-inflammatoire du traitement par le SG vis-à-vis de la colite induite par le TNBS/éthanol résulte d'une combinaison d'effets comprenant sa capacité (i) à inhiber l'augmentation de l'activité protéolytique dans la lumière intestinale, (ii) à modifier le profil d'expression des PAR-2, (iii) aux propriétés anti-inflammatoires des phytoestrogènes impliquant des voies RE-dépendantes.

Un autre symptôme caractéristique des patients souffrant de MICI est la douleur abdominale. Dans la rectocolite hémorragique (RCH) ainsi que dans les modèles de colite expérimentale, une diminution du seuil de la douleur viscérale a été observée (Morteau *et al.*, 1994; Drewes *et al.*, 2006). Nos résultats montrent que le traitement par le SG prévient l'hypersensibilité viscérale induite par le TNBS/éthanol sans modification dans la compliance colique suggérant que l'effet anti-nociceptif observé n'est pas lié à des changements du tonus musculaire. De plus, cet effet anti-nociceptif a été bloqué par l'administration de l'antagoniste ICI 182,780. Cette donnée est en désaccord avec de plus anciens travaux montrant que, chez le rat femelle ovariectomisé (OVX) soumis à une colite expérimentale, l'administration d'estradiol exacerbe la sensibilité viscérale associée à l'inflammation colique (Ji *et al.*, 2005). Une possible explication dans ces différences observées peut être attribuée (i) au statut hormonal des animaux, i.e OVX vs animal intact (ii) la voie d'administration i.e

administration systémique aigu vs traitement oral chronique. Très récemment cependant, Cao et collègues ont aussi montré l'existence d'une voie RE β anti-nociceptive au niveau spinal chez l'animal non castré (Cao *et al.*, 2012). Un mécanisme similaire peut justifier les propriétés anti-nociceptives du SG dans notre travail, car riche en isoflavones se liant préférentiellement à RE β , à la condition toutefois que ces éléments traversent la barrière hémato-encéphalique. Une autre explication peut être attribuée à la capacité anti-inflammatoire du traitement par le SG et sa capacité à diminuer la perméabilité paracellulaire intestinale. En effet, le traitement par le SG diminue l'expression d'IL-1 β induite par le TNBS/éthanol. Cette cytokine pro-inflammatoire est capable de sensibiliser les récepteurs TRPV1 impliqués dans l'hyperalgésie associée à l'inflammation (Eijkelkamp *et al.*, 2009). Par ailleurs, nous pouvons émettre l'hypothèse que la libération de sérine-protéases comme les cathepsines au cours de la colite sont susceptibles d'activer des récepteurs nociceptifs et induire ainsi une hypersensibilité viscérale via une activation des récepteurs PAR-2 (Cattaruzza *et al.*, 2011).

Les données de cette deuxième étude montrent que le traitement préventif par le SG exerce un effet anti-inflammatoire vis-à-vis d'une colite induite par le TNBS/éthanol et diminue l'hyperperméabilité intestinale et l'hypersensibilité viscérale associées à l'inflammation. Les mécanismes d'action impliqués dans ces effets impliquent deux voies différentes mais synergiques liées à la composition du produit administré. La capacité phytoestrogénique du produit active une voie RE-dépendante et la présence dans sa composition du BBI une voie PAR-2 dépendante.

CONCLUSIONS

La culture de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) pratiquée depuis des millénaires en Extrême-Orient a été développée dans les pays occidentaux à partir du 19^{ème} siècle. La première destination des graines de soja produites en France est l'alimentation animale, mais la part destinée à l'alimentation humaine (soyfoods) augmente de façon régulière (30% des graines en 2009 contre 5% en 2003). Le soja est également utilisé de façon croissante par l'industrie parapharmaceutique pour ses teneurs importantes en produits bioactifs. Parmi ces produits figurent les fractions protéique et lipidique mais surtout les molécules provenant du métabolisme secondaire de la plante incluant vitamines, flavonoïdes facteurs anti-trypsiques (BBI), etc. La distribution de composés bioactifs dans les différents compartiments de la graine présente de fortes variations et bien que le germe de soja ne représente que 2 à 3% de la masse totale de la graine, il est particulièrement concentré en ces différents composés (Hubert *et al.*, 2005). Dans l'industrie agro-alimentaire, le germe de soja constitue un co-produit parce qu'il est éliminé à cause de ses propriétés organoleptiques indésirables (astringence, amertume). Par contre, il représente une fraction intéressante pour l'industrie parapharmaceutique. C'est ainsi qu'en 1999 la Food and Drug Administration (FDA) a reconnu officiellement le germe de soja comme un ingrédient naturel à fort potentiel pour des utilisations « santé ».

Le partenaire industriel de ce travail, GENIBIO, situé en proximité du bassin de production du soja (Sud-Ouest), s'approvisionne en lots de germe de soja dans le but de développer d'ingrédients innovants. Après un premier investissement en recherche visant à mettre au point un procédé de fermentation lactique afin d'ôter les propriétés sensorielles indésirables et améliorer les capacités intrinsèques du produit, GENIBIO et l'équipe de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition ont décidé de mettre en place le programme de cette thèse. Ainsi l'objectif de ce programme s'inscrivait dans la perspective d'apporter des allégations fonctionnelles à cet ingrédient naturel innovant. Des résultats ont montré que le procédé de fermentation lactique mis au point (i) n'altère pas la teneur des composés bioactifs du germe de soja (isoflavones, inhibiteurs de protéases...) (ii) parmi ces composés, les isoflavones se retrouvent après fermentation en forme aglycones hautement biodisponibles vs les formes glycosylées (Hubert *et al.*, 2008). Ainsi, le rationnel pour l'évaluation des effets du traitement par le germe de soja fermenté s'est basé sur sa richesse d'une part en isoflavones (phytoestrogènes se liant préférentiellement sur les RE β) sous forme aglycones et d'autre part la présence de la famille d'inhibiteurs de protéases BBI. Dans la littérature, les études montrant soit un effet bénéfique vis-à-vis de l'inflammation digestive ou l'augmentation de la

perméabilité intestinale par les isoflavones se limitent à l'évaluation d'isoflavones isolées (le plus souvent la génistéine) (Seibel *et al.*, 2009; Suzuki & Hara, 2011) et demeurent descriptives. De plus, les études portant sur ces propriétés des isoflavones ont été réalisées soit *in vitro*, soit *in vivo* en utilisant de fortes doses (de l'ordre de 100 mg/kg). Ces données rendent l'extrapolation des effets et du bénéfice chez l'homme difficile. Les effets préventifs du traitement par le germe de soja obtenus dans les deux modèles utilisés dans notre étude l'ont été par une exposition quotidienne *per os* à des doses très faibles de formes équivalentes d'isoflavones aglycones (0,45 mg/rat/j), proches de celles autorisées chez l'Homme par l'AFSSA (1mg/kg/j). De plus, malgré la complexité de la composition en molécules bioactives du germe de soja fermenté, nous avons pu conduire une étude mécanistique montrant deux voies d'action impliquées. La première concerne le potentiel phytoestrogénique du traitement dû à la teneur en isoflavones. L'utilisation de l'antagoniste ICI 182,780 montre clairement qu'aussi bien la diminution de la sévérité de la colite expérimentale, que la prévention de l'hyperperméabilité intestinale et de l'hypersensibilité viscérale induites par le stress impliquent systématiquement une activation locale des REs. Il est intéressant de souligner que dans le cadre du modèle de stress, le traitement par le germe de soja prévient les altérations de la perméabilité et de la sensibilité viscérale de façon comparable à un traitement oral par l'estradiol. La deuxième voie impliquée est associée à la présence de la famille des inhibiteurs de protéases BBI. La diminution de l'activité protéolytique fécale et de la surexpression des récepteurs PAR-2 induites par la colite suite au traitement par le germe de soja fermenté peut largement contribuer à la diminution de la sévérité de l'inflammation. De plus, l'activation des récepteurs PARs situés sur la face apicale des cellules épithéliales intestinales par une présence accrue de protéases dans la lumière conduisant à une diminution de la perméabilité intestinale et de la sensibilité viscérale est bien documentée. Le traitement par le germe de soja dans le cadre des deux modèles utilisés a prévenu l'augmentation de l'activité protéolytique induite par le stress ou par la colite, suggérant que la présence de BBI dans le produit testé contribue aux effets bénéfiques observés.

