



L'aluminium, facteur de risque environnemental impliqué dans la physiopathologie des maladies intestinales

Nicolas Esquerre

► To cite this version:

Nicolas Esquerre. L'aluminium, facteur de risque environnemental impliqué dans la physiopathologie des maladies intestinales. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. <NNT : 2016LIL2S008>. <tel-01396990>

HAL Id: tel-01396990

<https://theses.hal.science/tel-01396990v1>

Submitted on 15 Nov 2016

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

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



HAL Authorization

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE NORD DE FRANCE

Spécialité : Sciences biologiques

**L'aluminium, facteur de risque environnemental impliqué dans la
physiopathologie des maladies intestinales.**

Présentée et soutenue publiquement

Par Nicolas Esquerre

Le 20 Avril 2016

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur François-Jérôme Authier

Madame le Professeur Nathalie Vergnolle

Monsieur le Docteur Benoit Foligné

Madame le Docteur Cécile Vignal

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Co-Encadrante

U995 – LIRIC (Lille International Research of Inflammation Center)

Remerciements

C'est avec beaucoup d'émotions et de sincérité que je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont entouré durant la réalisation de ce projet.

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury de cette thèse pour le temps qu'ils y ont consacré. Merci au Professeur François-Jérôme Authier d'être rapporteur de ma thèse et merci pour ses questions constructives qui ont permis de faire évoluer le projet. Merci au Professeur Nathalie Vergnolle pour l'accueil reçu au sein de son équipe de recherche, sa disponibilité et ses conseils toujours précieux. Merci au Docteur Benoit Foligné pour l'intérêt porté à l'avancement de mon travail de thèse durant ces 3 années.

Je remercie le Professeur Pierre Desreumaux de m'avoir accueilli au sein de l'UMR 995, de m'avoir fait confiance depuis le Master afin de me permettre de réaliser cette thèse. Je le remercie également pour ses conseils qui ont été nombreux et importants et pour son implication grâce à laquelle nous avons pu aboutir aux résultats obtenus.

Un merci tout particulier à ma co-encadrante de thèse, le Docteur Cécile Vignal, ainsi qu'au Docteur Mathilde Body-Malapel, pour l'investissement et le soutien que vous m'avez apportés durant ces années parfois difficiles et surtout riches en émotion. Merci pour votre grande disponibilité, vos enseignements, vos corrections toujours justes et vos conseils qui ont permis de faire évoluer le projet au cours de ces années.

Merci au Docteur Corinne Gower-Rousseau d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse. Merci pour son regard critique sur le projet.

Merci au Docteur Thierry Jouault d'avoir suivi l'avancée des travaux et d'avoir apporté ses conseils dans les moments difficiles.

Un grand merci au Docteur Laurent Dubuquoy pour sa disponibilité, son accessibilité et ses précieux conseils. Ça a toujours été un plaisir de discuter avec lui.

Merci à la Fondation DigestScience et à Bernadette Lemaire d'avoir cru au projet et de l'avoir soutenu.

Je remercie vivement les membres du Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan pour leur accueil. Merci aux Docteur Gilles Dietrich et Frédérick Barreau pour leur disponibilité, leur aide, leur sympathie et leur bonne humeur communicative. Une mention particulière pour le Gersois, qui en plus de m'avoir appris beaucoup de choses, est devenu un véritable ami. Lilian, merci de m'avoir intégré aussi rapidement à ton groupe et d'avoir rendu les séjours sur Toulouse aussi agréables. Nos passages au V&B, au Bistronome et tes magrets de canard resteront gravés dans ma mémoire.

Je voudrais également remercier tous mes collègues et amis de l'UMR 995.

Merci Caroline de m'avoir formé. Merci pour ta disponibilité depuis le début de ce projet, pour ta bonne humeur lors des longues heures passées à l'animalerie, pour ta spontanéité, pour les fous rires et pour tes chants, certes pas toujours très justes, qui égayaient nos journées de travail. Merci Silvia pour ton aide toujours précieuse et merci pour ton calme imperturbable même dans mes moments d'énervement. Merci pour ton accent, qu'on aura, certes, toujours du mal à comprendre mais qui nous permet de voyager. Merci pour nos soirées un peu (souvent) trop longues, pour ton « borrrrdel » toujours plus impressionnant que le mien, pour tes horoscopes assez particuliers. J'espère qu'on continuera à se voir !

Merci Audrey d'avoir toujours été là, de m'avoir soutenu et d'avoir été notre 3^e colocataire de bureau aussi souvent. Merci de m'avoir permis de décompresser quand j'en avais vraiment besoin et surtout merci pour toutes ces soirées mémorables.

Merci Anthony d'avoir été aussi délirant et spontané. Je te souhaite une excellente fin de thèse et plein de bonheur dans ton nouveau rôle de papa.

Merci Emilie de ton accueil et merci de m'avoir intégré aussi rapidement quand je suis arrivé dans le labo. Nos années de voisinage ont été vraiment top ! Ça y est, le canard sauvage prend son envol ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Super Madjid, le peu de mots que je pourrais écrire ne refléteront jamais ma pensée. Alors merci pour tout ce que tu as fait pour moi depuis bientôt 5 ans. Merci de m'avoir appris autant de choses, merci de m'avoir supporté en colocataire de bureau pendant toutes ces années. Ça ne va pas être évident de retrouver un collègue comme toi (enfin j'espère trouver mieux) ! Après le départ de Fifounette, c'est à mon tour de te quitter. J'espère vraiment qu'on aura l'occasion

de se voir en dehors du labo (on est quand même presque voisin), même si c'est pour boire un chocolat chaud. Je te laisse aux mains expertes d'Anthony qui, j'en suis sûr, s'occupera bien de toi et appréciera tout autant que moi tes mots « doux ».

Pour terminer la partie travail, je tiens à remercier toutes les personnes de l'U995 que je n'ai pas citées précédemment. Et plus particulièrement Béa, François, Lucil, Mohamed, Laura, Solène, Arnaud et Marie.

J'en arrive au chapitre plus personnel. Je tiens tout d'abord à remercier mes amis « hors du labo » qui sont si chers à mes yeux. Merci à vous, votre amitié est tellement importante pour moi.

Merci à nos acolytes, Vincent et Laura d'avoir toujours été présents, merci pour votre écoute et vos conseils. Merci également d'avoir contribuer aux nombreux moments de détente qui étaient nécessaires afin de me changer les idées.

Merci à mes amis de toujours : Romain, Réré, Vincent S, Kirik, Gregouz et tous les autres membres de notre groupe de folie qui traverse les années sans prendre une ride. Merci à vous tous d'être toujours là dans les bons comme dans les mauvais moments. Ça fait plaisir de savoir qu'il y a autant de personnes sur qui compter.

Un merci tout particulier à Lucas et Elise pour votre accueil lors des séjours toulousains. Ces moments passés avec vous étaient vraiment magiques et j'espère qu'il restera encore une petite place pour moi dans votre chambre d'amis !

Je souhaite enfin remercier du fond du coeur ma famille. Merci à mes parents pour leur confiance et leur patience. Merci pour tout ce que vous m'apportez depuis toutes ces années. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir permis d'aller jusqu'au bout de mes projets, et surtout merci d'avoir répondu plus que présent quand la situation l'exigeait. Rien n'aurait été possible sans vous. Je ne vous le dis sans doute pas assez mais MERCI.

Merci Kiki, ma super grand mère, pour tes encouragements et tes bons petits plats. J'espère hériter de toi cette vivacité d'esprit qui te caractérise tant.

Merci aussi à toute la famille Vanze pour les bons moments passés ensemble. Votre bonne humeur communicante, votre enthousiasme et votre passion des jeux m'ont permis de me ressourcer et de me donner l'énergie de continuer.

Un immense merci à tous ceux qui de près ou de loin ont participé de n'importe quelle manière qui soit à concrétiser ce projet.

Enfin Julie, merci de me supporter au quotidien, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci de prendre tant soin de moi, de t'occuper et de gérer autant de choses, c'est bon de savoir que je peux compter sur toi. Merci pour ta joie de vivre, ton hyperactivité un peu malade et tes conseils toujours pertinents qui m'ont permis d'avancer. Tu m'apportes tellement, la vie ne serait pas la même sans toi.

Résumé

Titre : L'aluminium, facteur de risque environnemental impliqué dans la physiopathologie des maladies intestinales.

L'aluminium (Al) est le métal le plus abondant de notre environnement. Il est naturellement présent dans les sols, les roches, les minéraux, l'air, l'eau, et son utilisation pour la fabrication de produits de consommation courante n'a cessé d'augmenter de façon exponentielle dans les pays industrialisés. Durant les dernières décennies, la biodisponibilité de l'Al a fortement augmenté par l'activité humaine et les populations sont exposées quotidiennement à de multiples sources et doses d'Al, notamment par la voie orale. En se basant sur la description des effets toxiques et délétères de l'Al dans diverses pathologies ainsi que sur les doses d'Al ingérées, nous avons montré que l'Al pouvait participer à l'aggravation de l'inflammation intestinale, diminuer la cicatrisation muqueuse et le renouvellement cellulaire (Pineton de Chambrun et al., 2014).

Dans le but de comprendre les mécanismes par lesquels l'Al perturbait l'épithélium intestinal, nous avons évalué la toxicité de l'Al sur la cellule épithéliale intestinale. Nous avons montré dans cette étude que l'Al diminuait la viabilité cellulaire, favorisait l'apoptose et perturbait le cycle cellulaire. L'Al avait également des effets pro-carcinogènes et pro-inflammatoires sur les cellules épithéliales intestinales. Ainsi, nous avons démontré que l'Al pouvait avoir des effets toxiques sur la muqueuse intestinale.

Nous avons ensuite étudié les effets de l'Al sur la sensibilité viscérale chez le rongeur. Nous avons montré que l'ingestion d'une dose d'Al cohérente avec l'exposition humaine induisait une augmentation de la sensibilité viscérale chez le rat et la souris. Cette hypersensibilité induite par l'Al était persistante et exacerbée lors d'une nouvelle intoxication, indiquant ainsi qu'il n'y a pas de phénomène de tolérance. De plus, les femelles étaient plus affectées par l'hypersensibilité induite par l'Al que les mâles. Nous avons montré que les mécanismes impliquaient une augmentation de la perméabilité et étaient dépendants de la dégranulation des mastocytes et du récepteur aux protéases 2. Ces résultats sont pertinents avec la description des mécanismes observés dans la pathogénèse du syndrome de l'intestin irritable (SII). En effet, les malades présentent le plus souvent une hypersensibilité viscérale, une augmentation de la perméabilité intestinale, une altération du microbiote et une inflammation intestinale à bas grade. Les causes de cette maladie sont inconnues mais les facteurs

environnementaux sont fortement suspectés. Ainsi, l'Al pourrait être un nouveau facteur de risque environnemental impliqué dans le développement du SII.

En conclusion, ces résultats nous ont permis de démontrer la toxicité de l'Al sur le tube digestif et de mettre en avant un nouveau facteur de risque environnemental dans la physiopathologie des maladies intestinales telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et le syndrome de l'intestin irritable.

Mots clés : Aluminium, Cellules HT-29, Cytotoxicité, Syndrome de l'Intestin Irritable, Hypersensibilité Viscérale, Distension colorectale.

Abstract

Title: Aluminium, environmental risk factor involved in the pathogenesis of intestinal diseases.

Aluminium (Al) is the most abundant metal in our environment. Al naturally occurs in soils, rocks, minerals, air, water and its use in consumer products increase exponentially in industrialized countries. During last decades, human activities led to an increase in the bioavailability of Al and populations are exposed daily to multiple sources and doses of Al, including the oral route. Based on the description of toxic and deleterious effects of Al in various pathologies as well as ingested doses of Al, we showed that Al could participate in the exacerbation of intestinal inflammation, decrease mucosal healing and cell renewal (Pineton de Chambrun et al., 2014).

In order to understand the mechanisms involved in the perturbations of the intestinal epithelium, Al toxicity was evaluated on intestinal epithelial cells. This study showed that Al decrease cell viability, promote apoptosis and disturb cell cycle. Al had also pro-tumorigenic and pro-inflammatory effects on intestinal epithelial cells. Thus, we demonstrated that Al could promote toxic effects on intestinal mucosa.

Then, we evaluated the effects of Al on visceral sensitivity in rodents. We have demonstrated that currently ingested amounts of Al, in humans, induced in mice and rats a dose dependent increase of colorectal sensitivity. Al-induced hypersensitivity persists over time so that intoxication was arrested, and appears again when Al intoxication resumes, dismissing any tolerance phenomenon. Moreover, female gender was more affected by Al-induced hypersensitivity than male gender. Mechanisms involved an increased permeability and were dependent on mast cell degranulation and protease activated receptor 2. These results are relevant to the mechanisms observed in the pathogenesis of irritable bowel syndrome (IBS). Indeed, patients usually exhibit visceral hypersensitivity, increased permeability, impaired microbiota and low inflammation degree of the gastrointestinal tract. Causes of the disease remain unknown but environmental factors are strongly suspected to be involved in the pathogenesis. Thus, Al could be a new environmental risk factor involved in the development of IBS.

In conclusion, these results demonstrate the toxicity of Al on the digestive tract and highlight a new environmental risk factor in the physiopathology of intestinal diseases such as inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome.