L'ensemble de notre travail apporte des données précliniques et propose des mécanismes d'action qui renforcent le rationnel pour des futures allégations concernant l'ingrédient germe de soja fermenté, en tant qu'outil utile dans la prise en charge thérapeutique des patients SII ou MICI. En effet, les outils pharmacologiques destinés au SII sont actuellement décevants et les traitements conventionnels des MICI demeurent lourds. La

prolongation des phases de rémission dans le cadre des MICI par des traitements adjuvants peut représenter un bénéfice pour le patient.

RÉFÉRENCES

- Adams RB, Planchon SM & Roche JK. (1993). IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J Immunol* **150**, 2356-2363.
- AFSSA. (2005). Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations.
- Ait-Belgnaoui A, Bradesi S, Fioramonti J, Theodorou V & Bueno L. (2005). Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* **113**, 141-147.
- Akira S, Uematsu S & Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Al-Chaer ED, Kawasaki M & Pasricha PJ. (2000). A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology* **119**, 1276-1285.
- Alexandrakis MG, Kyriakou DS, Kempuraj D, Huang M, Boucher W, Seretakis D & Theoharides TC. (2003). The isoflavone genistein inhibits proliferation and increases histamine content in human leukemic mast cells. *Allergy Asthma Proc* **24**, 373-377.
- Annese V, Bassotti G, Napolitano G, Usai P, Andriulli A & Vantrappen G. (1997). Gastrointestinal motility disorders in patients with inactive Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **32**, 1107-1117.
- Appleyard CB & Wallace JL. (1995). Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am J Physiol* **269**, G119-125.
- Arai Y, Takanashi H, Kitagawa H & Okayasu I. (1998). Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Cytokine* **10**, 890-896.
- Arnott ID, Kingstone K & Ghosh S. (2000). Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* **35**, 1163-1169.
- Arrate MP, Rodriguez JM, Tran TM, Brock TA & Cunningham SA. (2001). Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. *J Biol Chem* **276**, 45826-45832.
- Artis D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* **8**, 411-420.
- Artursson P, Palm K & Luthman K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 27-43.
- Asadullah K, Sterry W & Volk HD. (2003). Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* **55**, 241-269.

- Atkinson HC & Waddell BJ. (1997). Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* **138**, 3842-3848.
- Atkinson KJ & Rao RK. (2001). Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G1280-1288.
- Bakshi VP & Kalin NH. (2000). Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: gene-environment interactions. *Biol Psychiatry* **48**, 1175-1198.
- Bale TL & Vale WW. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 525-557.
- Bamias G, Sugawara K, Pagnini C & Cominelli F. (2003). The Th1 immune pathway as a therapeutic target in Crohn's disease. *Curr Opin Investig Drugs* **4**, 1279-1286.
- Bandeira A, Mota-Santos T, Itohara S, Degermann S, Heusser C, Tonegawa S & Coutinho A. (1990). Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J Exp Med* **172**, 239-244.
- Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Salvioli B & Corinaldesi R. (2004a). New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* **20 Suppl 2**, 1-9.
- Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM & Corinaldesi R. (2004b). Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **126**, 693-702.
- Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, Bunnett NW, Grundy D & Corinaldesi R. (2007). Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **132**, 26-37.
- Barbara G, Xing Z, Hogaboam CM, Gauldie J & Collins SM. (2000). Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* **46**, 344-349.
- Barnes S, Kim H, Darley-USmar V, Patel R, Xu J, Boersma B & Luo M. (2000). Beyond ERalpha and ERbeta: estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *J Nutr* **130**, 656S-657S.
- Barreau F, Cartier C, Leveque M, Ferrier L, Moriez R, Laroute V, Rosztoczy A, Fioramonti J & Bueno L. (2007). Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *J Physiol* **580**, 347-356.

- Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J & Bueno L. (2004). Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* **53**, 501-506.
- Baugh JA & Donnelly SC. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J Endocrinol* **179**, 15-23.
- Baumgart DC & Sandborn WJ. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **369**, 1641-1657.
- Beeson PB. (1994). Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med* **96**, 457-462.
- Bennett EJ, Tennant CC, Piesse C, Badcock CA & Kellow JE. (1998). Level of chronic life stress predicts clinical outcome in irritable bowel syndrome. *Gut* **43**, 256-261.
- Berg RD & Savage DC. (1975). Immune responses of specific pathogen-free and gnotobiotic mice to antigens of indigenous and nonindigenous microorganisms. *Infect Immun* **11**, 320-329.
- Birk Y. (1985). The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *Int J Pept Protein Res* **25**, 113-131.
- Bischoff SC & Kramer S. (2007). Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. *Immunol Rev* **217**, 329-337.
- Blanchette J, Kavimandan N & Peppas NA. (2004). Principles of transmucosal delivery of therapeutic agents. *Biomed Pharmacother* **58**, 142-151.
- Blaukat A. (2003). Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia* **35**, 17-23.
- Bonaz BL & Bernstein CN. (2012). Brain-Gut Interactions in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*.
- Braden AWH, Hart NK & Lamberton JA. (1967). The oestrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. *Aust J Res* **18**, 335-348.
- Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R, Fioramonti J & Bueno L. (2002). Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats. *Neurogastroenterol Motil* **14**, 75-82.
- Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R, Fioramonti J & Bueno L. (2003). Stress-induced visceral hypersensitivity in female rats is estrogen-dependent and involves tachykinin NK1 receptors. *Pain* **102**, 227-234.
- Bradette M, Delvaux M, Staumont G, Fioramonti J, Bueno L & Frexinos J. (1994). Evaluation of colonic sensory thresholds in IBS patients using a barostat. Definition of optimal conditions and comparison with healthy subjects. *Dig Dis Sci* **39**, 449-457.

- Brandon D, Bates AH & Friedman M. (2004). Immunoassays for Bowman-Birk and Kunitz soybean trypsin inhibitors in infant formula. *J Food Sci* **69**, 11-15.
- Braniste V, Jouault A, Gaultier E, Polizzi A, Buisson-Brenac C, Leveque M, Martin PG, Theodorou V, Fioramonti J & Houdeau E. (2010). Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 448-453.
- Braniste V, Leveque M, Buisson-Brenac C, Bueno L, Fioramonti J & Houdeau E. (2009). Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *J Physiol* **587**, 3317-3328.
- Brown NM & Lamartiniere CA. (2000). Genistein regulation of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor (EGF), and EGF receptor expression in the rat uterus and vagina. *Cell Growth Differ* **11**, 255-260.
- Bruckert E & Rosenbaum D. (2011). Lowering LDL-cholesterol through diet: potential role in the statin era. *Curr Opin Lipidol* **22**, 43-48.
- Bueno L, Fioramonti J & 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.
- Buhner S, Li Q, Vignali S, Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Zeller F, Langer R, Daniel H, Michel K & Schemann M. (2009). Activation of human enteric neurons by supernatants of colonic biopsy specimens from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **137**, 1425-1434.
- Calandra T & Roger T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 791-800.
- Caldji C, Diorio J & Meaney MJ. (2000). Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry* **48**, 1164-1174.
- Camilleri M & Talley NJ. (2004). Pathophysiology as a basis for understanding symptom complexes and therapeutic targets. *Neurogastroenterol Motil* **16**, 135-142.
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ & Bhardwaj B. (2001). Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* **61**, 632-640.
- Cao DY, Ji Y, Tang B & Traub RJ. (2012). Estrogen receptor beta activation is antinociceptive in a model of visceral pain in the rat. *J Pain* **13**, 685-694.
- Cassidy A, Albertazzi P, Lise Nielsen I, Hall W, Williamson G, Tetens I, Atkins S, Cross H, Manios Y, Wolk A, Steiner C & Branca F. (2006). Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. *Proc Nutr Soc* **65**, 76-92.

- Castagliuolo I, Lamont JT, Qiu B, Fleming SM, Bhaskar KR, Nikulasson ST, Kornetsky C & Pothoulakis C. (1996). Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *Am J Physiol* **271**, G884-892.
- Cattaruzza F, Lyo V, Jones E, Pham D, Hawkins J, Kirkwood K, Valdez-Morales E, Ibeakanma C, Vanner SJ, Bogyo M & Bunnett NW. (2011). Cathepsin S is activated during colitis and causes visceral hyperalgesia by a PAR2-dependent mechanism in mice. *Gastroenterology* **141**, 1864-1874 e1861-1863.
- Cederroth CR & Nef S. (2009). Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol* **304**, 30-42.
- Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E & Vergnolle N. (2007). Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* **117**, 636-647.
- Cenac N, Chin AC, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, Ferrier L, Vergnolle N, Buret AG, Fioramonti J & Bueno L. (2004). PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Physiol* **558**, 913-925.
- Cenac N, Coelho AM, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Bunnett NW, Garcia-Villar R, Bueno L & Vergnolle N. (2002). Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am J Pathol* **161**, 1903-1915.
- Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, Bunnett NW, Coelho AM, Fioramonti J & Bueno L. (2003). Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol* **170**, 4296-4300.
- Ceponis PJ, Botelho F, Richards CD & McKay DM. (2000). Interleukins 4 and 13 increase intestinal epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement. *J Biol Chem* **275**, 29132-29137.
- Cervero F. (1988). Visceral pain. In: *Proceedings of the Vth world congress on pain Dubner R, Gebhart GF, Bond MR, eds Amsterdam: Elsevier*, 216-226.
- Cervero F. (1991). Mechanisms of acute visceral pain. *Br Med Bull* **47**, 549-560.
- Cervero F & Janig W. (1992). Visceral nociceptors: a new world order? *Trends Neurosci* **15**, 374-378.
- Chadwick VS, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A & Wilson I. (2002). Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **122**, 1778-1783.

- Chang L, Sundaresh S, Elliott J, Anton PA, Baldi P, Licudine A, Mayer M, Vuong T, Hirano M, Naliboff BD, Ameen VZ & Mayer EA. (2009). Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 149-159.
- Chaouch A, Menetrey D, Binder D & Besson JM. (1983). Neurons at the origin of the medial component of the bulbopontine spinoreticular tract in the rat: an anatomical study using horseradish peroxidase retrograde transport. *J Comp Neurol* **214**, 309-320.
- Chayvialle JA, Miyata M, Rayford PL & Thompson JC. (1980). Immunoreactive somatostatin and vasoactive intestinal peptide in the digestive tract of cats. *Gastroenterology* **79**, 837-843.
- Chen YW, Huang SC, Lin-Shiau SY & Lin JK. (2005). Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* **26**, 1296-1306.
- Chery-Croze S, Bosshard A, Martin H, Cuber JC, Charnay Y & Chayvialle JA. (1988). Peptide immunocytochemistry in afferent neurons from lower gut in rats. *Peptides* **9**, 873-881.
- Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T & Sawada N. (2008). Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 588-600.
- Coelho AM, Vergnolle N, Guiard B, Fioramonti J & Bueno L. (2002). Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology* **122**, 1035-1047.
- Cooke A. (2006). Th17 cells in inflammatory conditions. *Rev Diabet Stud* **3**, 72-75.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS & Breedlove SM. (1998). Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* **19**, 323-362.
- Coomes JL & Powrie F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* **8**, 435-446.
- Coplan JD, Andrews MW, Rosenblum LA, Owens MJ, Friedman S, Gorman JM & Nemeroff CB. (1996). Persistent elevations of cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing factor in adult nonhuman primates exposed to early-life stressors: implications for the pathophysiology of mood and anxiety disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1619-1623.
- COT. (2003). Phytoestrogens and health. *Food Standards Agency*.
- Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, Miller JC, Zhou H, Bayati AI, McRoberts JA & Mayer EA. (2002). Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G307-316.

- Coward L, Smith M, Kirk M & Barnes S. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr* **68**, 1486S-1491S.
- Creed F. (1999). The relationship between psychosocial parameters and outcome in irritable bowel syndrome. *Am J Med* **107**, 74S-80S.
- Crosnier C, Stamatakis D & Lewis J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* **7**, 349-359.
- Curran EM, Berghaus LJ, Verneti NJ, Saporita AJ, Lubahn DB & Estes DM. (2001). Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor-alpha-mediated pathway. *Cell Immunol* **214**, 12-20.
- Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS & Albina JE. (2010). The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol* **87**, 59-67.
- Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA & Lowik CW. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem* **278**, 962-967.
- Demaude J, Leveque M, Chaumaz G, Eutamene H, Fioramonti J, Bueno L & Ferrier L. (2009). Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: involvement of pancreatic trypsin. *Life Sci* **84**, 847-852.
- Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, Scully P, O'Brien S, O'Mahony L, O'Mahony S, Shanahan F & Keeling PW. (2006). Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* **130**, 304-311.
- DiSilvestro RA, Goodman J, Dy E & Lavalley G. (2005). Soy isoflavone supplementation elevates erythrocyte superoxide dismutase, but not plasma ceruloplasmin in postmenopausal breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Treat* **89**, 251-255.
- Dittmann K, Toulany M, Classen J, Heinrich V, Milas L & Rodemann HP. (2005). Selective radioprotection of normal tissues by Bowman-birk proteinase inhibitor (BBI) in mice. *Strahlenther Onkol* **181**, 191-196.
- Donovan SM, Andres A, Mathai RA, Kuhlenschmidt TB & Kuhlenschmidt MS. (2009). Soy formula and isoflavones and the developing intestine. *Nutr Rev* **67 Suppl 2**, S192-200.
- Drasar BS. (1974). Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **3**, 187-196.
- Drasar BS & Barrow P. (1985). Intestinal microecology. *Van Nostrand reinhold, Workingham*.

- Drewes AM, Frokjaer JB, Larsen E, Reddy H, Arendt-Nielsen L & Gregersen H. (2006). Pain and mechanical properties of the rectum in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 294-303.
- Drossman DA, Camilleri M, Mayer EA & Whitehead WE. (2002). AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **123**, 2108-2131.
- Drossman DA, Leserman J & Hu JB. (1996a). Gastrointestinal diagnosis, abuse history, and effects on health status. *Gastroenterology* **111**, 1159-1161.
- Drossman DA, Li Z, Leserman J, Toomey TC & Hu YJ. (1996b). Health status by gastrointestinal diagnosis and abuse history. *Gastroenterology* **110**, 999-1007.
- Drummond AE, Britt KL, Dyson M, Jones ME, Kerr JB, O'Donnell L, Simpson ER & Findlay JK. (2002). Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* **191**, 27-33.
- Dunlop SP, Hebden J, Campbell E, Naesdal J, Olbe L, Perkins AC & Spiller RC. (2006). Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am J Gastroenterol* **101**, 1288-1294.
- Dunlop SP, Jenkins D & Spiller RC. (2003). Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* **98**, 1578-1583.
- Edwards DP. (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* **67**, 335-376.
- Eijkelkamp N, Heijnen CJ, Elsenbruch S, Holtmann G, Schedlowski M & Kavelaars A. (2009). G protein-coupled receptor kinase 6 controls post-inflammatory visceral hyperalgesia. *Brain Behav Immun* **23**, 18-26.
- Eutamene H, Theodorou V, Fioramonti J & Bueno L. (2003). Acute stress modulates the histamine content of mast cells in the gastrointestinal tract through interleukin-1 and corticotropin-releasing factor release in rats. *J Physiol* **553**, 959-966.
- Fanning AS, Mitic LL & Anderson JM. (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1337-1345.
- Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, Desreumaux P, Janin A, Emilie D, Colombel JF, Garcia-Villar R, Fioramonti J & Bueno L. (2003). Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* **125**, 795-804.
- Fillingim RB. (2000). Sex, gender, and pain: women and men really are different. *Curr Rev Pain* **4**, 24-30.
- Fitzpatrick M. (2000). Soy formulas and the effects of isoflavones on the thyroid. *N Z Med J* **113**, 24-26.