Key Words: Aluminum, HT-29 cells, Cytotoxicity Irritable Bowel Syndrome, Visceral Hypersensitivity, Colorectal distension

Table des matières

Remerciements	3
Résumé.....	8
Abstract.....	10
Table des matières.....	13
Abréviations	18
Introduction générale	20
Partie 1 : Introduction bibliographique	22
Le tube digestif	23
Anatomie, fonction et histologie de l'intestin grêle et du côlon.....	23
I. Généralités.....	23
II. Description histologique de la paroi intestinale.....	25
La perméabilité paracellulaire de l'épithélium intestinal	27
Le microbiote intestinal	29
Innervation sensorielle du tractus gastro-intestinal	29
I. Innervation sensitive intrinsèque.....	29
II. Innervation extrinsèque	31
1. Innervation extrinsèque efférente	31
2. Innervation extrinsèque afférente	31
1. Type I : Les afférences laminaires intraganglionnaires	32
2. Type II : Les afférences muqueuses	32
3. Type III : Les afférences musculo-muqueuses	32
4. Type IV : Les afférences intramusculaires vagales et spinales.	32
5. Type V : Les afférences spinales vasculaires.	33
L'aluminium.....	35
Présence de l'aluminium dans notre environnement.	35
I. Les voies d'expositions à l'aluminium.....	36
II. Doses d'expositions recommandées par les organismes de sécurité alimentaire.....	39
Absorption, distribution et élimination de l'aluminium	40
I. Le métabolisme de l'aluminium.....	40
II. Absorption de l'aluminium en fonction de la voie d'exposition.....	41
1. Exposition par ingestion.....	41
2. Exposition par inhalation.....	42
3. Exposition par la voie cutanée.....	43
4. Exposition par injection intramusculaire	43
Les effets de l'aluminium en fonction de la voie d'administration.....	44
I. Exposition par l'inhalation	44
1. Effets systémiques.....	44
2. Effets immunologiques	44
3. Effets neurologiques.....	45
4. Effets carcinogènes	45
II. L'exposition orale	45
1. Effets systémiques.....	45
2. Effets immunologiques	46
3. Effets neurologiques.....	46
4. Effets sur la reproduction	47
5. Effets sur le développement	47
III. L'exposition cutanée	48
1. Effets musculosquelettiques.....	48
2. Effets cutanés	48
IV. Les effets génotoxiques de l'Al.....	48

Les pathologies associées à l'aluminium	51
I. Le cas des malades en insuffisance rénale.	51
1. L'encéphalopathie :	51
2. L'ostéodystrophie :	52
3. L'anémie :	52
II. Les pathologies où l'implication de l'aluminium est suspectée.	53
1. Le cancer du sein :	53
2. La myofasciite à macrophages :	54
3. La maladie d'Alzheimer :	54
4. L'autisme et les maladies cognitives :	55
5. La maladie de Crohn :	56
III. Le cas des effets de l'aluminium sur la douleur.	56
Le syndrome de l'intestin irritable : mécanismes, causes et conséquences.....	60
Définitions de la douleur, du syndrome de l'intestin irritable, et description de ses critères diagnostiques.....	60
I. Le syndrome de l'intestin irritable	60
1. Les critères diagnostiques	60
2. Les autres symptômes du SII.....	63
II. Définition de la douleur :	63
Epidémiologie du syndrome de l'intestin irritable.....	66
I. Incidence	66
II. Prévalence	66
La physiopathologie du syndrome de l'intestin irritable.	68
I. Les troubles de la motilité gastro-intestinale dans le SII.	69
II. L'hypersensibilité viscérale dans le SII.....	69
III. L'inflammation dans le SII.	70
1. Implication des mastocytes dans le SII.	70
2. Implication des cellules entérochromaffines et de la sérotonine dans le SII.	72
3. Cellules inflammatoires dans le SII.....	73
4. Le système nerveux entérique dans le SII.	73
IV. La perméabilité intestinale dans le SII.	74
V. Le rôle du microbiote dans le SII.	75
La nociception viscérale dans le syndrome de l'intestin irritable	76
I. Les afférences nociceptives.....	76
II. Les récepteurs de la nociception.	78
1. Les récepteurs aux cannabinoïdes.....	78
1. Implication dans la motilité	78
2. Implication dans la nociception	79
2. Les récepteurs activés par les protéases.....	80
1. Implication dans les transports ioniques.....	81
2. Implication dans la perméabilité intestinale	82
3. Implication dans la motilité intestinale	82
4. Implication dans la nociception intestinale	82
3. Les canaux ioniques à potentiel de récepteur transitoire	84
1. Description	84
2. Implication dans la douleur viscérale.....	85
a) TRPV1	85
b) TRPV4	86
c) TRPA1	86
d) TRPM8	87
4. Les autres canaux et récepteurs suspectés	88
1. Les récepteurs sensibles à l'ATP	88
2. Les canaux sodiques voltage dépendants	88
3. Les canaux calciques voltages dépendants.....	89
4. Les canaux ioniques sensibles à l'acidité.....	89
5. Les récepteurs de la cholécystokinine.....	89
6. Les récepteurs du facteur de libération de la corticotrophine (CRFR)	90
Stratégies thérapeutiques	90

I.	Importance du sport	90
II.	Modification des habitudes alimentaires.....	91
III.	Traitement des patients atteints de SII-D	91
1.	Antidiarrhéiques.....	91
2.	Les agents serotoninergiques ; Antagonistes du recepteur 5-HT ₃	91
3.	Les antispasmodiques	92
IV.	Traitement des patients atteints de SII-C	92
1.	Régime alimentaire riche en fibres.....	92
2.	Les agents laxatifs	93
3.	Agents favorisant les sécrétions.....	93
V.	Traitements visant à modifier le microbiote	94
VI.	Les agents à action centrale.....	94
1.	Les antidépresseurs.....	94
VII.	Les thérapies psychologiques	95
VIII.	Médecines alternatives	95
	Les facteurs impliqués dans le développement du syndrome de l'intestin irritable.....	96
I.	Facteurs héréditaire et familiaux dans le SII	96
1.	L'agrégation familiale.	96
2.	Les études sur les jumeaux.....	96
3.	Les études génétiques :	97
II.	Les facteurs environnementaux et le SII.....	97
1.	Influence de l'environnement familial	98
2.	Influence du stress.....	99
3.	Influence de la nourriture.....	99
1.	L'allergie alimentaire	100
2.	L'hypersensibilité aux graisses.....	100
3.	Le cas des FODMAPs dans le SII (Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides, et Polyols Fermentables).	101
a)	Le rôle des FODMAPs dans les symptômes du SII.....	103
	Le syndrome de l'intestin irritable dans la famille des intolérances environnementales idiopathiques.	104
	Partie 2 : Résultats expérimentaux	107
	Article 1 : Effets toxicologiques de l'exposition de cellules épithéliales intestinales humaines à de l'aluminium	109
	Introduction.....	109
	Résultats	110
	Conclusion	137
	Article 2 : L'ingestion d'aluminium favorise le développement d'une hypersensibilité colorectale chez les rongeurs.....	140
	Introduction.....	140
	Matériel et Méthodes	141
	Résultats	149
	Caractérisation des effets de l'aluminium sur la sensibilité viscérale	149
I.	Effets de l'administration orale d'aluminium, à une dose pertinente chez l'homme, sur la sensibilité viscérale.....	149
II.	L'aluminium ingéré peut-il avoir un effet dose réponse sur la sensibilité viscérale ?	150
III.	Les effets de l'aluminium sur l'hypersensibilité viscérale sont-ils persistants dans le temps ?	151
IV.	Une tolérance vis-à-vis des effets de l'aluminium peut-elle s'installer au cours du temps ?	153
V.	L'intensité de douleur induite par l'aluminium est-elle comparable à des modèles connus pour influencer sur l'hypersensibilité viscérale ?	153
VI.	Les effets observés sont-ils spécifiques de l'aluminium ?.....	153
VII.	La cinétique d'apparition de l'hypersensibilité viscérale est-elle comparable entre les mâles et les femelles ?	154
VIII.	L'aluminium peut-il modifier l'activité cérébrale ?	155

Compréhension des mécanismes impliqués dans l'hypersensibilité viscérale induite par l'aluminium.....	156
I. L'inflammation colique peut-elle être responsable de l'hypersensibilité viscérale ?.....	156
1. Expression colique de cytokines impliquées dans l'inflammation	156
2. Etude de l'implication des cellules de l'immunité.....	157
1. Etude de l'infiltrat en polynucléaires neutrophiles	157
2. Etude de l'expression des marqueurs des cellules inflammatoires coliques	157
3. Quantification des cellules inflammatoires par marquages histologiques.....	157
3. L'hypersensibilité pourrait-elle être induite par une inflammation à bas grade causée par les mastocytes ?.....	159
1. Analyses histologiques des mastocytes.	159
2. Confirmation de l'augmentation d'activité des mastocytes	160
3. Les mastocytes sont-ils impliqués dans l'hypersensibilité viscérale induite par l'aluminium ?	161
a) Etude du rôle des mastocytes dans l'hypersensibilité viscérale par inhibition de leur dégranulation chez le rat.....	161
b) Etude du rôle des mastocytes dans l'hypersensibilité viscérale chez la souris transgénique déficiente en mastocytes.....	162
II. Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypersensibilité viscérale causée par l'aluminium ?	163
1. Evaluation de l'expression de 23 gènes impliqués dans la sensibilité viscérale.	163
2. Etude de l'implication de PAR-2 dans l'hypersensibilité induite par l'aluminium.	164
3. Etude des effets de l'aluminium et de PAR-2 sur la perméabilité intestinale.	166
Résultats complémentaires	167
I. Quantification des métabolites des acides gras polyinsaturés dans le côlon.....	167
Discussion	170
Conclusion	182
Discussion générale.....	184
Conclusion générale	188
Annexes.....	189
Bibliographie	204

Abréviations

5-HT Sérotonine

AFSSA Agence française de sécurité sanitaire des aliments

AGPI Acides gras polyinsaturés

Al Aluminium

AlCi Aluminium citrate

AlP Aluminium Phosphate

ASICs Canaux ioniques sensibles à l'acidité

Cb1 Récepteur aux cannabinoïdes 1

CCK Cholécystokinine

CE Cellules entérochromaffines

CIC Cellules interstitielles de Cajal

Cldn4 Claudine 4

CRF Corticotrophine

CRH Corticolibérine

DCR Distension colorectale

DHT Dose hebdomadaire tolérable

DSS Dextran Sulfate de Sodium

EFSA Autorité pour la sécurité alimentaire européenne

FODMAP oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides, et polyols fermentables

GI Gastro-intestinal

GLUT Récepteur au glucose

GMPc Guanosine monophosphate cyclique

HDC Hydrates de carbone

HHS Hypothalamo-hypophyso-surrénalien

IASP Association internationale pour l'étude de la douleur

IEI Intolérances environnementales idiopathiques

IgE Immunoglobuline E

IL Interleukine

IRM Imagerie par Résonance Magnétique

JAM Molécules d'adhésions jonctionnelles

KO Knock out

MC Maladie de Crohn

MGG May Grünwald Giemsa

MICI Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MMF Myofasciite à Macrophages

MPO Myéloperoxydase

Na_v Canaux sodiques voltage-dépendants

OMS Organisation Mondiale de la Santé

PARs Récepteurs activés par les protéases

PBS Phosphate buffer saline

pH Potentiel Hydrogène

ROI Régions d'intérêts

SII Syndrome de l'intestin irritable

SII-C Syndrome de l'intestin irritable avec constipation

SII-D Syndrome de l'intestin irritable avec diarrhée

SII-M Syndrome de l'intestin irritable avec alternance de diarrhée et de constipation

SII-PI Syndrome de l'intestin irritable Post Infectieux

SNA Système Nerveux Autonome

SNC Système Nerveux Central

SNE Système Nerveux Entérique

TEP Tomographie par émission de positons

Tjp1 Protéine de jonction serrée 1

TLR Récepteurs Toll-like

TMS Troubles Musculo Squelettiques

TNBS Acide Trinitrobenzène Sulfonique

TNF Facteur de nécrose tumorale

TRP Potentiel de récepteur transitoire

WT Wild type

ZnCi Zinc Citrate

ZO Zonula Occludens

Introduction générale

L'aluminium (Al) est le métal le plus abondant dans notre environnement. Sa production mondiale est passée de 5 millions de tonnes en 1960 à 49 millions de tonnes en 2014, et la consommation domestique a augmenté de 350% dans les pays industrialisés (Gourier-Frery et al. 2003). Les modes de contamination sont multiples, notamment par la consommation d'aliments riches en additifs ou cultivés dans les sols acides riches en Al, par les ustensiles de cuisine, l'eau de boisson, les médicaments, les vaccins, les cosmétiques, l'air, etc... Ainsi, l'Homme est exposé à l'Al par les voies orale, nasale, cutanée et parentérale, ce qui favorise son absorption et son stockage dans l'organisme.

Les études sur les effets néfastes de l'Al ont montré son pouvoir mutagène, pro-inflammatoire, immunogène, excitotoxique et pro-oxydant. De plus, les premières études sur l'Al, réalisées en 1958, décrivaient déjà son implication dans les troubles gastro-intestinaux. Plus récemment, il a été associé ou soupçonné dans de nombreuses pathologies aux symptômes variés parmi lesquels sont fréquemment retrouvés des troubles cognitifs, des neuropathies et des douleurs locales ou généralisées. Parmi ces pathologies, l'implication de l'Al est soupçonnée dans la maladie de Crohn. Les études antérieures réalisées au sein du laboratoire ont montré que l'administration orale d'Al aggrave l'inflammation intestinale chez la souris. Elle diminue aussi la cicatrisation muqueuse et stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales intestinales. Elle perturbe également l'intégrité de la barrière intestinale en augmentant la translocation bactérienne de l'intestin vers les ganglions mésentériques, traduisant une augmentation de la perméabilité intestinale.

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est un trouble fonctionnel chronique et récidivant du système gastro-intestinal (GI) caractérisé par des douleurs abdominales ou de l'inconfort associé à une perturbation de la forme et de la fréquence des selles. La pathogénèse du SII est complexe, multifactorielle et se caractérise par une hypersensibilité viscérale, une augmentation de la perméabilité intestinale, une altération du microbiote et une inflammation à bas grade intestinale.

La définition et les critères diagnostiques du SII ont changé au cours du temps. Ainsi, en 1978, Manning et ses collaborateurs présentaient les premiers critères basés sur les symptômes du SII. Plus tard, en 1989, les critères de Rome ont été présentés puis revus, par la suite, en critères de Rome I, Rome II et Rome III.

L'altération de la sensibilité viscérale est un facteur diagnostique majeur, retrouvé dans 30 à 70% des patients atteints par le SII. De ce fait, les fibres nerveuses sensibles et les

récepteurs de la nociception viscérale, comme les récepteurs aux protéases ou les canaux ioniques à potentiel de récepteur transitoire, semblent être des cibles privilégiées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans les symptômes du SII.

Alors que la prévalence internationale du SII est estimée à 11,2% de la population, elle varie fortement entre les pays et les populations. Ainsi, les études épidémiologiques suggèrent une influence du milieu social et de l'environnement sur cette prévalence. De nombreuses études ont évalué l'implication de l'environnement familial, du stress et de l'alimentation dans le SII. Toutefois, l'influence des polluants environnementaux n'a jamais été étudiée. Or, il semblerait que ces facteurs sont déjà impliqués dans des maladies présentant des symptômes similaires au SII.

La muqueuse intestinale est en contact direct avec le milieu extérieur et les études antérieures semblent soutenir le rôle délétère de l'Al sur l'épithélium intestinal. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce phénomène, le 1^e article présenté dans cette thèse étudie les effets cytotoxiques de l'Al sur les cellules épithéliales intestinales humaines.

Bien que l'environnement semble jouer un rôle important dans la pathogénèse du SII, aucun facteur environnemental n'a pu être déterminé. En raison des nombreux effets nocifs de l'Al et de son association avec des symptômes douloureux, nous avons sélectionné l'Al comme xénobiotique majeur susceptible de perturber la sensibilité intestinale. Le 2^e article présenté dans cette thèse, a évalué, dans un premier temps, les effets de l'Al sur la sensibilité viscérale. Les recherches ont aussi permis, dans un deuxième temps, d'identifier les mécanismes impliqués dans ce phénomène.

Partie 1 : Introduction bibliographique

Le tube digestif

Le système digestif est une structure tubulaire continue allant de la bouche jusqu'à l'anus et comprenant des « glandes annexes » telles que les glandes salivaires, la vésicule biliaire, le foie, et le pancréas. La région intestinale est composée par l'intestin grêle et le gros intestin. Ses principales fonctions sont le transport du bol alimentaire, la digestion enzymatique, l'absorption d'eau, d'électrolytes et de nutriments nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme, la protection contre l'environnement extérieur (par sa fonction de barrière).