- Fleeton M, Contractor N, Leon F, He J, Wetzel D, Dermody T, Iwasaki A & Kelsall B. (2004). Involvement of dendritic cell subsets in the induction of oral tolerance and immunity. *Ann N Y Acad Sci* **1029**, 60-65.
- Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O & Rice LW. (2000). Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* **60**, 245-248.
- Frank L & Meyskens JR. (2001). Development of Bowman-Birk Inhibitor for chemoprevention of oral head and neck cancer. *Ann N Y Acad Sci* **952**, 116-123.
- Friedman M, Brandon DL, Bates AH & Hymowitz T. (1991). Comparison of a commercial soybean cultivar and an isolate lacking the Kunitz trypsin inhibitor: composition, nutritional value, and effects of heating. *J Agric Food Chem* **39**, 327-335.
- Galli SJ, Grimbaldston M & Tsai M. (2008). Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 478-486.
- Gareau MG, Jury J & Perdue MH. (2007). Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G198-203.
- Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermuller N, Otto HF & Autschbach F. (2001). Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G216-228.
- Gaynes BN & Drossman DA. (1999). The role of psychosocial factors in irritable bowel syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* **13**, 437-452.
- Gebhart GF. (1996). Visceral polymodal receptors. *Prog Brain Res* **113**, 101-112.
- Gebhart GF. (1999). Peripheral contributions to visceral hyperalgesia. *Can J Gastroenterol* **13 Suppl A**, 37A-41A.
- Gecse K, Roka R, Ferrier L, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, Ait-Belgnaoui A, Rosztoczy A, Izbeki F, Fioramonti J, Wittmann T & Bueno L. (2008). Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* **57**, 591-599.
- Gelbmann CM, Mestermann S, Gross V, Kollinger M, Scholmerich J & Falk W. (1999). Strictures in Crohn's disease are characterised by an accumulation of mast cells colocalised with laminin but not with fibronectin or vitronectin. *Gut* **45**, 210-217.
- Giamberardino MA, Affaitati G, Valente R, Iezzi S & Vecchiet L. (1997). Changes in visceral pain reactivity as a function of estrous cycle in female rats with artificial ureteral calculosis. *Brain Res* **774**, 234-238.
- Giampietro PG, Bruno G, Furcolo G, Casati A, Brunetti E, Spadoni GL & Galli E. (2004). Soy protein formulas in children: no hormonal effects in long-term feeding. *J Pediatr Endocrinol Metab* **17**, 191-196.

- Giesler GJ, Jr., Menetrey D & Basbaum AI. (1979). Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat. *J Comp Neurol* **184**, 107-126.
- Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hatscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B & Klein C. (2009). Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* **361**, 2033-2045.
- Gonzalez-Mariscal L, Tapia R & Chamorro D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 729-756.
- Gordon S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**, 927-930.
- Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23-35.
- Gorodeski GI. (2001). Estrogen biphasic regulation of paracellular permeability of cultured human vaginal-cervical epithelia. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 4233-4243.
- Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS, Moussai D & Diamond B. (2002). Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest* **109**, 1625-1633.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C & Huber JC. (2002). Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* **346**, 340-352.
- Guarner F & Malagelada JR. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**, 512-519.
- Gue M, Del Rio-Lacheze C, Eutamene H, Theodorou V, Fioramonti J & Bueno L. (1997). Stress-induced visceral hypersensitivity to rectal distension in rats: role of CRF and mast cells. *Neurogastroenterol Motil* **9**, 271-279.
- Harnish DC, Albert LM, Leathurby Y, Eckert AM, Ciarletta A, Kasaian M & Keith JC, Jr. (2004). Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G118-125.
- Heaton KW, Radvan J, Cripps H, Mountford RA, Braddon FE & Hughes AO. (1992). Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: a prospective study. *Gut* **33**, 818-824.
- Heim C, Ehler U & Hellhammer DH. (2000). The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology* **25**, 1-35.
- Heitkemper M, Jarrett M, Cain K, Shaver J, Bond E, Woods NF & Walker E. (1996). Increased urine catecholamines and cortisol in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* **91**, 906-913.

- Heitkemper MM, Cain KC, Jarrett ME, Burr RL, Hertig V & Bond EF. (2003). Symptoms across the menstrual cycle in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* **98**, 420-430.
- Heitkemper MM & Chang L. (2009). Do fluctuations in ovarian hormones affect gastrointestinal symptoms in women with irritable bowel syndrome? *Gend Med* **6 Suppl 2**, 152-167.
- Heitkemper MM & Jarrett M. (1992). Pattern of gastrointestinal and somatic symptoms across the menstrual cycle. *Gastroenterology* **102**, 505-513.
- Heitkemper MM, Jarrett M, Caudell KA & Bond E. (1993). Women with gastrointestinal symptoms: implications for nursing research and practice. *Gastroenterol Nurs* **15**, 226-232.
- Hering NA, Fromm M & Schulzke JD. (2012). Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol* **590**, 1035-1044.
- Herschbach P, Henrich G & von Rad M. (1999). Psychological factors in functional gastrointestinal disorders: characteristics of the disorder or of the illness behavior? *Psychosom Med* **61**, 148-153.
- Hinds JP, Stoney B & Wald A. (1989). Does gender or the menstrual cycle affect colonic transit? *Am J Gastroenterol* **84**, 123-126.
- Hobbs SF, Chandler MJ, Bolser DC & Foreman RD. (1992). Segmental organization of visceral and somatic input onto C3-T6 spinothalamic tract cells of the monkey. *J Neurophysiol* **68**, 1575-1588.
- Holdcroft A, Sapsed-Byrne S, Ma D, Hammal D & Forsling ML. (2000). Sex and oestrous cycle differences in visceromotor responses and vasopressin release in response to colonic distension in male and female rats anaesthetized with halothane. *Br J Anaesth* **85**, 907-910.
- Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T & Rotter JJ. (1986). Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* **105**, 883-885.
- Holzappel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U & Huis in't Veld JH. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* **41**, 85-101.
- Holzer P & Holzer-Petsche U. (1997). Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther* **73**, 173-217.
- Homma H, Hoy E, Xu DZ, Lu Q, Feinman R & Deitch EA. (2005). The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G466-472.

- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG & Gordon JI. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**, 881-884.
- Houdeau E, Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Waget A, Leng L, Bueno L, Bucala R & Fioramonti J. (2007). Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology* **132**, 982-993.
- Houghton LA, Lea R, Jackson N & Whorwell PJ. (2002). The menstrual cycle affects rectal sensitivity in patients with irritable bowel syndrome but not healthy volunteers. *Gut* **50**, 471-474.
- Hubert J, Berger M & Dayde J. (2005). Use of a simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination: study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *J Agric Food Chem* **53**, 3923-3930.
- Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F & Daydé J. (2008). Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem* **109**, 709-721.
- Hutchins AM, Slavin JL & Lampe JW. (1995). Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J Am Diet Assoc* **95**, 545-551.
- Hyun E, Andrade-Gordon P, Steinhoff M & Vergnolle N. (2008). Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* **57**, 1222-1229.
- Improta G, Carpino F, Petrozza V, Guglietta A, Tabacco A & Broccardo M. (2003). Central effects of selective NK1 and NK3 tachykinin receptor agonists on two models of experimentally-induced colitis in rats. *Peptides* **24**, 903-911.
- Ivanov AI, Nusrat A & Parkos CA. (2004). Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Biol Cell* **15**, 176-188.
- Iwasaki A & Medzhitov R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987-995.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y & Kikuchi M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* **130**, 1695-1699.
- Jackson NA, Houghton LA, Whorwell PJ & Curren B. (1994). Does the menstrual cycle affect anorectal physiology? *Dig Dis Sci* **39**, 2607-2611.
- Jacobs MN, Dickins M & Lewis DF. (2003). Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptorbeta (hERbeta), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor alpha (hERalpha) crystal structure, and

- the human peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) ligand binding domain from the human PPARgamma crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**, 117-132.
- Janeway CA, Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**, 1-13.
- Jaulent AM & Leatherbarrow RJ. (2004). Design, synthesis and analysis of novel bicyclic and bifunctional protease inhibitors. *Protein Eng Des Sel* **17**, 681-687.
- Jensen PE. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* **8**, 1041-1048.
- Ji Y, Murphy AZ & Traub RJ. (2003). Estrogen modulates the visceromotor reflex and responses of spinal dorsal horn neurons to colorectal stimulation in the rat. *J Neurosci* **23**, 3908-3915.
- Ji Y, Tang B & Traub RJ. (2005). Modulatory effects of estrogen and progesterone on colorectal hyperalgesia in the rat. *Pain* **117**, 433-442.
- Ji Y, Tang B & Traub RJ. (2008). The visceromotor response to colorectal distention fluctuates with the estrous cycle in rats. *Neuroscience* **154**, 1562-1567.
- Kalin MF & Zumoff B. (1990). Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* **55**, 330-352.
- Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM & Coffman RL. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* **13**, 552-559.
- Kapsenberg ML. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* **3**, 984-993.
- Kawano N, Koji T, Hishikawa Y, Murase K, Murata I & Kohno S. (2004). Identification and localization of estrogen receptor alpha- and beta-positive cells in adult male and female mouse intestine at various estrogen levels. *Histochem Cell Biol* **121**, 399-405.
- Keita AV & Soderholm JD. (2010). The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 718-733.
- Kennedy AR. (1998). Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol Ther* **78**, 167-209.
- Kennedy AR, Billings PC, Wan XS & Newberne PM. (2002). Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* **43**, 174-186.
- Kennedy AR & Wan XS. (2002). Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *Prostate* **50**, 125-133.

- Kevetter GA & Willis WD. (1982). Spinothalamic cells in the rat lumbar cord with collaterals to the medullary reticular formation. *Brain Res* **238**, 181-185.
- Kidd P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**, 223-246.
- Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, Berin MC, Taminiou JA, Groot JA & Perdue MH. (1998). Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol* **275**, G1037-1044.
- Kim J. (2008). Protective effects of Asian dietary items on cancers - soy and ginseng. *Asian Pac J Cancer Prev* **9**, 543-548.
- Kim JA, Choi SC, Yun KJ, Kim DK, Han MK, Seo GS, Yeom JJ, Kim TH, Nah YH & Lee YM. (2003). Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **9**, 224-229.
- Kirschbaum C, Kudielka BM, Gaab J, Schommer NC & Hellhammer DH. (1999). Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychosom Med* **61**, 154-162.
- Kirschbaum C, Pirke KM & Hellhammer DH. (1993). The 'Trier Social Stress Test'--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology* **28**, 76-81.
- Klein SL. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev* **24**, 627-638.
- Knight DC & Eden JA. (1996). A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol* **87**, 897-904.
- Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Inagaki K, Kondo T, Kurita N, Suzuki M, Kanayama N & Terao T. (2005). Dietary supplementation of soybean kunitz trypsin inhibitor reduces lipopolysaccharide-induced lethality in mouse model. *Shock* **23**, 441-447.
- Koepke J, Ermler U, Warkentin E, Wenzl G & Flecker P. (2000). Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. *J Mol Biol* **298**, 477-491.
- Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vantoros G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G & Papavassiliou AG. (2003). Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* **39**, 1251-1258.
- Kraehenbuhl JP & Neutra MR. (1992). Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* **72**, 853-879.

- Kudielka BM, Hellhammer J, Hellhammer DH, Wolf OT, Pirke KM, Varadi E, Pilz J & Kirschbaum C. (1998). Sex differences in endocrine and psychological responses to psychosocial stress in healthy elderly subjects and the impact of a 2-week dehydroepiandrosterone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 1756-1761.
- Kudielka BM & Kirschbaum C. (2005). Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol* **69**, 113-132.
- Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnotolo D, Uchida T, Kitamura K & Okubo K. (1991). Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* L. Merrill). *Agric Biol Chem* **55**, 2227-2233.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S & Gustafsson JA. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863-870.
- Kuiper GG & Gustafsson JA. (1997). The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* **410**, 87-90.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B & Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252-4263.
- Kuo DC, Nadelhaft I, Hisamitsu T & de Groat WC. (1983). Segmental distribution and central projections of renal afferent fibers in the cat studied by transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* **216**, 162-174.
- Ladd CO, Huot RL, Thiruvikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ & Plotsky PM. (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* **122**, 81-103.
- Larauche M, Bradesi S, Million M, McLean P, Tache Y, Mayer EA & McRoberts JA. (2008). Corticotropin-releasing factor type 1 receptors mediate the visceral hyperalgesia induced by repeated psychological stress in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G1033-1040.
- Larionova NI, Vartanov SS, Sorokina NV, Gladysheva IP & Varfolomeyev SD. (1997). Conjugation of the Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor with hydroxyethylstarch. *Appl Biochem Biotechnol* **62**, 175-182.
- Laukoetter MG, Nava P & Nusrat A. (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14**, 401-407.
- Lerebours E, Gower-Rousseau C, Merle V, Brazier F, Debeugny S, Marti R, Salomez JL, Hellot MF, Dupas JL, Colombel JF, Cortot A & Benichou J. (2007). Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study. *Am J Gastroenterol* **102**, 122-131.

- Leske KL, Jevne CJ & Coon CN. (1993). Effect of oligosaccharide additions on nitrogen-corrected true metabolizable energy of soy protein concentrate. *Poult Sci* **72**, 664-668.
- Levine JD, Fields HL & Basbaum AI. (1993). Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosci* **13**, 2273-2286.
- Li L, Fan X, Warner M, Xu XJ, Gustafsson JA & Wiesenfeld-Hallin Z. (2009). Ablation of estrogen receptor alpha or beta eliminates sex differences in mechanical pain threshold in normal and inflamed mice. *Pain* **143**, 37-40.
- Lichtenstein GR, Deren JJ, Katz S, Lewis JD, Kennedy AR & Ware JH. (2008). Bowman-Birk inhibitor concentrate: a novel therapeutic agent for patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* **53**, 175-180.
- Lin RY, Schwartz LB, Curry A, Pesola GR, Knight RJ, Lee HS, Bakalchuk L, Tenenbaum C & Westfal RE. (2000). Histamine and tryptase levels in patients with acute allergic reactions: An emergency department-based study. *J Allergy Clin Immunol* **106**, 65-71.
- Liu D, Homan LL & Dillon JS. (2004). Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology* **145**, 5532-5539.
- Liu XX, Li SH, Chen JZ, Sun K, Wang XJ, Wang XG & Hui RT. (2011). Effect of soy isoflavones on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.
- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F & Spiller RC. (2006). Functional bowel disorders. *Gastroenterology* **130**, 1480-1491.
- Looijer-van Langen M, Hotte N, Dieleman LA, Albert E, Mulder C & Madsen KL. (2011). Estrogen receptor-beta signaling modulates epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**, G621-626.
- Lovell RM & Ford AC. (2012). Effect of gender on prevalence of irritable bowel syndrome in the community: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **107**, 991-1000.
- Lu CL, Hsieh JC, Tsaur ML, Huang YH, Wang PS, Wu LL, Liu PY, Chang FY & Lee SD. (2007). Estrogen rapidly modulates mustard oil-induced visceral hypersensitivity in conscious female rats: A role of CREB phosphorylation in spinal dorsal horn neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G438-446.
- Ma TY, Boivin MA, Ye D, Pedram A & Said HM. (2005). Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G422-430.

- Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD & Fedorak RN. (1999). Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* **5**, 262-270.
- Makita H, Nishimura M, Miyamoto K, Nakano T, Tanino Y, Hirokawa J, Nishihira J & Kawakami Y. (1998). Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation. *Am J Respir Crit Care Med* **158**, 573-579.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A & Locati M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677-686.
- Marceau F & Regoli D. (2008). Therapeutic options in inflammatory bowel disease: experimental evidence of a beneficial effect of kinin B1 receptor blockade. *Br J Pharmacol* **154**, 1163-1165.
- Marshall JK, Thabane M, Garg AX, Clark W, Meddings J & Collins SM. (2004). Intestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome after a waterborne outbreak of acute gastroenteritis in Walkerton, Ontario. *Aliment Pharmacol Ther* **20**, 1317-1322.
- Masilamani M, Wei J & Sampson HA. (2012). Regulation of the immune response by soybean isoflavones. *Immunol Res*.
- Matsuo M. (2004). Low-salt O-miso produced from Koji fermentation of oncom improves redox state and cholesterolemia in rats more than low-salt soybean-miso. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **50**, 362-366.
- Matthews J & Gustafsson JA. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* **3**, 281-292.
- Maunder RG & Levenstein S. (2008). The role of stress in the development and clinical course of inflammatory bowel disease: epidemiological evidence. *Curr Mol Med* **8**, 247-252.
- May GR, Sutherland LR & Meddings JB. (1993). Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* **104**, 1627-1632.
- Mayer EA & Collins SM. (2002). Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* **122**, 2032-2048.
- Mayer EA, Naliboff BD, Chang L & Coutinho SV. (2001). V. Stress and irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G519-524.
- McEwen BS & Stellar E. (1993). Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* **153**, 2093-2101.