Anatomie, fonction et histologie de l'intestin grêle et du côlon.

I. Généralités

L'intestin grêle débute au sphincter pylorique de l'estomac et occupe la majeure partie de l'espace dans la cavité abdominale (environ 6m à 7m chez l'homme). Il se compose de 3 segments : le duodénum qui débute à la sortie du pylore et qui correspond à la partie proximale de l'intestin grêle, il se poursuit par le jéjunum qui est la partie intermédiaire puis se termine par l'iléon, le segment distal, au niveau du caecum par la valvule de Bauhin (figure 1). La muqueuse de l'intestin grêle se caractérise par une succession de cryptes et de villosités recouvertes de mucus, formant une grande surface d'absorption d'environ 200m² entre la lumière du tube et le tissu.

Au cours de leur transit dans l'intestin grêle, les aliments sont dégradés, principalement dans le duodénum puis le jéjunum, par les enzymes du pancréas et la bile du foie. L'absorption des nutriments comme les acides gras, les acides aminés, le glucose, les vitamines, l'eau, a lieu principalement dans le jéjunum et se termine dans l'iléon. Lors du passage de l'iléon vers le côlon, la majorité des nutriments et 90% de l'eau ont été absorbés.

Le côlon mesure en moyenne 1,5m de longueur et 7cm de diamètre chez l'homme. Il se divise en 5 parties : le caecum qui forme une poche sur laquelle vient s'aboucher l'iléon. L'extrémité inférieure du caecum se prolonge par l'appendice vermiforme et son extrémité supérieure par le côlon. Le côlon se divise en 4 segments consécutifs : le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde qui aboutit au rectum. Bien qu'elle ne comporte pas de villosité, la muqueuse colique est composée de cryptes de Lieberkühn entrecoupant l'épithélium recouvert de mucus.

Le côlon absorbe l'excès d'eau et participe à la dégradation des composés alimentaires restant par les bactéries. Il permet également le stockage des matières fécales avant leur élimination par le rectum et le canal anal.

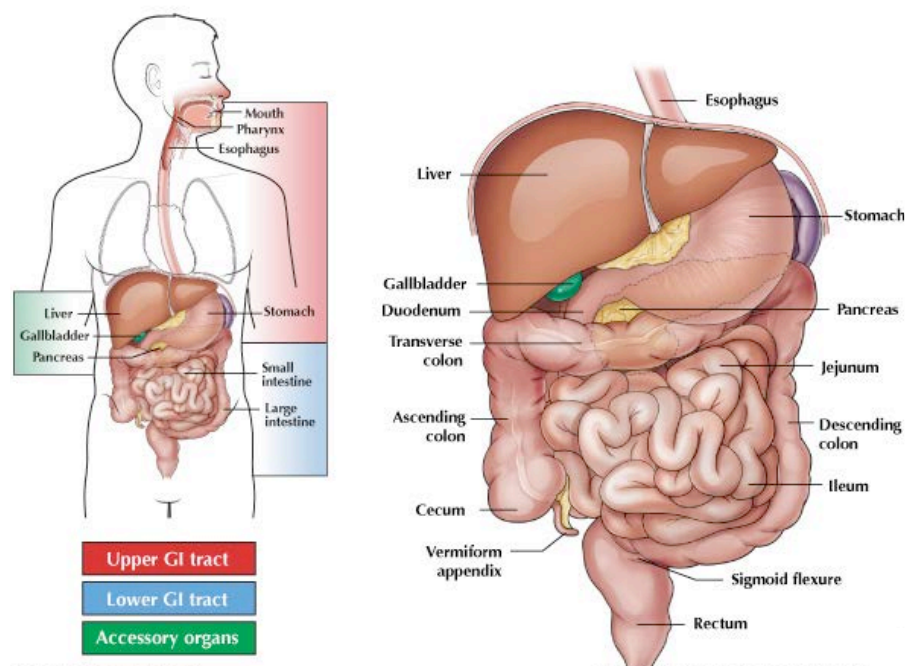


Figure 1 : Anatomie du système gastro-intestinal humain.
(d'après Trialsight Medical Media, 2008)

II. Description histologique de la paroi intestinale

A partir de l'œsophage, la paroi intestinale peut être divisée en 4 couches concentriques distinctes, dans l'ordre suivant de la lumière du tube digestif vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (ou adventice) (figure 2).

La muqueuse est composée de l'épithélium, la *lamina propria* et la musculaire muqueuse.

L'épithélium, situé à la surface de la muqueuse, est une monocouche composée de différents types de cellules épithéliales reliées entre elles par des protéines de jonction qui permettent de constituer une barrière étanche paracellulaire. Aux niveaux intestinal et colique, on retrouve les cellules suivantes :

Les entérocytes représentent les cellules majoritaires de l'épithélium. Ces cellules sont impliquées dans l'absorption des nutriments, des sels minéraux et de l'eau.

Les cellules à mucus, ou cellules caliciformes, sécrètent le mucus, composé principalement de mucines. Il tapisse la paroi intestinale et forme un gel alcalin et visqueux. Dans l'intestin grêle, le mucus participe à la protection de la paroi contre l'acidité, les enzymes digestives et facilite le passage des composés alimentaires. Dans le côlon, il participe à la défense contre les bactéries en maintenant en suspension des composés antibactériens.

Les cellules entérochromaffines sont principalement situées au fond des cryptes du tractus digestif. Elles synthétisent et stockent 90% de la sérotonine du système gastro-intestinal. Elles participent à la régulation des sécrétions et de la motilité intestinale.

Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes de l'intestin grêle et sécrètent des enzymes à activité antimicrobienne (lysozyme, phospholipase A2,...).

Les cellules entéro-endocrines contribuent à l'absorption et la sécrétion d'hormones favorisant le péristaltisme.

Les cellules souches situées au fond des cryptes permettent le renouvellement des différents types cellulaires de la muqueuse.

La lamina propria est une couche de tissu conjonctif lâche, située sous l'épithélium. Elle contient des capillaires sanguins, des vaisseaux lymphatiques et l'ensemble des cellules immunitaires constituant le tissu lymphoïde associé au tube digestif.

La musculaire muqueuse est une fine couche composée de cellules musculaires lisses. Elle sépare la *lamina propria* de la sous-muqueuse et favorise la propulsion des sécrétions glandulaires.

La sous-muqueuse est une couche de tissu conjonctif lâche située entre la muqueuse et la musculaire sous-jacente. Elle regroupe des vaisseaux sanguins, lymphatiques et le plexus nerveux de Meissner du système nerveux entérique (SNE) (cf chapitre tube digestif/ I. Innervation sensitive intrinsèque) contrôlant les sécrétions intestinales.

La musculature se compose de deux couches de tissu musculaire lisse : une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Le plexus myentérique d'Auerbach du SNE est situé entre ces couches (cf chapitre tube digestif/ I. Innervation sensitive intrinsèque). La contraction et la relaxation de ces muscles sont responsables du péristaltisme intestinal. Ils favorisent le mélange et la progression du bol alimentaire le long du tractus gastro-intestinal sous le contrôle du plexus nerveux.

L'adventice, ou séreuse, est une membrane séreuse mince recouvrant la face externe de la musculature. Au niveau de l'intestin grêle et du côlon, la séreuse fait partie du péritoine viscéral, elle permet de fixer les intestins à l'arrière de la paroi abdominale.

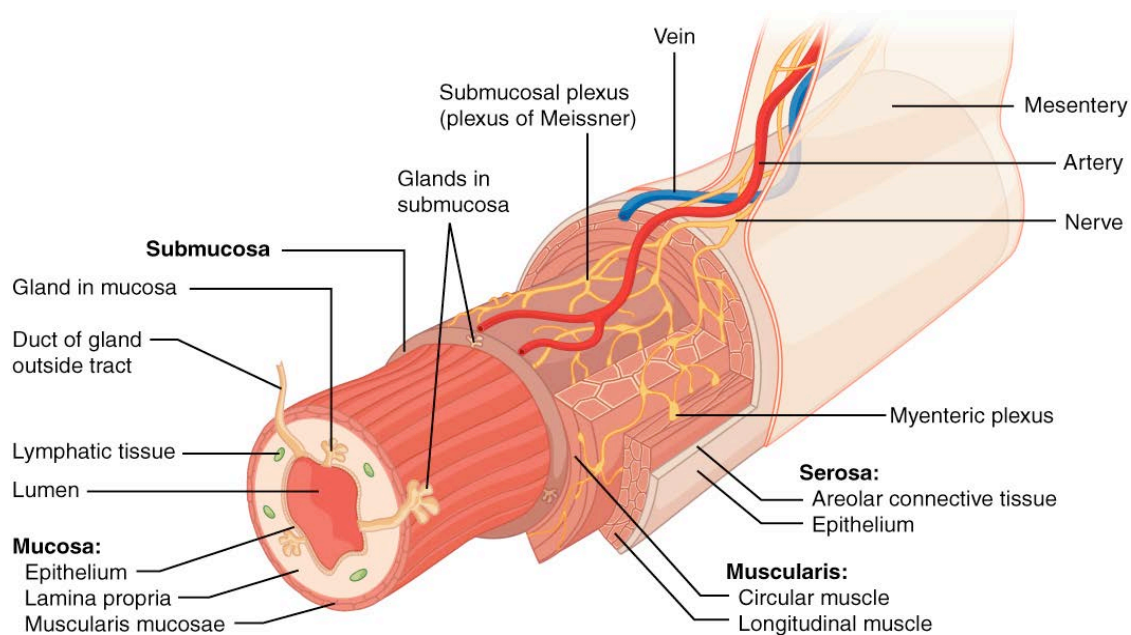


Figure 2 : Organisation histologique du tube digestif.

Le tube digestif est constitué de 4 couches concentriques réparties de la manière suivante depuis la lumière vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse, et la séreuse. La muqueuse est composée de l'épithélium, la *lamina propria* et la musculature de la muqueuse. Deux plexus nerveux sont présents : le plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner est situé entre la musculature de la muqueuse et la couche musculaire circulaire interne, et le plexus myentérique, ou plexus d'Auerbach est situé entre la couche musculaire circulaire interne et la couche musculaire longitudinale externe (d'après OpenStax College, Rice University).

La perméabilité paracellulaire de l'épithélium intestinal

La perméabilité intestinale participe à la régulation du passage et de l'absorption des nutriments provenant de la digestion des aliments. Un ensemble complexe de jonctions intercellulaires maintient l'intégrité et les spécificités de l'épithélium intestinal et permet le passage sélectif des molécules. L'épithélium forme ainsi une barrière sélective par l'intermédiaire de 3 types de jonctions intercellulaires : Les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées.

Les jonctions serrées forment la principale structure de régulation de la perméabilité paracellulaire (Nusrat et al., 2000) et déterminent la taille des pores à l'origine du passage des molécules de faible poids moléculaire (Shen et al., 2011).

Ces jonctions sont constituées d'un assemblage de protéines transmembranaires : les occludines, les claudines et les molécules d'adhésions jonctionnelles (JAM). Elles sont liées à des protéines intracellulaires telles que ZO-1 et ZO-2 (Zonula Occludens), elles mêmes fixées au cytosquelette d'actine (figure 3). Ces protéines forment un réseau de fibrilles qui ceinture et fixe le domaine apical des cellules épithéliales au cytosquelette. Ces jonctions permettent ainsi le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal et la mise en place d'une perméabilité paracellulaire sélective, pour le passage de petites molécules à travers l'épithélium.

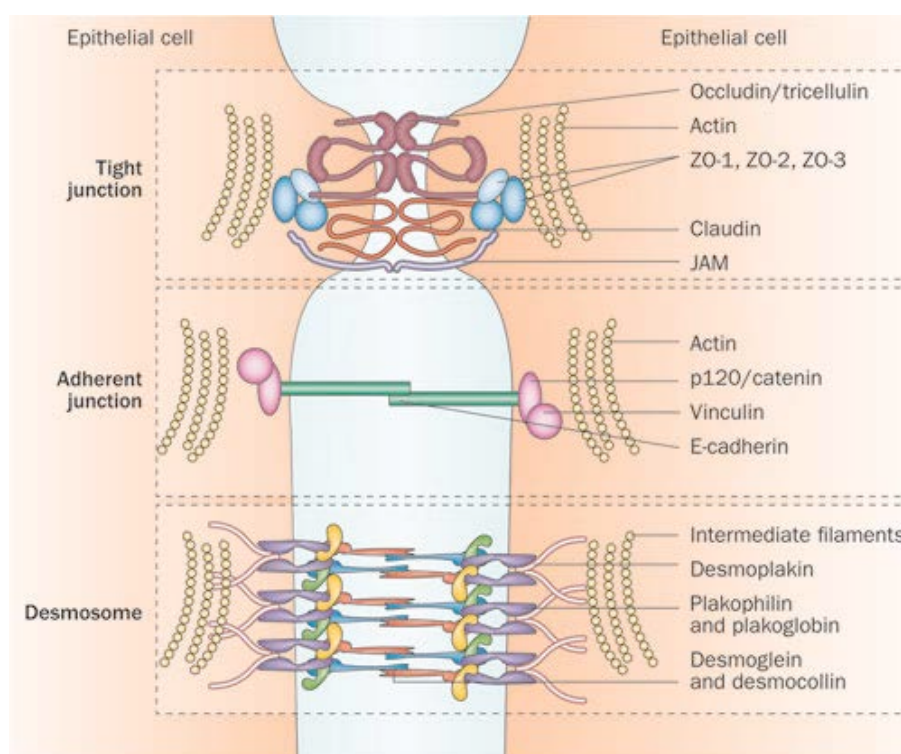


Figure 3 : Représentation schématique des jonctions intercellulaires des cellules épithéliales intestinales. Les jonctions serrées, sont des complexes protéiques qui permettent de fermer l'espace intercellulaire et de réguler la perméabilité paracellulaire de la barrière épithéliale intestinale. Les jonctions adhérentes et les desmosomes maintiennent les cellules épithéliales entre elles et participent à la résistance mécanique de la barrière.

Abréviations : JAM, molécule d'adhésion jonctionnelle; ZO, zonula occludens. (D'après Neunlist et al., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*, 2013)

Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal désigne l'écosystème complexe des microbes qui peuplent l'intestin (Young and Schmidt, 2008). Chez le sujet normal, il est composé de champignons, de virus, d'archées et majoritairement de bactéries. Ainsi, l'intestin humain adulte comprend plus de 10^{14} microorganismes composés de 300 à 1000 espèces microbiennes différentes et pesant 2kg du poids total d'un individu (Biedermann and Rogler, 2015). La concentration en microorganismes et la diversité du microbiote sont croissantes de l'estomac au côlon et peuvent varier sous l'influence des facteurs environnementaux, tels que la nutrition, le mode de vie, les toxines et autres facteurs exogènes.

La flore intestinale est essentielle pour maintenir les fonctions métaboliques, trophiques et protectrices du système gastro-intestinal, telles que la digestion et l'absorption des nutriments, la protection contre les pathogènes et la réponse immunitaire, la prolifération des cellules épithéliales intestinales.

Un nombre croissant de maladies non infectieuses est associé à la perturbation du microbiote intestinal, parmi lesquelles on retrouve le Syndrome de l'intestin irritable (SII) et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

Innervation sensorielle du tractus gastro-intestinal

Le tube digestif est entièrement contrôlé et coordonné par le système nerveux autonome (SNA). En plus de la régulation des fonctions de digestion et d'absorption, le SNA doit assurer un rôle de protection contre les antigènes et les agents pathogènes présents dans la lumière du tube. Les fonctions principales de ce système nerveux sont donc de percevoir les stimuli de la lumière et de la paroi intestinale et d'initier les réponses appropriées. Par conséquent, le tractus gastro-intestinal est doté d'une innervation sensitive vaste, comprenant le système nerveux intrinsèque ou système nerveux entérique (SNE) dont les corps cellulaires des neurones sont dans l'organe, et le système nerveux extrinsèque dont les corps cellulaires des neurones sont en dehors de l'organe (figure 4).

I. Innervation sensitive intrinsèque.

Le SNE est le système nerveux intrinsèque du tractus gastro-intestinal. C'est un système réflexe semi-autonome, constitué de milliers de ganglions qui se situent dans la paroi de

l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon, le pancréas, la vésicule biliaire. Chez l'Homme, plus de 400 millions de neurones répartis le long du tractus gastro-intestinal composent le SNE. Il est également constitué de fibres nerveuses qui innervent les ganglions, les muscles de la paroi intestinale, l'épithélium muqueux, les artérioles et d'autres tissus aux fonctions effectrices. Les neurones du SNE sont organisés en 2 types de plexus ganglionnaires différenciés par leur localisation :

- Le plexus myentérique d'Auerbach est situé entre les couches musculaires circulaires et longitudinales de la musculature du tube digestif. Il forme un réseau continu de l'œsophage au sphincter anal. Son rôle majeur est de réguler la motilité intestinale.

- Le plexus sous-muqueux de Meissner est situé dans la sous-muqueuse, principalement dans l'intestin grêle et le côlon.

Le SNE coordonne les réflexes intestinaux indépendamment du cerveau et de la moelle épinière. Il est composé de neurones sensoriels primaires, sensibles à des stimuli mécaniques et chimiques, d'inter-neurones ascendants et descendants pour transmettre l'information entre les neurones, d'afférences primaires intrinsèques et de neurones moteurs pour induire une réponse aux stimuli par les effecteurs (muscles lisses, vaisseaux sanguins, glandes épithéliales et muqueuses). (Costa et al., 2000). De nombreux neurotransmetteurs, tels que la sérotonine, l'acétylcholine, la substance P et le peptide vasoactif intestinal, participent à la transmission de l'information dans le SNE. De par ces propriétés, le SNE est décrit comme le deuxième cerveau (Gershon, 1999)). Grâce à ce réseau complexe de neurones et de nerfs, le SNE détecte les conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal, intègre les informations sur l'état du tractus gastro-intestinal et régule de nombreuses fonctions physiologiques. Il contrôle ainsi la motilité intestinale, la modulation des fonctions immunitaires et endocrines, la régulation de la circulation sanguine et le mouvement des fluides trans-épithéliaux locaux.

Le SNE communique également avec le système nerveux central par l'intermédiaire des neurones efférents sympathique et parasympathique, mais aussi par les neurones afférents du système nerveux extrinsèque.

II. Innervation extrinsèque

Les nerfs extrinsèques des systèmes nerveux autonome, parasympathique et orthosympathique, participent à la transmission des signaux de /vers le système nerveux central (SNC) pour adapter la réponse du tube digestif à l'environnement, en régulant par exemple la motricité intestinale.

1. Innervation extrinsèque efférente

Les fibres efférentes orthosympathiques : Les corps cellulaires de ces fibres se situent dans la partie thoraco-lombaire de la moëlle épinière. Les axones circulent par les nerfs splanchniques jusqu'au ganglion prévertébral pour former une synapse cholinergique avec les neurones post-ganglionnaires. Ces fibres suivent le trajet des artères qui vascularisent l'intestin et aboutissent à l'innervation des artéioles de l'intestin, du système nerveux entérique et de la muqueuse. Ces efférences contrôlent ainsi le flux sanguin, la motricité et les sécrétions intestinales (Brierley et al., 2004).

Les fibres efférentes parasympathiques : Ces fibres ont leurs corps cellulaires dans les noyaux dorsaux moteurs et ambigus situés au niveau du bulbe rachidien. Elles innervent principalement l'œsophage, l'estomac et l'intestin grêle proximal par l'intermédiaire du nerf vague. D'autres corps cellulaires situés au niveau sacré de la moëlle épinière innervent le rectum et le sphincter anal par l'intermédiaire du nerf pelvien. La principale fonction de ces fibres est d'innervier les neurones du SNE pour moduler les réflexes internes de l'intestin.

2. Innervation extrinsèque afférente

Les afférences neuronales primaires détectent les stimuli et les transmettent au système nerveux central. Les fibres au niveau gastro-intestinal peuvent être classées en fonction des neurotransmetteurs, des canaux ioniques et des récepteurs exprimés, du type de neurofilament ou encore de leurs fonctions. Nous utiliserons ici une classification basée sur l'emplacement spécifique des terminaisons nerveuses intestinales, ce qui permet de définir 5 types de neurones sensitifs intestinaux (Brookes et al., 2013).

1. Type I : Les afférences laminaires intraganglionnaires

Les terminaisons nerveuses de ces nerfs sensitifs sont principalement localisées au niveau du ganglion myentérique de la paroi intestinale. Ces fibres innervent le tube digestif par le nerf vague pour la partie proximale ou le nerf pelvien pour la partie distale. Il s'agit de mécanorécepteurs à bas seuil d'activation, sensibles à la tension, activés par la distension et la contraction, notamment au niveau de l'estomac et de l'intestin activant le système nerveux parasympathique lors de la défécation. (Brookes et al., 2013; Denny-Brown and Robertson, 2004; Iggo, 1955; Paintal, 1957; Tassicker et al., 1999)

2. Type II : Les afférences muqueuses

Ces fibres innervent le tube digestif par l'intermédiaire des nerfs vagues, pelviens et splanchniques. Les terminaisons nerveuses sont localisées dans la muqueuse intestinale. Au niveau de l'intestin grêle, les terminaisons se projettent le long des villosités, et se ramifient en dessous de la couche épithéliale. D'autres terminaisons n'entrent pas dans les villosités et encerclent les cryptes de Lieberkühn. Ces fibres ne sont pas sensibles à la contraction et la distension mais sont activées par l'effleurement ou la compression de la muqueuse, les variations du potentiel hydrogène (pH), les stimuli chimiques et osmotiques en provenance de la lumière intestinale (Clarke and Davison, 1978; Paintal, 1957; Powley and Phillips, 2011) et par les sécrétions des cellules entéroendocrines, et notamment la sérotonine sécrétée par les cellules entérochromaffines (Hicks et al., 2002).

3. Type III : Les afférences musculo-muqueuses

Ces fibres innervent le tube digestif par l'intermédiaire des voies pelviennes et sacrées, leurs terminaisons nerveuses sont situées dans la musculaire muqueuse et la *lamina propria*. Elles sont activées par la distension et la distorsion faible de la muqueuse (Page and Blackshaw, 1998). Leur rôle n'est pas clairement défini, il semblerait que ces fibres, au niveau du rectum, participent à la défécation et aux sensations conscientes.

4. Type IV : Les afférences intramusculaires vagues et spinales.

Les terminaisons nerveuses de ces neurones constituent un réseau dense parallèle aux faisceaux de fibres musculaires de la musculature (Berthoud and Powley, 1992). Leur densité est accrue dans le fundus et les zones des sphincters de l'estomac où elles sont localisées à proximité des cellules interstitielles de Cajal (CIC) (Powley and Phillips, 2011). Elles sont également retrouvées dans le côlon et entre les couches circulaire et longitudinale de la

muscleuse, principalement au niveau du rectum. Les axones empruntent le système nerveux parasympathique. Ces fibres sont des mécanorécepteurs peptidergiques qui en fonction de la localisation peuvent exprimer le récepteur TRPV1 (Yu et al., 2005). Elles partagent ainsi de nombreuses similarités avec les nocicepteurs (cf chapitre La nociception viscérale dans le syndrome de l'intestin irritable/ II. Les récepteurs de la nociception). Ces afférences sont sensibles à la distension et à l'effleurement (Lynn and Brookes, 2011), elles sont donc mécanosensibles et transmettent les informations sur la tension, l'étirement ou les deux simultanément.

5. Type V : Les afférences spinales vasculaires.

Les afférences spinales de l'intestin proviennent des ganglions rachidiens de la racine dorsale au niveau des segments thoraco-lombaire et lombo-sacré, à l'exception de l'œsophage supérieur innervé par les afférences venant des segments cervicaux (Sang and Young, 1998; Dütsch et al., 1998). Ces fibres innervent les vaisseaux mésentériques, les artères et les artérioles de la sous muqueuse intestinale (Song et al., 2009). Des branches collatérales innervent les plexus myentériques, sous muqueux, la muqueuse, et la muscleuse intestinale et les tissus viscéraux tels que la rate, les ovaires, la vessie et le pancréas (Floyd and Morrison, 1974). Ces afférences sont activées par de multiples stimuli tels que la contraction et la distension de l'intestin, l'ischémie, l'hypoxie, la capsaïcine (agoniste naturel du récepteur TRPV1) et jouent un rôle majeur comme nocicepteur (Haupt et al., 1983; Longhurst et al., 1984; Longhurst and Dittman, 1987).

Ces fibres nerveuses possèdent également un rôle efférent dans la régulation de la vasodilatation. En effet, elles libèrent le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) et la substance P (Gibbins et al., 1985) qui favorisent respectivement la dilatation et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins pour protéger le tissu vasculaire lors de stimulations nociceptives (Holzer, 1998; Vanner and Surprenant, 1996). Ces afférences sont activées ou modulées par les médiateurs inflammatoires relargués lors de dommages tissulaires tels que l'ATP, la bradykinine, le glutamate, les protéases et l'histamine des mastocytes, le facteur de croissance nerveux, les prostaglandines et la sérotonine (Gschossmann et al., 2004; Sengupta et al., 1999). Elles possèdent également des récepteurs pour les cytokines pro inflammatoires telles que l'IL6, l'IL1 β et le TNF α (Andratsch et al., 2009; Binshtok et al., 2008; Li et al., 2004). L'excitabilité de ces neurones est particulièrement modulée en conditions inflammatoires et post inflammatoires, en association avec l'augmentation de la réponse viscéromotrice à la distension colorectale (Gschossmann et al., 2004; Sengupta et al., 1999). Enfin, l'activation de

ces fibres sensibles est médiée en partie par les canaux ioniques à potentiel de récepteur transitoire (TRP) tels que TRPV1, TRPV4 et TRPA1, fortement suspectés d'être impliqués dans l'augmentation de la sensibilité viscérale des patients atteints par le SII (cf chapitre La nociception viscérale dans le syndrome de l'intestin irritable/ II.3. Les canaux ioniques à potentiel de récepteur transitoire).

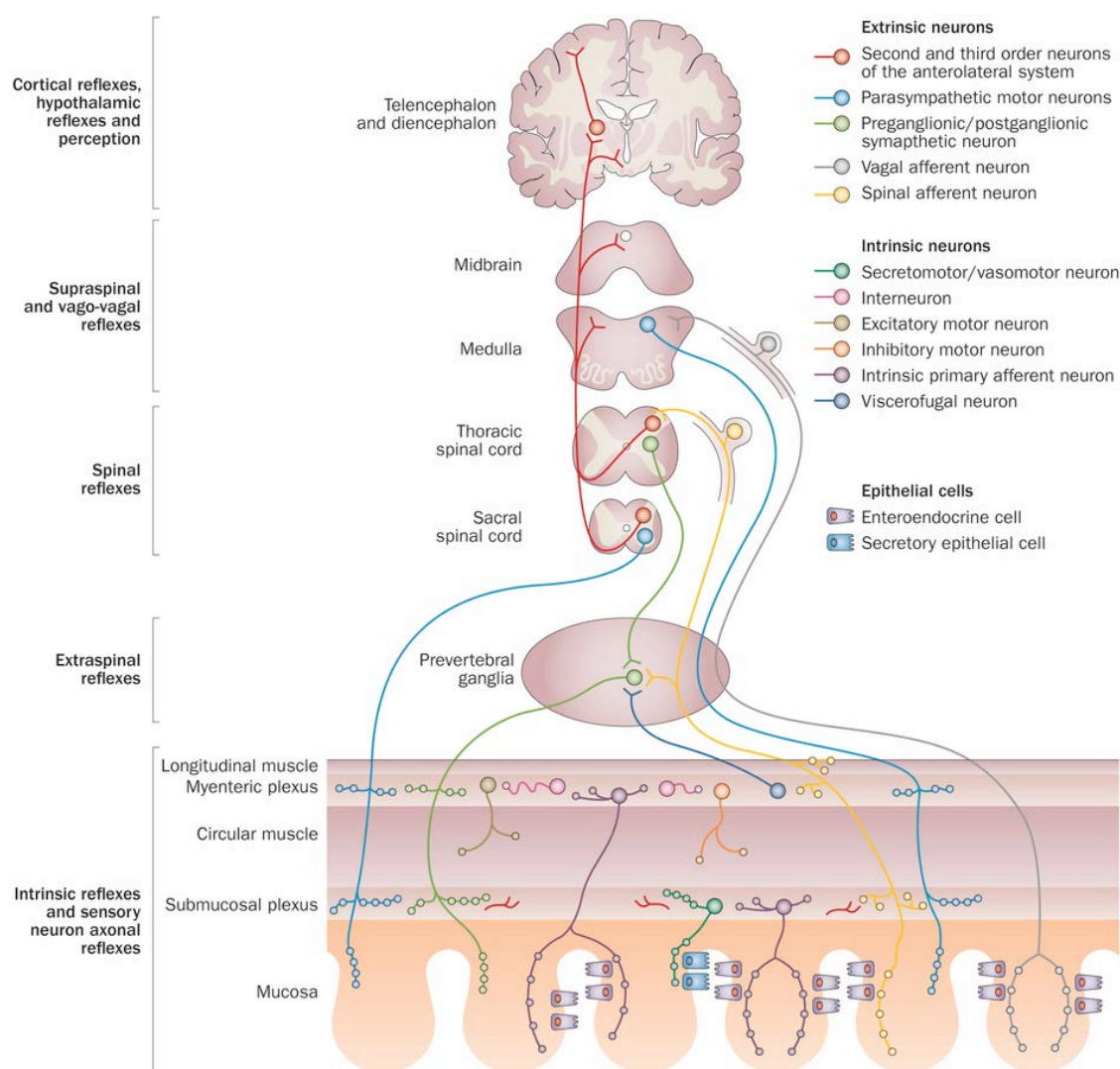


Figure 4 : Innervation du tube digestif par les systèmes nerveux intrinsèque et extrinsèque.