- Meddings JB & Swain MG. (2000). Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* **119**, 1019-1028.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P & Janeway CA, Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397.
- Mertz HR. (2003). Irritable bowel syndrome. *N Engl J Med* **349**, 2136-2146.
- Messina M, Gardner C & Barnes S. (2002). Gaining insight into the health effects of soy but a long way still to go: commentary on the fourth International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease. *J Nutr* **132**, 547S-551S.
- Messina MJ. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* **70**, 439S-450S.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KD & Barnes S. (1994). Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* **21**, 113-131.
- Miksicek RJ. (1995). Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med* **208**, 44-50.
- Molander C, Ygge J & Dalsgaard CJ. (1987). Substance P-, somatostatin- and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity and fluoride resistant acid phosphatase-activity in relation to retrogradely labeled cutaneous, muscular and visceral primary sensory neurons in the rat. *Neurosci Lett* **74**, 37-42.
- Monconduit L, Desbois C & Villanueva L. (2002). The integrative role of the rat medullary subnucleus reticularis dorsalis in nociception. *Eur J Neurosci* **16**, 937-944.
- Monnikes H, Tebbe JJ, Hildebrandt M, Arck P, Osmanoglou E, Rose M, Klapp B, Wiedenmann B & Heymann-Monnikes I. (2001). Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig Dis* **19**, 201-211.
- Morimoto M, Watanabe T, Yamori M, Takebe M & Wakatsuki Y. (2009). Isoflavones regulate innate immunity and inhibit experimental colitis. *J Gastroenterol Hepatol*.
- Morishita M & Peppas NA. (2006). Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? *Drug Discov Today* **11**, 905-910.
- Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M & Masamune Y. (2001). Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull* **24**, 351-356.
- Morris CA, Morris LD, Kennedy AR & Sweeney HL. (2005). Attenuation of skeletal muscle atrophy via protease inhibition. *J Appl Physiol* **99**, 1719-1727.

- Morteau O, Hachet T, Caussette M & Bueno L. (1994). Experimental colitis alters visceromotor response to colorectal distension in awake rats. *Dig Dis Sci* **39**, 1239-1248.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA & Coffman RL. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-2357.
- Moussa L, Bezirard V, Salvador-Cartier C, Bacquie V, Houdeau E & Theodorou V. (2012). A new soy germ fermented ingredient displays estrogenic and protease inhibitor activities able to prevent irritable bowel syndrome-like symptoms in stressed female rats. *Clin Nutr*.
- Mulderry PK, Ghatei MA, Bishop AE, Allen YS, Polak JM & Bloom SR. (1985). Distribution and chromatographic characterisation of CGRP-like immunoreactivity in the brain and gut of the rat. *Regul Pept* **12**, 133-143.
- Mullick AE, Walsh BA, Reiser KM & Rutledge JC. (2001). Chronic estradiol treatment attenuates stiffening, glycooxidation, and permeability in rat carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H2204-2210.
- Munck A, Guyre PM & Holbrook NJ. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* **5**, 25-44.
- Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N & Onji M. (2002). Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* **128**, 504-510.
- Murakami M, Ohta T & Ito S. (2008). Interleukin-1beta enhances the action of bradykinin in rat myenteric neurons through up-regulation of glial B1 receptor expression. *Neuroscience* **151**, 222-231.
- Ness TJ & Gebhart GF. (1990). Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain* **41**, 167-234.
- Nicaise P, Gleizes A, Forestier F, Quero AM & Labarre C. (1993). Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF-alpha) production by mouse peritoneal macrophages. *Eur Cytokine Netw* **4**, 133-138.
- Nicaise P, Gleizes A, Sandre C, Kergot R, Lebrec H, Forestier F & Labarre C. (1999). The intestinal microflora regulates cytokine production positively in spleen-derived macrophages but negatively in bone marrow-derived macrophages. *Eur Cytokine Netw* **10**, 365-372.
- Nieuwenhuijs VB, Verheem A, van Duijvenbode-Beumer H, Visser MR, Verhoef J, Gooszen HG & Akkermans LM. (1998). The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg* **228**, 188-193.

- Nilsson S & Gustafsson JA. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res* **2**, 360-366.
- Nozu T & Kudaira M. (2006). Corticotropin-releasing factor induces rectal hypersensitivity after repetitive painful rectal distention in healthy humans. *J Gastroenterol* **41**, 740-744.
- Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C & Sundelin J. (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9208-9212.
- O'Brien MD & Phillips SF. (1996). Colonic motility in health and disease. *Gastroenterol Clin North Am* **25**, 147-162.
- O'Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A & O'Morain CA. (2000). Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* **12**, 449-457.
- Odani S & Ikenaka T. (1973). Scission of soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor into two small fragments having either trypsin or chymotrypsin inhibitory activity. *J Biochem* **74**, 857-860.
- Ohkawara T, Miyashita K, Nishihira J, Mitsuyama K, Takeda H, Kato M, Kondo N, Yamasaki Y, Sata M, Yoshiki T, Sugiyama T & Asaka M. (2005). Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis. *Clin Exp Immunol* **140**, 241-248.
- Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, Sugiyama T, Iwanaga T, Nakamura H, Mizue Y & Asaka M. (2002). Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* **123**, 256-270.
- Okoro NI & Kane SV. (2009). Gender-related issues in the female inflammatory bowel disease patient. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **3**, 145-154.
- Oshima T, Laroux FS, Coe LL, Morise Z, Kawachi S, Bauer P, Grisham MB, Specian RD, Carter P, Jennings S, Granger DN, Joh T & Alexander JS. (2001). Interferon-gamma and interleukin-10 reciprocally regulate endothelial junction integrity and barrier function. *Microvasc Res* **61**, 130-143.
- Oshima T, Miwa H & Joh T. (2008). Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* **23 Suppl 2**, S146-150.
- Otte C, Hart S, Neylan TC, Marmar CR, Yaffe K & Mohr DC. (2005). A meta-analysis of cortisol response to challenge in human aging: importance of gender. *Psychoneuroendocrinology* **30**, 80-91.
- Papka RE, Storey-Workley M, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Collins JJ, Usip S, Saunders PT & Shupnik M. (2001). Estrogen receptor-alpha and beta- immunoreactivity and

- mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. *Cell Tissue Res* **304**, 193-214.
- Pardo A, Bartoli R, Lorenzo-Zuniga V, Planas R, Vinado B, Riba J, Cabre E, Santos J, Luque T, Ausina V & Gassull MA. (2000). Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* **31**, 858-863.
- Park E, Shin JI, Park OJ & Kang MH. (2005a). Soy isoflavone supplementation alleviates oxidative stress and improves systolic blood pressure in male spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **51**, 254-259.
- Park JH, Jeong HJ & de Lumen BO. (2005b). Contents and bioactivities of lunasin, Bowman-Birk inhibitor, and isoflavones in soybean seed. *J Agric Food Chem* **53**, 7686-7690.
- Paul G, Khare V & Gasche C. (2012). Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *Eur J Clin Invest* **42**, 95-109.
- Pechanova O & Simko F. (2007). The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiol Res* **56 Suppl 2**, S7-S16.
- Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghos Y, Verbeke G, Baert F, Vermeire S, Vlietinck R & Rutgeerts P. (1997). Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* **113**, 802-807.
- Peeters M, Ghos Y, Maes B, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G & Rutgeerts P. (1994). Increased permeability of macroscopically normal small bowel in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **39**, 2170-2176.
- Peschanski M & Besson JM. (1984). A spino-reticulo-thalamic pathway in the rat: an anatomical study with reference to pain transmission. *Neuroscience* **12**, 165-178.
- Petri Nahas E, Nahas Neto J, De Luca L, Traiman P, Pontes A & Dalben I. (2004). Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy. *Maturitas* **48**, 372-380.
- Pfitscher A, Reiter E & Jungbauer A. (2008). Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* **112**, 87-94.
- Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ & Elloso MM. (2005). Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* **97**, 107-113.
- Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, Cremon C, Stanghellini V, De Giorgio R, Galmiche JP & Neunlist M. (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* **58**, 196-201.