Les corps cellulaires et les projections des neurones intrinsèques, appartenant au système nerveux entérique, sont localisés dans la paroi intestinale. Ils contrôlent la motilité, la sécrétion et la vasodilatation des vaisseaux sanguins qu'ils innervent. Les systèmes nerveux parasympathiques et orthosympathiques assurent l'innervation extrinsèque. Les fibres efférentes sont impliquées dans la modulation des réflexes intrinsèques par le système nerveux central et les fibres afférentes contribuent à la perception consciente du transit, et à la nociception. (D'après Brierley, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014)

L'aluminium

Présence de l'aluminium dans notre environnement.

L'Al est le métal le plus présent dans notre environnement et le troisième élément le plus abondant de la croûte terrestre. L'Al est très réactif et n'est jamais rencontré sous forme libre dans l'environnement. Il est couplé à d'autres éléments tels que l'oxygène, le silicium ou le fluor. Ces composés chimiques sont retrouvés dans le sol, les minéraux, les roches, et les terrains argileux. L'Al, stocké dans les milieux naturels, peut être mobilisé par les pluies acides et être rejeté dans l'air par les procédés industriels. D'autres utilisations conduisent à la présence d'Al dans l'eau potable ou les denrées alimentaires (Krewski et al., 2007).

En 2014, les principaux producteurs d'Al primaire étaient la Chine, la Russie, le Canada, et les Emirats Arabes Unis et la production mondiale d'Al primaire a atteint 49,3 millions de tonnes, soit une augmentation de 3,6% entre 2013 et 2014 (USGS, 2015).

L'Al sous forme métallique est principalement utilisé dans l'industrie des transports, les constructions, les emballages et les équipements électriques. Sous forme de poudre, il est principalement utilisé sous forme de pigments pour la peinture, en additif pour le carburant et dans les combustibles. Les oxydes d'Al sont utilisés comme additifs pour la nourriture et dans les manufactures pour fabriquer les céramiques, les isolants électriques, les catalyseurs, le papier, les bougies, les ampoules, les pierres précieuses artificielles, les alliages, le verre et pour les fibres résistantes à la chaleur. L'hydroxyde d'Al est quant à lui largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique et dans la fabrication des produits de soin personnel. Les composés d'Al sont également utilisés dans l'alimentation courante en tant que conservateurs, colorants, agents anti-agglomérants, émulsifiants et levures artificielles, et dans les laits infantiles. Les minéraux naturels d'Al sont quant à eux utilisés pour la purification de l'eau de boisson, le raffinage du sucre, la brasserie et l'industrie du papier.

L'utilisation de l'Al dans la majeure partie des produits de consommation courante laisse supposer que l'Homme est largement exposé à ce composé.

I. Les voies d'expositions à l'aluminium

Bien qu'une prise de conscience des populations vis-à-vis des effets néfastes de l'Al sur la santé commence à avoir lieu, la majorité des personnes ne connaissent pas les multiples voies par lesquelles elles sont exposées quotidiennement à ce polluant (figure 5).

Pour commencer, la nourriture ingérée est une voie d'exposition majeure à l'Al. De nombreuses études ont évalué les habitudes alimentaires et les concentrations d'Al dans divers produits de consommation courante afin d'établir les doses d'exposition quotidienne des populations à l'Al. Les doses moyennes d'Al ingérées en France étaient comprises entre 40.3 µg/kg/jour chez l'adulte et 62.2 µg/kg/jour chez l'enfant (Arnich et al., 2012). Dans les autres pays européens, les plus fortes doses d'exposition par l'ingestion de nourriture ont été observées en Espagne chez les adultes et en Angleterre chez les enfants, avec des doses comprises entre 28,6 µg/kg/jour et 214 µg/kg/jour (González-Weller et al., 2010; Rose et al., 2010). Au Canada, la dose d'exposition moyenne chez l'adulte était de 124 µg/kg/jour (H, 2007). Enfin, la dose moyenne d'Al ingérée par la nourriture en Chine était de 180 µg/kg/jour et pouvait atteindre 471,7 µg/kg/jour chez l'enfant (Yang et al., 2014).

Ces données sont basées sur les habitudes alimentaires et les concentrations moyennes en Al des aliments. Elles ne prennent pas en compte des régimes alimentaires composés exclusivement d'aliments riches en Al, de la multitude d'additifs alimentaires consommés couramment, et des agents extérieurs favorisant une augmentation de la quantité d'Al ingérée. Ainsi, les valeurs d'intoxications individuelles peuvent varier considérablement en fonction des habitudes de vie et du régime alimentaire (Schaefer and Seifert, 2006). Afin d'illustrer et de mieux comprendre comment les doses moyennes d'Al ingérées par la nourriture peuvent être dépassées, voici quelques exemples d'aliments riches en Al :

- En Chine, le dosage de l'Al dans le thé a montré que les concentrations peuvent atteindre 600 à 800 mg d'Al par kg de thé, et conduire à lui seul à une dose d'intoxication moyenne de 100 µg/kg/jour (Cao et al., 2010).

- Les concentrations en Al dans le lait infantile varient considérablement en fonction du lieu et du type de produit, notamment entre les différentes sortes de laits en poudre (prêt à l'emploi, supplémenté ou à base de soja). Des études ont évalué la teneur en Al de ces différentes formules, et les concentrations en Al sont généralement comprises entre 180 et 750 µg/L (Burrell and Exley, 2010; Dabeka et al., 2011). Cependant, certaines formules à base de soja ou modifiées pour supprimer le lactose ou ajouter du Fer atteignent des concentrations en Al largement supérieures (de 1150 à 3450 µg/L). Ces concentrations en Al dans le lait infantile

conduisent à des doses d'ingestion journalière qui peuvent atteindre 363 µg/kg/jour (Dabeka et al., 2011; Dabeka and McKenzie, 1990).

-En Egypte, une étude de Al-Ashmawy a montré que la consommation de 45g de fromage fondu contribue à une dose d'intoxication comprise entre 2,2 et 4,28 mg/kg/jour d'Al (Al-Ashmawy, 2011). Cette teneur est due à l'ajout d'agents antiagglomérants composés d'aluminosilicates (Stahl et al., 2011). De plus, les concentrations d'Al présentes dans le fromage sont encore supérieures en Amérique, en Suisse et en France (Greger et al., 1985; Pennington, 1988; Schenk et al., 1989).

-En prenant en compte les valeurs moyennes d'Al présent dans le chocolat en Allemagne, une étude de Stahl et de ses collaborateurs a montré qu'il suffisait d'ingérer 257g de chocolat par jour chez l'adulte et 110g de chocolat par jour chez l'enfant pour atteindre la dose d'exposition à l'Al tolérable de 143 µg/kg/jour (Stahl et al., 2011).

Ces quelques exemples montrent que les doses d'exposition peuvent varier considérablement et les aliments ne sont pas les seuls responsables de l'apport alimentaire d'Al. En effet, en fonction de la température, du temps de contact, du PH et de la concentration en sel du produit contenu, l'Al a la capacité de migrer du contenant au produit (Fekete et al., 2012). Ainsi, certains produits métalliques ou céramiques, les bouteilles en verre, ou encore les ustensiles de cuisine en acier inoxydable ont la capacité de contaminer les produits alimentaires (Bohrer et al., 2003, 2001; Bolle et al., 2011; Demont et al., 2012; Koo et al., 1988) et d'augmenter la concentration d'Al déjà présente dans la nourriture. Une étude de Bassioni et de ses collaborateurs a évalué la contamination alimentaire par le papier d'Al. Cette étude a montré que le papier d'Al pouvait augmenter drastiquement la concentration en Al présent dans la nourriture et entraîner l'ingestion de 1 mg/kg/jour à 1,9 mg/kg/jour en un seul repas chez l'adulte. Dans le cas des boissons à pH acide, l'exposition pourrait même atteindre 7,7 mg/kg/jour (Bassioni et al., 2012).

L'eau de boisson est également contaminée par des concentrations variables d'Al en fonction du pH et de la zone géographique étudiée. Cependant, l'utilisation de sels d'Al en tant qu'agents de floculation dans les installations de traitement des eaux conduit généralement à des concentrations élevées d'Al dans les eaux traitées (DOI, 1970; Letterman and Driscoll, 1988; Miller et al., 1984). Ainsi, une étude réalisée aux Etats-Unis a montré que la concentration en Al dans diverses eaux potables était dans la majorité des cas inférieure à 0,1mg/L. Cependant, dans certaines régions, la concentration pouvait atteindre 1,029mg/L (Schenk et al., 1989). Selon l'AFSSA (AFSSA et InVS, 2003), 5% de la population française est exposée à des doses supérieures à 0,5mg/L alors que la réglementation de l'Organisation Mondiale de la

Santé (OMS) fixe le seuil à ne pas dépasser à 200µg/L. La concentration d'Al dans l'eau potable peut donc atteindre des niveaux supérieurs aux recommandations. Cependant, le niveau d'intoxication par l'eau de boisson reste faible car il correspondrait à environ 1% de l'apport alimentaire (Krewski et al., 2007).

Enfin, L'Al est également présent en quantité importante dans le tabac et diverses drogues telles que le cannabis (Exley et al., 2006). Malgré cela, les plus fortes doses d'intoxication par voie orale proviennent des traitements médicamenteux. En effet, Les antiacides visant à traiter l'hyperacidité gastrique sont composés de 104 à 208 mg d'Al hydroxyde par comprimé ou capsule (Zhou and Yokel, 2005). Une étude de Lione a également déterminé les concentrations d'Al dans les comprimés de plusieurs traitements. Ainsi il y a de 9 à 52 mg d'Al dans l'aspirine tamponnée, 36 à 1 450 mg d'Al dans les antidiarrhéiques, et 207 mg d'Al pour un médicament anti-ulcéreux. La posologie journalière potentielle en Al peut donc varier de 126 à 5000 mg en fonction du traitement suivi (Lione, 1985).

L'air ambiant est également une voie majeure d'exposition à l'Al. En effet, les particules d'Al de tailles, formes et compositions variables sont les composants majeurs des aérosols retrouvés dans les régions les moins polluées du globe comme l'Antarctique, mais aussi dans les pays industrialisés qui ont des croissances fortes et qui sont éventuellement des producteurs importants d'Al comme la Chine. Différentes études ont montré que les taux d'Al dans l'air des usines et fonderies peut atteindre des concentrations importantes (Nordic Expert Group, 2011; Westberg et al., 2001), allant jusqu'à 6800 µg/m³ de particules d'Al inhalables au niveau des cuves d'électrolyses et conduisant à une concentration en poussière d'Al respirable par les travailleurs comprise entre 0,08 et 2,1mg/m³ (Weinbruch et al., 2010). En plus du rejet important de l'Al dans l'air par les usines (Boullemant, 2011), ce composé est naturellement présent dans les cendres volcaniques (Wada, 1987), les fractions fines des sols argileux (Li et al., 2012; Theng and Yuan, 2008) et sous diverses formes nanoparticulaires dans les poussières en suspension (Childs et al., 1990; Floody et al., 2009; Karube et al., 1996). Krewski et ses collaborateurs ont compilé les données et ont observé que la concentration en particules d'Al dans l'air ambiant était comprise entre 0,6 et 7 µg/m³ (Krewski et al., 2007).

Les populations sont donc exposées quotidiennement par cette voie qui entraîne l'accumulation d'Al au niveau des voies respiratoires et du tube digestif par la clairance mucociliaire. En conditions humides, comme dans le tractus respiratoire, les aérosols composés d'Al s'associent soient à des molécules d'eaux, soient à des molécules aux propriétés acides,

ce qui facilite leur passage vers les alvéoles pulmonaires (Weinbruch et al., 2010). Toutefois, les effets de ces composés à ce niveau ne sont pas décrits.

L'Al est également administré par voie percutanée lorsqu'il est utilisé en vaccination. En effet, l'Al sert d'adjuvant lorsqu'il est co administré avec un allergène pour stimuler la réponse immunitaire. La dose limite par injection est fixée à 1,25mg d'Al en Europe et aux Etats-Unis (FDA, 2007; WHO, 2011).

Enfin, lors de l'application de produits d'hygiène corporelle et cosmétiques, l'exposition à l'Al est cutanée. Ainsi, les études estiment que l'utilisation d'antitranspirants entraîne l'application cutanée de 2 grammes d'Al par jour (Exley, 1998; Pineau et al., 2012). De plus, les sels d'Al limitent la sueur émise par la peau, ce qui favorise l'accumulation d'Al dans le corps en empêchant son excrétion par la transpiration. L'application de crèmes solaires ou de stick sur les lèvres favorise également l'accumulation cutanée d'Al.

Ces observations montrent qu'au cours de sa vie, l'homme est exposé quotidiennement à de multiples et diverses formes d'Al. Ainsi, les organismes mondiaux de sécurité sanitaire ont évalué les doses d'exposition et étudié leurs effets afin d'établir des recommandations sanitaires.

II. Doses d'expositions recommandées par les organismes de sécurité alimentaire.

Une étude réalisée par Pennington et Schoen en 1995 estimait que l'apport d'Al par l'alimentation était compris entre 7 et 9 mg/jour chez l'adulte correspondant à un apport de 116-128µg/kg/jour (Pennington and Schoen, 1995). En Europe, la moyenne des doses d'exposition à l'Al dans l'alimentation a été estimée entre 0,2 et 1,5mg/kg/semaine.

En se basant sur les études toxicologiques et les doses d'exposition, un comité mixte composé d'experts de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et de l'OMS a établi la dose d'Al hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) à 7 mg/kg de poids corporel (AFSSA et InVS, 2003). Cette recommandation a été revue par l'autorité pour la sécurité alimentaire européenne (EFSA) en 2008. Cette fois, l'aspect cumulatif des expositions au cours du temps a été pris en compte, et la dose hebdomadaire tolérable (DHT) a été fixée à 1 mg/kg toutes sources d'exposition comprises (EFSA, 2008). En 2011, le comité mixte composé des experts de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et

de l'OMS a revu la dose hebdomadaire tolérable provisoire à 2 mg/kg en se basant sur les additifs alimentaires les plus courants (JECFA, 2011). En 2013, l'EFSA a réalisé une nouvelle étude et a évalué l'exposition alimentaire à l'Al en utilisant les teneurs maximales (décrites dans les normes générales pour les additifs alimentaires) des additifs alimentaires les plus courants dans l'alimentation en Europe (E 523 : Al ammonium sulfate, E 541 : sodium Al phosphates, E 554 : sodium aluminosilicate, E 556 : calcium Al silicate, E 559 : Al silicate.) (EFSA, 2013). Ainsi, en se basant sur les habitudes alimentaires individuelles de chaque pays européen (EFSA, 2011), et sur les concentrations maximales en additifs contenus dans les principaux aliments, les experts de l'EFSA ont évalué que les doses d'intoxication par semaine pouvaient atteindre de 11,3 à 76,9 mg/kg chez les enfants en bas-âge, les enfants et les adolescents lorsque la consommation d'aliments riches en additifs est moyenne. En condition de forte consommation, les doses sont estimées entre 26,9 à 145,9 mg/kg par semaine. Pour les adultes et les personnes âgées, en condition de consommation moyenne, les doses estimées sont comprises entre 2,3 à 25,2 mg/kg, et en consommation élevée entre 7,4 à 52,9 mg/kg. Ces doses correspondent à une intoxication comprise entre 0,3mg/kg/jour et 20,8 mg/kg/jour.

Ces observations excèdent largement les recommandations établies par l'EFSA et l'OMS.

Absorption, distribution et élimination de l'aluminium

I. Le métabolisme de l'aluminium.

En tant qu'élément, l'Al est toujours lié à d'autres composés chimiques pour lesquels l'affinité peut être modifiée dans l'organisme. Dans les organismes vivants, l'Al existe sous quatre formes différentes (Ganrot, 1986):

- Sous forme d'ion libre (Al^{3+}), l'Al a la capacité de se lier à de nombreux ligands en fonction de l'affinité relative et de la quantité de ligand présent.
- Sous forme de complexes de faibles poids moléculaires en association avec des acides organiques, acides aminés, nucléotides, phosphates, hydrates de carbone. Ces complexes sont généralement stables et métaboliquement actifs.
- Sous forme de complexes macromoléculaires liés physiquement ou de manière covalente à des protéines, polynucléotides, et glycosaminoglycanes. Ces complexes macromoléculaires sont moins actifs au niveau métabolique que les complexes de plus faible poids moléculaire. Cependant, L'Al peut former des complexes irréversibles avec les macromolécules, comme

observé avec le noyau et la chromatine cellulaire (Dyrssen et al., 1987; Ganrot, 1986; Karlik et al., 1980).

L'Al a la capacité de se complexer sous diverses formes chimiques, ce qui peut influencer sur son absorption.

II. Absorption de l'aluminium en fonction de la voie d'exposition.

1. Exposition par ingestion

L'Al ingéré est absorbé principalement au niveau du duodénum et de l'intestin grêle par des mécanismes de diffusions passives, pinocytose ou transport actif dépendant de la transferrine ou de la vitamine D (Crisponi et al., 2012). Cette absorption peut être augmentée par l'hormone parathyroïdienne (PTH) stimulant la synthèse rénale (Azik et al., 2011).

La biodisponibilité de l'Al par voie orale est difficile à évaluer. En effet, de nombreuses études ont essayé de déterminer la quantité d'Al absorbée par l'organisme. Cependant, ces données varient fortement en fonction de la forme sous laquelle l'Al est complexé, de la dose ingérée, de l'aspect chronique ou aiguë de l'intoxication, du pH ou du type de solution ingérée. En 2007, Krewski et ses collaborateurs (2007) ont décrit l'importance de la forme chimique sous laquelle est complexée l'Al sur l'absorption orale de l'Al. Ainsi, des agents alimentaires comme le Phosphate réduisent l'absorption intestinale en formant du dialuminium triphosphate insoluble et les acides organiques comme le citrate augmentent l'absorption gastro-intestinale (Krewski et al., 2007; Priest, 2004; Wu et al., 2012). Krewski et ses collaborateurs ont conclu que l'absorption gastro-intestinale d'Al provenant de la nourriture est comprise entre 0,1 et 0,3%. Cependant, en fonction de la forme d'Al, l'absorption peut être augmentée et même dépasser les 1% (Poirier et al., 2011; Priest et al., 1996; Schönholzer et al., 1997; Taylor et al., 1998).

L'Al absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal se retrouve ensuite dans la circulation sanguine où 90% se fixe à la transferrine et 10% aux molécules de faible poids moléculaire telles que le citrate ou le phosphate (Yokel and McNamara, 2001). Dans le plasma, le citrate est complexé à 7-8% de l'Al (B. Chen et al., 2010) et pourrait jouer un rôle majeur dans l'absorption de l'Al au niveau du cerveau (Crisponi et al., 2012; Yokel and Florence, 2006) où l'AlCi représente 90% de la forme d'Al présente dans le liquide cérébro-spinal (Yokel and McNamara, 2001).

L'Al passé dans la circulation sanguine est éliminé en partie par les reins qui permettent son excrétion dans les urines (Greger and Baier, 1983; Kaehny et al., 1977; Sutherland and Greger, 1998). L'Al qui n'est pas absorbé est retrouvé principalement dans les selles et pour une petite partie dans la bile (Sutherland and Greger, 1998). Une étude a montré que l'excrétion d'Al dans les urines de patients traités par des antiacides n'est que trois fois supérieure à la moyenne, et suggère ainsi que l'Al restant est excrété dans les selles (Gorsky et al., 1979). Cependant, il pourrait également être stocké dans l'organisme. Les différentes études ont tendance à montrer que la biodisponibilité de l'Al est faible, cependant, les études sur sa distribution lorsqu'il est ingéré montrent que sa concentration dans les différents tissus augmente de manière significative. Ainsi, la rate, le foie, les os et les reins sont les organes où les concentrations les plus élevées sont retrouvées et l'Al est également présent dans le cerveau, les muscles, le cœur et les poumons (Greger and Donaubauer, 1986; Greger and Sutherland, 1997; Zafar et al., 1997). L'ingestion d'Al favorise également son accumulation dans le tube digestif, le placenta, le fœtus et le lait maternel (Cranmer et al., 1986; Cunat et al., 2000; Powell et al., 1994; Yokel, 1985).

2. Exposition par inhalation

L'Al contenu dans l'air est absorbé par les poumons, le tractus gastro-intestinal par clairance mucociliaire des voies respiratoires (Möller et al., 2004) et par la voie intranasale via les neurones olfactifs.

L'absorption pulmonaire de l'Al est estimée à 1,5-2% (Yokel and McNamara, 2001). Les études chez les soudeurs ont montré que l'Al absorbé par la voie aérienne est excrété par les urines dans une proportion linéaire entre la concentration en Al dans l'air ambiant et les taux urinaires (Rossbach et al., 2006; Sjögren et al., 1988). L'excrétion après l'inhalation d'Al est biphasique avec une première phase entre 7,5 et 9 jours (Pierre et al., 1995; Sjögren et al., 1988) et une deuxième phase entre 7 et 24 semaines (Schaller et al., 2007; Sjögren et al., 1988). Cependant, les études menées par Perl et Zatta (Perl and Good, 1987; Zatta et al., 1993) ont montré que l'Al peut également traverser l'épithélium nasal et atteindre le cerveau par transport axonal ou s'accumuler dans les poumons, les ganglions lymphatiques, pulmonaires, le foie, la rate et les glandes surrénales (Steinhagen et al., 1978; Stone et al., 1979; Teraoka, 1981).

L'Al présent dans l'air ambiant est donc absorbé et favorise l'augmentation des taux d'Al sériques, tissulaires et urinaires.

3. Exposition par la voie cutanée

Flarend et ses collaborateurs (2001) ont estimé l'absorption d'Al par voie cutanée à 0,012% par l'application d'Al chlorohydrate radioactif sous l'aisselle (Flarend et al., 2001). Une étude sur le traitement de l'hyperhydrose de la paume de la main a montré que l'application d'une solution topique de chlorure d'Al à 20% pendant 1 mois favorise la diminution de la production de sueur. L'étude histologique de la couche cornée de la peau a mis en évidence que les canaux des glandes sudoripares eccrines étaient remplis d'un plâtre amorphe composé de polysaccharides et de cytokératine absent avant le traitement. Cependant, l'Al n'a pas été retrouvé dans les canaux, laissant supposer que l'Al ne s'accumule pas à ce niveau (Yanagishita et al., 2012). Une autre étude a testé les effets de l'Al sur des biopsies humaines de peau. Elle a montré que lorsque la peau est intacte, l'Al est faiblement absorbé. Cependant, lorsque la peau est lésée (comme lors du rasage), l'Al n'est plus stocké par la couche cornée ce qui favorise son absorption cutanée (Pineau et al., 2012).

Aucune donnée n'existe sur la voie d'excrétion de l'Al par la peau. Chez la souris, l'application cutanée d'Al chloride favorise l'augmentation de la concentration d'Al dans le foie, le cerveau, les poumons, les reins et son passage transplacentaire (Anane et al., 1997). Cependant, dans cette étude, les souris auraient pu se lécher et provoquer une absorption par la voie gastrointestinale.

4. Exposition par injection intramusculaire

L'absorption systémique d'Al injecté dans le muscle squelettique dépend de sa forme chimique (Flarend et al., 1997; Verdier et al., 2005). Les principales formes d'adjuvants aluminiques utilisés en vaccination sont l'hydroxyde d'Al et le phosphate d'Al. Ces deux formes sont absorbées et retrouvées dans la circulation sanguine 1 heure après l'injection. Après 28 jours, 17% de l'hydroxyde d'Al et 51% du phosphate d'Al sont excrétés (Flarend et al., 1997), cependant, 3 à 6 mois après l'injection, de l'hydroxyde d'Al est toujours présent au site d'injection contrairement au phosphate d'Al (Verdier et al., 2005). De plus, une autre étude a montré que l'hydroxyde d'Al peut persister au site d'injection pendant 8 ans (Gherardi et al., 2001). Les études expérimentales sur les animaux montrent que l'Al administré par voie intraveineuse, intramusculaire, sous cutanée et intrapéritonéale est distribué dans les différents tissus, organes et dans les fluides corporels tels que le lait. De plus, l'augmentation des taux

d'Al dans le fœtus est en faveur du passage de l'Al au travers de la barrière placentaire (Anane et al., 1997; Du Val et al., 1986; Leblondel and Allain, 1980; Muller et al., 1992; Yokel and McNamara, 2001, 1989). Ainsi, l'administration intramusculaire d'hydroxyde d'Al ou de phosphate d'Al au lapin favorise l'accumulation d'Al dans le rein, la rate, le foie, le cœur, les ganglions lymphatiques, et le cerveau (Flarend et al., 1997).

Les effets de l'aluminium en fonction de la voie d'administration

I. Exposition par l'inhalation

1. Effets systémiques

Chez l'homme, l'exposition chronique à l'Al par les voies respiratoires est suspectée de provoquer l'asthme professionnel (Burge et al., 2000), des fibroses pulmonaires (al-Masalkhi and Walton, 1994), des pneumoconioses (Hull and Abraham, 2002), des pneumonies interstitielles (Herbert et al., 1982) et des granulomes (Cai et al., 2007). Chez l'animal, l'inhalation de particules d'Al conduit généralement à l'infiltration de macrophages, de neutrophiles et à la formation de granulomes (Steinhagen et al., 1978; Thomson et al., 1986).

Au niveau hématologique, les études sur des employés dans l'industrie de l'Al montrent que l'inhalation chronique d'Al favorise la diminution de l'hémoglobine des globules rouges et l'augmentation du taux de sédimentation des érythrocytes (McLaughlin et al., 1962).

2. Effets immunologiques

Les employés exposés à l'Al développent une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ CD8⁺ (He et al., 2003). Les études animales ont montré des altérations histologiques du système lymphoréticulaire, notamment par la formation de granulomes en réponse à l'élimination de l'Al pulmonaire par les macrophages alvéolaires au niveau des ganglions lymphatiques (Steinhagen et al., 1978; Thomson et al., 1986).

3. Effets neurologiques

Les travailleurs de l'Al présentent une incidence plus élevée de symptômes neurologiques tels que l'incoordination, les problèmes de concentration, les maux de tête, la dépression et la fatigue (Halatek et al., 2005; Sim et al., 1997; Sińczuk-Walczak et al., 2003). Ces personnes développent également des altérations significatives dans les tests de performance évaluant le temps de réaction, la coordination œil-main, la mémoire et/ou de la motricité (Hosovski et al., 1990; Polizzi et al., 2002).

Les résultats des études sur l'association entre l'exposition professionnelle à l'Al et le risque de développer la maladie d'Alzheimer sont contradictoires. Tandis que certaines études n'établissent pas de relation (Graves et al., 1998; Salib and Hillier, 1996), d'autres ont mis en évidence des déficiences cognitives qui peuvent être indicatrices d'un état préclinique de la maladie (Polizzi et al., 2002).

4. Effets carcinogènes

Les études sur les professionnels fortement exposés à l'Al ont montré une augmentation des cancers lymphatiques, hématopoïétiques et pulmonaires. Une incidence anormalement élevée de cancer de la vessie a également été décrite dans une région du Canada fortement soumise à l'industrie de l'Al (Thériault et al., 1984).

II. L'exposition orale

1. Effets systémiques

Au niveau gastro-intestinal, les premières observations réalisées en 1958 décrivent de nombreux troubles du tractus gastro-intestinal en relation avec la prise d'Al (Tomlinson, 1967). L'étude de cas d'une femme intoxiquée par des antiacides a également mis en évidence des troubles gastro-intestinaux et des douleurs généralisées (Woodson, 1998). Enfin, l'ingestion de phosphore d'Al cause des vomissements et des douleurs abdominales chez les personnes qui l'ingèrent accidentellement ou pour une tentative de suicide (Chopra et al., 1986; Khosla et al., 1988). Cet effet pourrait éventuellement être causé par la formation de phosphine, qui est un gaz toxique (ces études sont décrites dans la partie : Les effets de l'Al sur la douleur). Chez la

souris, l'ingestion de citrate d'Al favorise l'exacerbation de l'inflammation colique dans trois modèles animaux de colites et perturbe la cicatrisation de la muqueuse (Pineton de Chambrun et al., 2014).

Au niveau hématologique, l'Al favorise la diminution de l'hémoglobine, du taux d'hématocrite, et/ou des érythrocytes chez l'homme (Garbossa et al., 1998) et diminue la concentration en Fer dans le sang chez le rat (Farina et al., 2005).

Au niveau musculo squelettique, l'utilisation d'antiacides de manière chronique ou la prise de médicaments contenant des taux importants d'Al induit de l'ostéomalacie et des douleurs musculaires chez les personnes saines en surdose et chez les personnes atteintes d'insuffisance rénale (Carmichael et al., 1984; Chines and Pacifici, 1990; Woodson, 1998). L'Al peut également s'accumuler dans les articulations osseuses (Alfrey, 1993).

2. Effets immunologiques

Les études chez la souris montrent que la prise d'Al par voie orale favorise la prolifération des cellules des ganglions lymphatiques (Lauricella et al., 2001) ce qui pourrait altérer la réponse immunitaire. De plus, l'exposition périnatale des souris induit l'augmentation du poids de la rate et la diminution des concentrations en interleukine-2, interféron- γ , du facteur de nécrose tumoral α , la déficience en lymphocytes T CD4 +, et l'augmentation de la susceptibilité aux infections bactériennes (Golub et al., 1993; Yoshida et al., 1989).