- Piche T & Dainese R. (2010). Syndrome de l'intestin irritable: une maladie inflammatoire? *cahiers de nutrition et de diététique*, 30-35.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B & Beutler B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.
- Porcelli P. (2004). Psychological abnormalities in patients with irritable bowel syndrome. *Indian J Gastroenterol* **23**, 63-69.
- Posserud I, Agerforz P, Ekman R, Bjornsson ES, Abrahamsson H & Simren M. (2004). Altered visceral perceptual and neuroendocrine response in patients with irritable bowel syndrome during mental stress. *Gut* **53**, 1102-1108.
- Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT & Collins JE. (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest* **85**, 1139-1162.
- Price KR & Fenwick GR. (1985). Naturally occurring oestrogens in foods--a review. *Food Addit Contam* **2**, 73-106.
- Pulendran B. (2005). Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J Immunol* **174**, 2457-2465.
- Ragnarsson G, Hallbook O & Bodemar G. (1999). Abdominal symptoms are not related to anorectal function in the irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* **34**, 250-258.
- Raubaud P, Ducluzeau R, Dubos F, Hudault S, Bewa H & Muller MC. (1980). Implantation of bacteria from the digestive tract of man and various animals into gnotobiotic mice. *Am J Clin Nutr* **33**, 2440-2447.
- Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T & Rodriguez-Boulan E. (1996). Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol* **132**, 451-463.
- Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ & Gupta A. (2002). Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J* **368**, 471-481.
- Rasolohery CA, Berger M, Lygin AV, Lozovaya V, Nelson RL & Daydé J. (2008). Effect of temperature and water availability during late maturation of the soybean seed on germ and cotyledon isoflavone content and composition. *J Sci Food Agric* **88**, 218-228.
- Ringel Y, Drossman DA, Leserman JL, Suyenobu BY, Wilber K, Lin W, Whitehead WE, Naliboff BD, Berman S & Mayer EA. (2008). Effect of abuse history on pain reports and brain responses to aversive visceral stimulation: an FMRI study. *Gastroenterology* **134**, 396-404.

- Ritchie J. (1973). Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* **14**, 125-132.
- Roberfroid MB. (2000). A European consensus of scientific concepts of functional foods. *Nutrition* **16**, 689-691.
- Rodriguez-Pinto D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* **238**, 67-75.
- Rohleder N, Schommer NC, Hellhammer DH, Engel R & Kirschbaum C. (2001). Sex differences in glucocorticoid sensitivity of proinflammatory cytokine production after psychosocial stress. *Psychosom Med* **63**, 966-972.
- Roka R, Rosztoczy A, Leveque M, Izbeki F, Nagy F, Molnar T, Lonovics J, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Wittmann T & Bueno L. (2007). A pilot study of fecal serine-protease activity: a pathophysiologic factor in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**, 550-555.
- Romagnani S. (1991). Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res* **21**, 152-158.
- Romagnani S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* **18**, 263-266.
- Romond MB, Hamze M, Romond C & Bourlioux P. (1990). Host-Bifidobacterium interactions in the axenic mouse: partial characterization of bifidogenic factors in the intestinal contents. *Can J Microbiol* **36**, 286-291.
- Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP & Rice-Evans CA. (1997). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res* **26**, 63-70.
- Sagami Y, Shimada Y, Tayama J, Nomura T, Satake M, Endo Y, Shoji T, Karahashi K, Hongo M & Fukudo S. (2004). Effect of a corticotropin releasing hormone receptor antagonist on colonic sensory and motor function in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* **53**, 958-964.
- Sakai T, Furoku S, Nakamoto M, Shuto E, Hosaka T, Nishioka Y & Sone S. (2011). Soy isoflavone equol perpetuates dextran sulfate sodium-induced acute colitis in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**, 593-595.
- Salim SY & Soderholm JD. (2011). Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*.
- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M & Rowland I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* **80 Suppl 1**, S147-171.
- Santos J, Benjamin M, Yang PC, Prior T & Perdue MH. (2000). Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G847-854.

- Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, Yang PC, Yates D, Groot JA & Perdue MH. (1999). Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol* **277**, G391-399.
- Santos J, Yang PC, Soderholm JD, Benjamin M & Perdue MH. (2001). Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* **48**, 630-636.
- Satsu H, Hyun JS, Shin HS & Shimizu M. (2009). Suppressive effect of an isoflavone fraction on tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **55**, 442-446.
- Saunders PR, Kosecka U, McKay DM & Perdue MH. (1994). Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am J Physiol* **267**, G794-799.
- Saunders PR, Santos J, Hanssen NP, Yates D, Groot JA & Perdue MH. (2002). Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Dig Dis Sci* **47**, 208-215.
- Schryver T. (2002). Increasing health benefits using soy germ. *Cereal Food World* **47**, 185-188.
- Schultzberg M, Hokfelt T, Nilsson G, Terenius L, Rehfeld JF, Brown M, Elde R, Goldstein M & Said S. (1980). Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine beta-hydroxylase. *Neuroscience* **5**, 689-744.
- Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Harbuz MS & Lightman SL. (2004). Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J Neuroendocrinol* **16**, 989-998.
- Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T, Laudenschbach-Leschowski U, Degen GH & Diel P. (2008). In utero and postnatal exposure to a phytoestrogen-enriched diet increases parameters of acute inflammation in a rat model of TNBS-induced colitis. *Arch Toxicol* **82**, 941-950.
- Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T, Laudenschbach-Leschowski U & Diel P. (2009). Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis. *Eur J Nutr.*
- Setchell KD. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* **68**, 1333S-1346S.
- Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A & Heubi JE. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy

- humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* **131**, 1362S-1375S.
- Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS & Heubi JE. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* **76**, 447-453.
- Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J & Heubi JE. (1998). Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr* **68**, 1453S-1461S.
- Sheth P, Seth A, Atkinson KJ, Gheyi T, Kale G, Giorgianni F, Desiderio DM, Li C, Naren A & Rao R. (2007). Acetaldehyde dissociates the PTP1B-E-cadherin-beta-catenin complex in Caco-2 cell monolayers by a phosphorylation-dependent mechanism. *Biochem J* **402**, 291-300.
- Shih DQ & Targan SR. (2008). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14**, 390-400.
- Shroff KE, Meslin K & Cebra JJ. (1995). Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* **63**, 3904-3913.
- Simon GL & Gorbach SL. (1984). Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* **86**, 174-193.
- Simoncini T, Rabkin E & Liao JK. (2003). Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 198-203.
- Sloots CE, Felt-Bersma RJ, Cuesta MA & Meuwissen SG. (2000). Rectal visceral sensitivity in healthy volunteers: influences of gender, age and methods. *Neurogastroenterol Motil* **12**, 361-368.
- Soderholm JD, Streutker C, Yang PC, Paterson C, Singh PK, McKay DM, Sherman PM, Croitoru K & Perdue MH. (2004). Increased epithelial uptake of protein antigens in the ileum of Crohn's disease mediated by tumour necrosis factor alpha. *Gut* **53**, 1817-1824.
- Soderholm JD, Yang PC, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, Sherman PM & Perdue MH. (2002). Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* **123**, 1099-1108.
- Soffer EE, Kongara K, Achkar JP & Gannon J. (2000). Colonic motor function in humans is not affected by gender. *Dig Dis Sci* **45**, 1281-1284.
- Spahn TW & Kucharzik T. (2004). Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* **53**, 456-465.

- Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M & Neal KR. (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.
- Spooner MF, Robichaud P, Carrier JC & Marchand S. (2007). Endogenous pain modulation during the formalin test in estrogen receptor beta knockout mice. *Neuroscience* **150**, 675-680.
- Stadnicki A, Pastucha E, Nowaczyk G, Mazurek U, Plewka D, Machnik G, Wilczok T & Colman RW. (2005). Immunolocalization and expression of kinin B1R and B2R receptors in human inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G361-366.
- Stead RH & Bienenstock J. (1990). Cellular interactions between the immune and peripheral nervous systems : a normal role for mast cells ? . In: *Cell to cell interaction Burger MM, Sordat B, Zinkernagel RM, eds Karger, Basel*, 170-187.
- Stead RH, Dixon MF, Bramwell NH, Riddell RH & Bienenstock J. (1989). Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* **97**, 575-585.
- Stoney CM, Davis MC & Matthews KA. (1987). Sex differences in physiological responses to stress and in coronary heart disease: a causal link? *Psychophysiology* **24**, 127-131.
- Stoney CM, Owens JF, Matthews KA, Davis MC & Caggiula A. (1990). Influences of the normal menstrual cycle on physiologic functioning during behavioral stress. *Psychophysiology* **27**, 125-135.
- Strauch UG, Obermeier F, Grunwald N, Gurster S, Dunger N, Schultz M, Griese DP, Mahler M, Scholmerich J & Rath HC. (2005). Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. *Gut* **54**, 1546-1552.
- Su L, Shen L, Clayburgh DR, Nalle SC, Sullivan EA, Meddings JB, Abraham C & Turner JR. (2009). Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* **136**, 551-563.
- Suzuki S, Lund T, Price R & Handa R. (2001). Sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: novel roles for androgen and estrogen receptors. *Recent research developments in endocrinology Kerala, India: Transworld Research Network*, 69-86
- Suzuki T & Hara H. (2011). Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *J Nutr Biochem* **22**, 401-408.
- Szkutnik-Fiedler D, Jedrzejczyk M, Grzeskowiak E, Bartkowiak-Wieczorek J, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K & Mrozikiewicz PM. (2010). The role of phytoestrogen therapy in relieving postmenopausal symptoms. *Ginekol Pol* **81**, 929-934.