3. Effets neurologiques

Des études sur la maladie d'Alzheimer réalisées en Norvège, au Canada et en France, ont évalué le rapport entre la concentration d'Al présente dans l'eau de boisson de différents départements ou villes avec l'incidence de la maladie d'Alzheimer. La majorité de ces études ont conclu qu'une concentration plus élevée d'Al dans l'eau de boisson était favorable à une augmentation de l'incidence de la maladie (Flaten, 2001; Rondeau et al., 2000) et associée à une augmentation de la concentration en Al dans le cerveau, le liquide cérébro-spinal et le sérum par rapport à des sujets contrôles (Virk and Eslick, 2015a). Ces résultats sont contestés par d'autres études (Forster et al., 1995; Wettstein et al., 1991). De plus, les études sur les populations à risques qui sont exposées à des quantités élevées d'Al par l'exposition professionnelle (Virk and Eslick, 2015b), la consommation de thé (Forster et al., 1995) ou

d'antiacides (Virk and Eslick, 2015c) ne parviennent pas à établir un lien avec la maladie d'Alzheimer. Cependant, ces derniers résultats pourraient ne pas refléter l'absorption de la même forme chimique d'Al que celle, plus facilement absorbable, présente dans l'eau de boisson (Gauthier et al., 2000). Ainsi, les données disponibles suggèrent que l'Al n'est pas l'élément déclencheur de la maladie d'Alzheimer. Cependant, il peut favoriser son développement en agissant comme un co-facteur dans la chaîne d'événements pathologiques menant à la maladie d'Alzheimer (Flaten, 2001).

Chez l'animal, les expériences montrent que l'intoxication orale par l'Al favorise la diminution de la force de préhension des membres antérieurs et/ou postérieurs de la souris (Golub et al., 1992; Oteiza et al., 1993), l'altération de la géotaxie (Golub et al., 2000) et la diminution de l'activité motrice (Golub et al., 1992). Au niveau sensoriel, l'Al induit une diminution de la sensibilité thermique (Golub et al., 2000), auditive et à l'air (Golub et al., 1992; Oteiza et al., 1993), ainsi qu'une altération du nystagmus oculaire (Mameli et al., 2006). Au niveau des fonctions cognitives, l'Al favorise la baisse de l'apprentissage et de la mémoire chez le rat (Jing et al., 2004; Zhang et al., 2003). Ces résultats impliquent fortement l'exposition orale à l'Al dans les altérations fonctionnelles et cognitives affectant les fonctions motrices et sensorielles.

4. Effets sur la reproduction

L'intoxication par l'Al entraîne des perturbations du cycle ovarien (Agarwal et al., 1996) et la diminution du nombre de spermatozoïdes (Krasovskii et al., 1979). Chez l'homme, les patients souffrant d'oligospermie présentent une augmentation de la concentration d'Al dans le liquide séminal. Ces résultats suggèrent que l'Al pourrait perturber la spermatogénèse (Klein et al., 2014).

5. Effets sur le développement

Des nourrissons souffrant d'insuffisance rénale traités par de l'hydroxyde d'Al jusqu'à 6 mois (Pivnick et al., 1995) et des enfants sains traités par des antiacides ont développé de l'ostéomalacie et une augmentation des taux d'Al dans les os (Andreoli et al., 1984; Griswold et al., 1983). Des enfants atteints d'insuffisance rénale sévère et traités par des chélateurs de phosphate riche en Al ont développé des encéphalopathies (Griswold et al., 1983).

Les études sur les animaux montrent que l'Al favorise l'augmentation de la mortalité des nouveau-nés (Bernuzzi et al., 1986; Domingo et al., 1987), altère la croissance, entraîne un retard de la maturation (notamment au niveau des os) (Gomez et al., 1991; Sharma and Mishra, 2006), et perturbe le développement du système nerveux (Bernuzzi et al., 1989, 1986) avec l'altération des fonctions sensibles (Golub et al., 1995, 1992) et motrices (Bernuzzi et al., 1989).

III. L'exposition cutanée

1. Effets musculosquelettiques

L'étude de cas d'une femme exposée pendant 4 ans au chlorhydrate d'Al contenu dans les déodorants montre que l'Al peut favoriser l'apparition de douleurs osseuses et de fatigues chroniques lorsqu'il est appliqué par voie cutanée. Cette patiente présentait une concentration sérique d'Al 10 fois supérieure aux normes. Les douleurs ont disparu avec l'arrêt de l'exposition (Guillard et al., 2004).

2. Effets cutanés

Chez l'homme, l'application de chlorure d'Al hexahydraté pour le traitement de la transpiration excessive des hyperhydroses axillaires ou palmaires et l'utilisation de déodorants contenant des sels d'Al entraînent l'apparition d'irritations de la peau (Ellis and Scurr, 1979; Gallego et al., 1999; Goh, 1990).

Chez l'animal, l'application de chlorure d'Al et de nitrate d'Al pendant 5 jours induit des dommages de la peau (hyperplasie, micro abcès, infiltration par des cellules inflammatoires, et ulcération). L'application d'autres formes d'Al n'a induit aucun effet néfaste, montrant l'importance de la forme chimique utilisée (Lansdown, 1973).

IV. Les effets génotoxiques de l'Al.

Des études montrent que l'Al peut se complexer avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Dyrssen et al., 1987) et favoriser l'augmentation significative de la formation de micronoyaux caractéristiques d'aberrations chromosomiques *in vitro* dans les lymphocytes

humains (Banasik et al., 2005; Migliore et al., 1999). Cependant aucune étude humaine *in vivo* n'a été réalisée.

Chez l'animal, l'injection intrapéritonéale de chlorure d'Al favorise l'apparition d'aberrations chromosomiques chez la souris (Manna and Das, 1972) et le rat (Wedrychowski et al., 1986). Cependant, d'autres études *in vitro* n'ont pas permis de reproduire ces effets mutagènes (Kanematsu et al., 1980; Marzin and Phi, 1985; Olivier and Marzin, 1987).

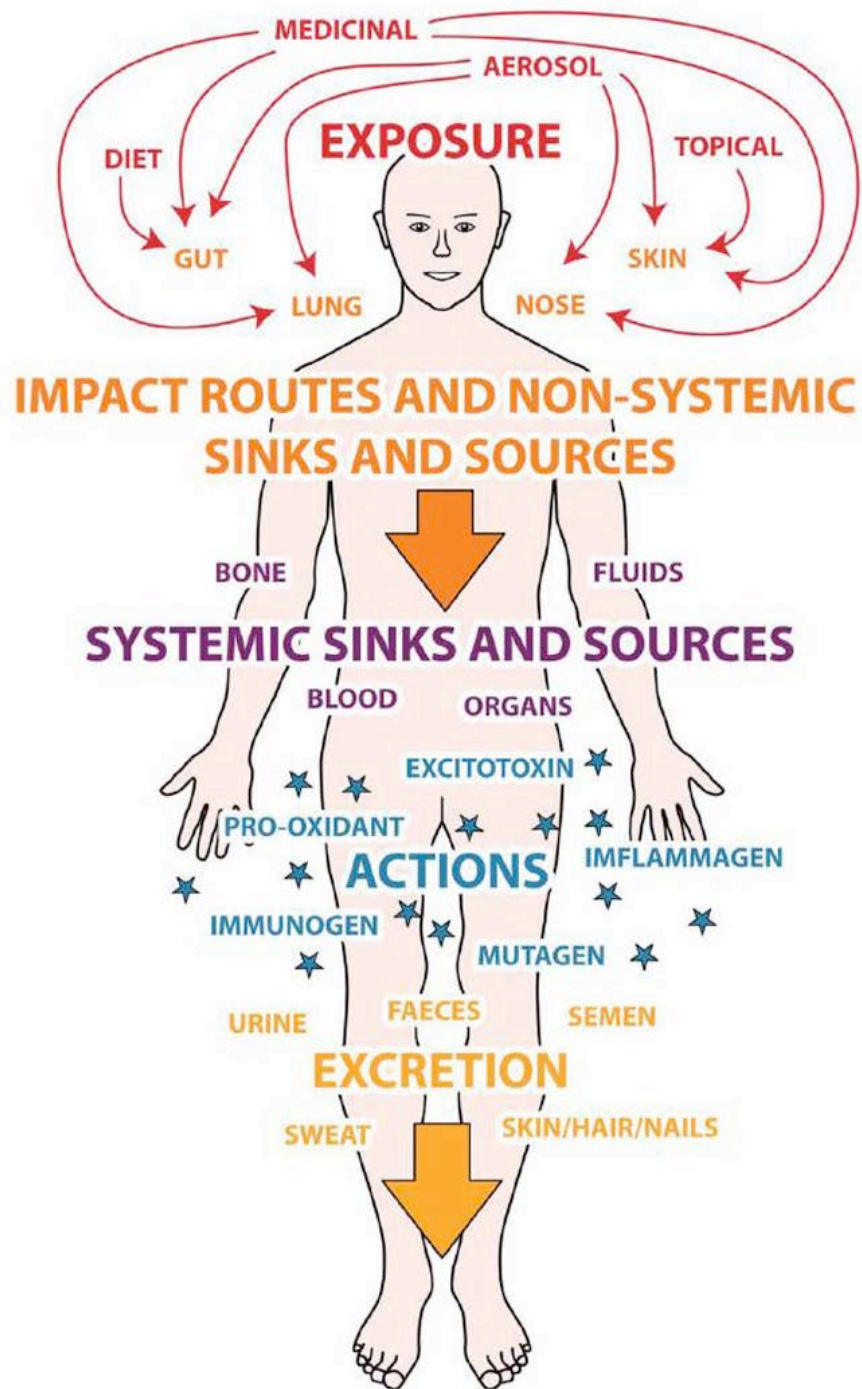


Figure 5 : Exposome de l'aluminium. Ce schéma représente les multiples voies d'exposition, de distribution, d'excrétion et les principaux effets de l'aluminium chez l'homme. (D'après Exley, *Environ Sci Process Impacts*. 2013)

Les pathologies associées à l'aluminium

De nombreuses études ont essayé de déterminer les effets de l'Al sur l'organisme. Dans un premier temps, nous décrirons les pathologies associées à l'Al dans une population à risque présentant une insuffisance rénale. Nous décrirons ensuite les pathologies pour lesquelles l'implication de l'Al est suspectée.

I. Le cas des malades en insuffisance rénale.

En conditions physiologiques, l'Al ingéré est excrété par les reins. Cependant, lorsque la fonction rénale est nettement réduite ou absente, la capacité d'excrétion de l'organisme diminue fortement et l'accumulation de substances nocives peut se produire (Alfrey, 1980). Dans les années 1960, de nombreux patients en insuffisance rénale ont été dialysés avec du liquide préparé à base d'eau contenant de l'Al. Lors de la dialyse, l'Al passe directement dans la circulation sans subir l'étape d'absorption (Hawkins et al., 1994) et les malades présentent ainsi un risque élevé de développer une réponse toxique. De plus, ces patients ont également reçu de l'hydroxyde d'Al par voie orale pour contrôler les taux de phosphate sérique anormalement élevés (Alfrey, 1993). Chez ces malades, l'Al n'est plus excrété correctement dans les urines qui représentent la principale voie d'élimination. Ainsi, ces patients ont développé des symptômes caractéristiques d'une intoxication à l'Al (Alfrey, 1993).

1. L'encéphalopathie :

En 1972, un syndrome neurologique évolutif et fatal a été diagnostiqué chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique traités par hémodialyses intermittentes à long terme. Les premiers symptômes étaient des troubles de la parole, de la démence, des convulsions et de la myoclonie apparaissant entre 3 et 7 ans après le début du traitement. Ces symptômes étaient associés à l'augmentation de la concentration en Al dans le cerveau, les muscles et les os des patients atteints. Les études ont d'abord associé l'hydroxyde d'Al donné par voie orale aux effets observés, puis le liquide de dialyse a été montré comme étant la source d'Al nocive (Flendrig et al., 1976). Ces études montrent que l'accumulation d'Al dans le tissu cérébral des patients dialysés provient de deux voies d'absorption distinctes : sanguine et gastro-intestinale, et est responsable des encéphalopathies observées chez ces malades (Davison et al., 1982; Jack

et al., 1983). Les mécanismes par lesquels l'Al est neurotoxique sont peu connus mais des études sur des rongeurs et des humains ont montré que l'Al est responsable de l'inhibition de l'activité d'une enzyme essentielle (la dihydroptéridine réductase) pour la synthèse de neurotransmetteurs ou de précurseurs des neurotransmetteurs tels que la tyrosine, la dopamine, la noradrénaline et le 5-hydroxytryptophane (Exley, 2001) et d'une altération de la neurotransmission cholinergique post synaptique (Marquis, 1983).

2. L'ostéodystrophie :

Les patients en insuffisance rénale traités par hémodialyse à long terme ont développé de l'ostéodystrophie, maladie métabolique des os, qui diffère de la forme d'ostéodystrophie rencontrée chez les patients n'ayant pas été exposés à de fortes doses d'Al. En effet, l'ostéomalacie associée à cette forme d'ostéodystrophie est progressive, associée à des myopathies, à une incidence anormalement élevée de fractures, et ne répond pas aux traitements habituels tels que le traitement par la vitamine D ou les molécules assimilées.

En 1971, Parsons et ses collaborateurs ont montré que l'augmentation de la concentration en Al dans les os des patients était proportionnelle au temps de traitement par hémodialyse (Parsons et al., 1971). En 1977, il a été mis en évidence que les patients dialysés dans les zones géographiques où l'eau présentait des taux plus élevés d'Al, avaient un nombre de fractures plus élevé que les autres (Platts et al., 1977). Une étude sur les patients en insuffisance rénale a montré qu'après 1 à 4 ans de traitement par des dialysats à base d'eau du robinet riche en Al, 70% des patients développaient une ostéomalacie. Au contraire, lorsque les dialysats étaient réalisés à base d'eau traitée et déminéralisée pour obtenir une concentration faible en Al, seulement 15% des patients développaient ces symptômes. Le mécanisme par lequel l'Al induit ces effets est mal connu.

3. L'anémie :

En 1989, Yuan et ses collaborateurs ont étudié la prévalence de l'association entre l'anémie et l'Al dans une population de patients ambulatoires hémodialysés. Cette étude a montré que l'anémie, qui se caractérise par une diminution du taux de globules rouges, était un problème pour 18% des patients hémodialysés et qu'elle se déclarait avant les autres symptômes d'encéphalopathie et d'ostéomalacie (Yuan et al., 1989). Une autre étude a également décrit

que la diminution du taux d'hémoglobine était inversement proportionnelle aux taux d'Al dans les os des patients dialysés (Bia et al., 1989). De plus, la forme d'anémie des patients souffrant d'insuffisance rénale est normochrome normocytaire, tandis que celle causée par l'Al est microcytaire et hypochrome (Wills and Savory, 1983). Tenant compte de la nature de cette anémie, O'Hare et Murnahagan ont proposé que l'Al participait à l'inhibition des enzymes responsables de la synthèse de l'hème, et notamment par l'inhibition de l'activité de l'acide 6-aminolévulinique déshydrogénase (O'Hare and Murnaghan, 1982).

Ces études montrent que l'administration d'Al à de fortes doses favorise l'émergence d'effets toxiques graves sur l'homme. En se basant sur ces données, de nombreuses études ont cherché à évaluer si l'exposition chronique à de faibles doses d'Al pouvait être impliquée dans le développement de pathologies dont les causes sont inexplicables.