- Tache Y & Bonaz B. (2007). Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest* **117**, 33-40.
- Tache Y & Perdue MH. (2004). Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 137-142.
- Takahashi R, Ohmori R, Kiyose C, Momiyama Y, Ohsuzu F & Kondo K. (2005). Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem* **53**, 4578-4582.
- Targan SR & Karp LC. (2005). Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* **206**, 296-305.
- Tato CM & O'Shea JJ. (2006). Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature* **441**, 166-168.
- Tersman Z, Collins A & Eneroth P. (1991). Cardiovascular responses to psychological and physiological stressors during the menstrual cycle. *Psychosom Med* **53**, 185-197.
- This P, De La Rochefordiere A, Clough K, Fourquet A & Magdelenat H. (2001). Phytoestrogens after breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **8**, 129-134.
- Thomas ML, Xu X, Norfleet AM & Watson CS. (1993). The presence of functional estrogen receptors in intestinal epithelial cells. *Endocrinology* **132**, 426-430.
- Tiziani S & Vodovotz Y. (2005). Rheological characterization of a novel functional food: tomato juice with soy germ. *J Agric Food Chem* **53**, 7267-7273.
- Todaka E, Sakurai K, Fukata H, Miyagawa H, Uzuki M, Omori M, Osada H, Ikezuki Y, Tsutsumi O, Iguchi T & Mori C. (2005). Fetal exposure to phytoestrogens--the difference in phytoestrogen status between mother and fetus. *Environ Res* **99**, 195-203.
- Tsigos C & Chrousos GP. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* **53**, 865-871.
- Tsuchihashi R, Sakamoto S, Kodera M, Nohara T & Kinjo J. (2008). Microbial metabolism of soy isoflavones by human intestinal bacterial strains. *J Nat Med* **62**, 456-460.
- Tsukamoto C, Shimada S, Igita K, Kudou S, Kokubun M, Okubo K & Kitamura K. (1995). Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J Agric Food Chem* **43**, 1184-1192.
- Tsukita S & Furuse M. (2000). Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* **149**, 13-16.

- Turner JR. (2006). Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* **169**, 1901-1909.
- Turner JR. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 799-809.
- Umesaki Y & Setoyama H. (2000). Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect* **2**, 1343-1351.
- Ursino MG, Vasina V & De Ponti F. (2009). Protection from DNBS-induced colitis by the tachykinin NK(1) receptor antagonist SR140333 in rats. *Eur J Pharmacol* **603**, 133-137.
- Utech M, Ivanov AI, Samarina SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsny RJ, Parkos CA & Nusrat A. (2005). Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* **16**, 5040-5052.
- Vera R, Sanchez M, Galisteo M, Villar IC, Jimenez R, Zarzuelo A, Perez-Vizcaino F & Duarte J. (2007). Chronic administration of genistein improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: involvement of eNOS, caveolin and calmodulin expression and NADPH oxidase activity. *Clin Sci (Lond)* **112**, 183-191.
- Verdu EF, Deng Y, Bercik P & Collins SM. (2002). Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**, G27-36.
- Vergnolle N. (2003). The enteric nervous system in inflammation and pain: the role of proteinase-activated receptors. *Can J Gastroenterol* **17**, 589-592.
- Verhaak PF, Kerssens JJ, Dekker J, Sorbi MJ & Bensing JM. (1998). Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literature. *Pain* **77**, 231-239.
- Verma-Gandhu M, Verdu EF, Bercik P, Blennerhassett PA, Al-Mutawaly N, Ghia JE & Collins SM. (2007). Visceral pain perception is determined by the duration of colitis and associated neuropeptide expression in the mouse. *Gut* **56**, 358-364.
- Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A, Fantini M, Sturm A, Borroni E, Repici A, Locati M, Malesci A, Dejana E & Danese S. (2008). Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **135**, 173-184.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T & Ugolini S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* **9**, 503-510.
- Wada-Hiraike O, Warner M & Gustafsson JA. (2006). New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium. *Biochem Soc Trans* **34**, 1114-1116.

- Wan XS, Meyskens FL, Jr., Armstrong WB, Taylor TH & Kennedy AR. (1999). Relationship between protease activity and neu oncogene expression in patients with oral leukoplakia treated with the Bowman Birk Inhibitor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**, 601-608.
- Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT & Turner JR. (2005). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* **166**, 409-419.
- Wang H, Ehnert C, Brenner GJ & Woolf CJ. (2006). Bradykinin and peripheral sensitization. *Biol Chem* **387**, 11-14.
- Wang H & Murphy PA. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* **42**, 1666-1673.
- Ware JH, Wan XS & Kennedy AR. (1999). Bowman-Birk inhibitor suppresses production of superoxide anion radicals in differentiated HL-60 cells. *Nutr Cancer* **33**, 174-177.
- Weekes NY, Lewis RS, Goto SG, Garrison-Jakel J, Patel F & Lupien S. (2008). The effect of an environmental stressor on gender differences on the awakening cortisol response. *Psychoneuroendocrinology* **33**, 766-772.
- Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S & Wang Y. (1995). Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* **208**, 124-130.
- Weiser MJ & Handa RJ. (2009). Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience* **159**, 883-895.
- Weston AP, Biddle WL, Bhatia PS & Miner PB, Jr. (1993). Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* **38**, 1590-1595.
- Whitacre CC, Reingold SC & O'Looney PA. (1999). A gender gap in autoimmunity. *Science* **283**, 1277-1278.
- Whitten PL & Naftolin F. (1998). Reproductive actions of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **12**, 667-690.
- Wiseman H, Casey K, Bowey EA, Duffy R, Davies M, Rowland IR, Lloyd AS, Murray A, Thompson R & Clarke DB. (2004). Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *Am J Clin Nutr* **80**, 692-699.
- Wolf OT, Schommer NC, Hellhammer DH, McEwen BS & Kirschbaum C. (2001). The relationship between stress induced cortisol levels and memory differs between men and women. *Psychoneuroendocrinology* **26**, 711-720.

- Wolfe F, Ross K, Anderson J & Russell IJ. (1995). Aspects of fibromyalgia in the general population: sex, pain threshold, and fibromyalgia symptoms. *J Rheumatol* **22**, 151-156.
- Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T & Lochs H. (1993). Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* **341**, 1437-1439.
- Xie LH, Akao T, Hamasaki K, Deyama T & Hattori M. (2003). Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **51**, 508-515.
- Yang L, Hu Y & Hou Y. (2006). Effects of 17beta-estradiol on the maturation, nuclear factor kappa B p65 and functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Mol Immunol* **43**, 357-366.
- Ye L, Martin TA, Parr C, Harrison GM, Mansel RE & Jiang WG. (2003). Biphasic effects of 17-beta-estradiol on expression of occludin and transendothelial resistance and paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **196**, 362-369.
- Young EA, Altemus M, Parkison V & Shastry S. (2001). Effects of estrogen antagonists and agonists on the ACTH response to restraint stress in female rats. *Neuropsychopharmacology* **25**, 881-891.
- Zaizen Y, Higuchi Y, Matsuo N, Shirabe K, Tokuda H & Takeshita M. (2000). Antitumor effects of soybean hypocotyls and soybeans on the mammary tumor induction by N-methyl-n-nitrosourea in F344 rats. *Anticancer Res* **20**, 1439-1444.
- Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M & Schulzke JD. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* **56**, 61-72.
- Zhao C, Dahlman-Wright K & Gustafsson JA. (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* **6**, e003.
- Zheng Y, Hu J, Murphy PA, Alekel DL, Franke WD & Hendrich S. (2003). Rapid gut transit time and slow fecal isoflavone disappearance phenotype are associated with greater genistein bioavailability in women. *J Nutr* **133**, 3110-3116.
- Zhou Q, Zhang B & Verne GN. (2009). Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* **146**, 41-46.
- Zlotkin S. (2006). A critical assessment of the upper intake levels for infants and children. *J Nutr* **136**, 502S-506S.