II. Les pathologies où l'implication de l'aluminium est suspectée.

1. Le cancer du sein :

L'implication de l'Al dans le cancer du sein est très controversée. Les études ont montré par des expériences *in vitro* (Darbre, 2006, 2001) et *in vivo*, par des dosages de la concentration d'Al dans le fluide d'aspiration du conduit mammaire (Mannello et al., 2011) et dans la partie externe du sein en contact avec les déodorants (Exley et al., 2007), que l'Al appliqué au niveau sous axillaire est un facteur favorisant le cancer du sein. Cependant, d'autres études ne parviennent pas à mettre en évidence cette implication. Ainsi, Mirick et ses collaborateurs ont évalué, dans une étude épidémiologique, si les antitranspirants étaient un facteur de risque pour le cancer du sein. Cette étude n'a pas établi de relation entre les deux facteurs (Mirick et al., 2002). Une autre étude a comparé l'utilisation d'antitranspirants par des femmes avec ou sans cancer du sein. Les résultats ont montré que 82% des femmes en bonne santé utilisaient des antitranspirants tandis que seul 51,8% des femmes malades en utilisaient (Fakri et al., 2006). Enfin, une étude sur une population exposée à de fortes doses d'Al en vivant à proximité d'une fonderie n'a pas trouvé de corrélation entre l'exposition à l'Al et la probabilité de développer un cancer du sein (Pan et al., 2011).

Ces quelques références permettent d'illustrer l'hétérogénéité des résultats concernant l'implication de l'Al sur le développement du cancer du sein. Il existe de nombreuses autres études sur le sujet mais aucune ne définit clairement le rôle de l'Al dans cette pathologie.

2. La myofasciite à macrophages :

Le syndrome de la myofasciite à macrophages a été décrit en 1998 par Gherardi et ses collaborateurs (Gherardi et al., 1998). Les femmes représentent 70% des patients et les malades développent un ou plusieurs des symptômes suivants : des myalgies chroniques diffuses associées ou non à de l'arthralgie, des faiblesses musculaires, des fatigues chroniques, des douleurs épigastriques, des altérations cognitives affectant la mémoire et l'attention, des dyspnées (Gherardi and Authier, 2012). Ce syndrome est associé à la persistance à long terme de l'oxyhydroxyde d'Al utilisé comme adjuvant pour stimuler la réponse immunitaire en vaccination. Les biopsies du muscle deltoïde, site d'injection majeur de vaccins, ont montré un infiltrat par des macrophages contenant des cristaux d'hydroxyde d'Al (Gherardi and Authier, 2012). Les mécanismes impliqués dans cette maladie sont encore méconnus, cependant, il a été démontré que l'Al pouvait s'accumuler dans le cerveau 6 mois après l'injection. Le mécanisme impliqué semble être dépendant de CCL2, chemoattractant des monocytes, qui pourrait favoriser la translocation de l'Al du système lymphatique vers le cerveau et faciliter son effet neurotoxique (Khan et al., 2013).

3. La maladie d'Alzheimer :

La maladie d'Alzheimer se caractérise par la dégénérescence des neurones. La dégénérescence débute dans l'hippocampe puis s'étend au reste du cerveau. La prévalence de cette maladie est plus forte chez les femmes et les symptômes les plus courants sont des troubles de la mémoire à court terme, de l'orientation dans l'espace, de la perception du temps et des fonctions d'exécution motrices. Les fonctions cognitives et l'autonomie des malades se dégradent progressivement.

Deux types de lésions du cerveau sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. L'accumulation de la protéine bêta amyloïde aboutirait à la formation de plaques amyloïdes toxiques pour les cellules nerveuses et entraînerait les effets observés à long terme.

Comme pour le cancer du sein, l'implication de l'Al dans le développement de cette maladie est très controversée, mais différents aspects composent l'hypothèse selon laquelle l'Al serait impliqué. En effet, L'Al peut se lier aux phospholipides et ainsi favoriser l'agrégation du peptide β amyloïde (Verstraeten et al., 1997b), il peut stimuler la peroxydation lipidique (Toda and Yase, 1998) et réagir avec l'O_2^- pour former l'Al-O_2^- et ainsi favoriser l'oxydation des acides aminés pour former des protéines carbonylées (Exley, 2004; Sánchez-Iglesias et al., 2009; Yokel, 2000). Ces réactions aboutissent ainsi à la réduction de l'activité des enzymes anti-oxydantes telles que la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et la catalase (Chaitanya et al., 2012; Verstraeten et al., 1997a; Yuan et al., 2012). Ces perturbations du métabolisme pourraient aboutir à l'augmentation de la production de radicaux libres, l'oxydation anormale du fer, l'augmentation de la peroxydation lipidique, l'inflammation et l'apoptose neuronale pour favoriser le développement de la maladie d'Alzheimer.

Certaines études ont décrit que des taux d'Al élevés dans le cerveau sont associés avec les agrégats de protéines hyperphosphorylées présents chez les patients atteints d'Alzheimer (Perl and Moalem, 2006; Walton, 2010; Yumoto et al., 2009), et que la concentration d'Al dans le cerveau était associée positivement à la maladie d'Alzheimer (Rusina et al., 2011). Cependant, d'autres études n'ont pas confirmé ce rapport entre la concentration en Al dans le cerveau et la maladie Alzheimer (Akatsu et al., 2012; Walton, 2010). De plus, d'autres métaux tels que le cuivre, le zinc et le fer sont présents au niveau des plaques séniles et pourraient être impliqués dans les effets observés (Lovell et al., 1998).

L'Al pourrait donc favoriser la génèse ou participer au développement de la maladie d'Alzheimer dans certaines populations.

4. L'autisme et les maladies cognitives :

Comme décrit dans les paragraphes : les effets de l'aluminium en fonction de la voie d'administration et les pathologies associées à l'aluminium, de nombreuses études ont montré que l'exposition à de fortes doses d'Al entraînait des déficiences cognitives (Akila et al., 1999; Bowler et al., 2003; Flaten, 1990). Cependant, une étude a comparé les concentrations d'Al dans le sang, l'urine et les cheveux d'enfants autistes à ceux de contrôles non autistes. Aucune différence significative n'a pu être observée (Albizzati et al., 2012). De plus, les études sur le rapport entre la concentration d'Al dans l'eau et les fonctions cognitives n'ont pas établi de

relation entre le développement de troubles cognitifs et la consommation d'Al à de faibles doses (Bakar et al., 2009).

5. La maladie de Crohn :

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique du système digestif qui évolue par poussées et phases de rémission. Les principaux symptômes sont des douleurs abdominales, de la diarrhée et l'inflammation peut toucher toutes les parties du tube digestif.

L'environnement est fortement suspecté dans le développement de cette maladie. Les corrélations entre les signes cliniques des malades et les effets inflammatoires de l'Al laissent supposer que l'Al pourrait être impliqué dans le développement de cette maladie. En effet, les effets immunologiques, pro inflammatoires, apoptotiques, oxydatifs et son implication dans la formation de granulomes sont en corrélation avec les observations faites chez les patients atteints de la MC (Lerner, 2007). De plus, les expériences animales ont montré que l'Al favorisait la formation de granulomes (Fogarty et al., 1998), aggravait la colite chez la souris en augmentant la durée et l'intensité de l'inflammation, favorisait l'infiltrat inflammatoire, et diminuait la cicatrisation intestinale (Pineton de Chambrun et al., 2014). Ces observations semblent mettre en évidence le rôle de l'Al dans l'induction et le maintien des symptômes de la MC.

Les suspicions sur l'implication de l'Al dans de nombreuses pathologies sont fortes, notamment par ses propriétés inflammatoires, carcinogènes et oxydatives. Cependant, sa réelle implication n'a pu être déterminée que dans des sous groupes de patients à risque.

III. Le cas des effets de l'aluminium sur la douleur.

Dans son livre « Aluminium utensils and disease, The Dangers Inherent In the Widespread Use of the Metal » publié en 1967, H. Tomlinson décrit les premières observations des effets secondaires de l'Al (Tomlinson, 1967). Ainsi, en 1930 une étude américaine visant à établir la meilleure méthode pour préparer du café décrit que certaines personnes développent des symptômes abdominaux lorsque le café est préparé dans une cafetière en Al. En 1932, le Dr E Pritchard a publié un article dans le British Medical Journal associant la consommation d'Al avec l'apparition de diarrhées chez l'enfant et le chien. Deux autres articles des Dr E. H. Rink et A. France, parus la même année, décrivent des douleurs abdominales associées à

l'intoxication par l'Al. De ses propres travaux, Le Dr Tomlinson décrit que les organes viscéraux de la bouche à l'anus sont les plus affectés par l'Al. Il observe des douleurs et de l'inconfort du duodénum, des phases de diarrhées et de constipations entrecoupées par des périodes de rémission, des rectocolites hémorragiques et des migraines. Les études de cas sur les patients montrent que les malades développent des douleurs de la vésicule biliaire, du duodénum, de la dyspepsie, des maux de dos et d'autres symptômes qui ne sont pas directement associés à la douleur. Dans ces différentes études, l'arrêt de l'Al améliore les symptômes des patients. Bien que ces études n'utilisent pas les mêmes méthodes d'analyse qu'aujourd'hui, la description de la distribution de l'Al dans les différents organes et les observations sur le microbiote sont en corrélation avec ce que nous observons actuellement.

Etonnamment, aucune étude ultérieure n'a évalué les effets de l'Al sur le tube digestif et ce n'est que de nombreuses années plus tard que les effets néfastes de l'Al ont été décrits.

Les études chez les patients en insuffisance rénale ont mis en évidence le rôle de l'Al dans de nombreuses pathologies dont l'ostéomalacie. Ainsi, les patients développaient des symptômes variés comme des douleurs osseuses généralisées ou localisées principalement au niveau des hanches, du dos, des pieds et des chevilles et des faiblesses musculaires notamment au niveau des membres supérieurs (Coburn and Norris, 1986).

La parathyroïdectomie précoce semble également être un facteur de risque important de développer des maladies osseuses liées à l'Al. En 2014, Cheng et ses collaborateurs ont mesuré les taux d'Al dans le sérum des patients ayant subi une parathyroïdectomie et ont évalué les symptômes en fonction de la concentration en Al dans le sérum. Ainsi, après chirurgie, les malades avec des taux d'Al élevés présentaient une proportion plus importante de symptômes résiduels tels que des douleurs osseuses, de la difficulté pour sortir d'une voiture et des démangeaisons par rapport aux patients avec des taux faibles. Dans cette étude, aucune différence significative n'a été observée au niveau des douleurs abdominales, articulaires, des maux de tête et de la faiblesse musculaire (Cheng et al., 2014).

Des douleurs liées à l'exposition chronique à l'Al ont également été décrites chez des sujets sains. Ainsi, deux études indépendantes ont décrit des phénomènes douloureux causés par des expositions chroniques à l'Al chez la femme. L'étude de Woodson décrit l'apparition progressive de faiblesses musculaires, de douleurs généralisées aux membres et au dos, et de malabsorption intestinale, causées par l'ingestion inappropriée d'antiacides oraux (Woodson, 1998). L'étude de Guillard et de ses collaborateurs réalisée en 2004, décrit quant à elle des

douleurs osseuses et de la fatigue causées par l'accumulation de sels d'Al provenant des déodorants (Guillard et al., 2004).

Dans l'industrie pharmaceutique, l'Al est également largement utilisé comme adjuvant pour les vaccins. Différentes études ont évalué l'efficacité et les effets secondaires des vaccins avec ou sans adjuvant aluminique. Les principales réactions observées au site d'injection de vaccins contenant un adjuvant aluminique sont des douleurs locales (Precioso et al., 2011; Zhu et al., 2009) et l'augmentation de la sensibilité à la douleur (Brady et al., 2009). Dans certains cas, l'Al peut persister plusieurs années au site d'injection et mener au syndrome de la myofasciite à macrophages. Ces malades développent de nombreux symptômes tels que des myalgies diffuses, de l'arthrite, des douleurs épigastriques, de la fatigue chronique, des maux de tête et des altérations cognitives (Gherardi et al., 1998; Gherardi and Authier, 2012).

Enfin, les taux d'Al semblent particulièrement élevés chez certains patients atteints de cancer et souffrants de neuropathies. Ainsi, dans une étude sur les effets de l'oxaliplatine (médicament anti-cancéreux) sur les neuropathies, le rôle de cette molécule et du chlorure d'Al sur la sensibilité à la température a été évalué par des tests comportementaux d'hyperalgésie thermique et d'allodynie au froid (Park et al., 2015). Les auteurs ont montré que le traitement par l'Al favorisait l'augmentation de la sensibilité à l'allodynie causée par le froid après 14 et 30 jours de traitement et que cet effet était exacerbé lorsque l'Al était couplé avec l'oxaliplatine. L'augmentation de la concentration en Al associée à l'augmentation de l'expression en ARNm de Trpa1 a également été montrée dans les ganglions rachidiens des souris. Ainsi, l'injection de chlorure d'Al et/ou d'oxaliplatine perturbe le comportement des animaux en accord avec l'activation de TRPA1 et l'apparition de neuropathies périphériques. Les auteurs suggèrent que le traitement par l'oxaliplatine favorise l'accumulation progressive d'Al dans les ganglions rachidiens, et que l'hyperalgésie au froid pourrait augmenter proportionnellement à cette accumulation (Park et al., 2015).

Ces observations semblent associer l'Al à l'apparition de douleurs locales ou généralisées dépendantes de la voie d'administration. Nous allons voir maintenant que d'autres publications décrivent des phénomènes douloureux dans des environnements riches en Al, mais sans étudier le lien de cause à effet.

Le phosphore d'Al est un pesticide particulièrement utilisé dans les pays en voie de développement et peut également être ingéré intentionnellement en cas de suicide. Il est ainsi responsable de nombreuses morts par empoisonnement (Mehrpour et al., 2012). Bien que le pouvoir létal soit associé à la phosphine, gaz toxique formé en présence de moisissures ou d'acide, les mécanismes d'action de ce poison sont aujourd'hui encore mal connus. Les patients

intoxiqués par le phosphore d'Al développent de nombreux symptômes, principalement gastro-intestinaux, avec des douleurs abdominales et épigastriques sévères, des vomissements et de la dysphagie (Mehrpour et al., 2012). Bien que ces symptômes puissent être associés à la phosphine, l'implication de l'Al n'a pas été évaluée dans ces cas.

De même, les études sur les troubles musculo squelettiques (TMS) décrivent une forte prévalence de cette maladie dans l'industrie de l'Al par rapport à la population générale et au personnel travaillant dans d'autres types d'industries. De plus, la proportion de femmes qui développent des TMS dans cette industrie est plus élevée que celle des hommes (Morken et al., 2000). Ces études se sont focalisées sur les difficultés physiques et psychologiques à travailler dans ce type d'industrie et non sur les agents toxiques environnementaux rencontrés. Cependant, l'association entre la forte incidence des TMS et la durée de l'emploi suggère l'implication de l'environnement de travail, plutôt physique dans cette publication, mais rien ne permet d'exclure l'exposition chronique à l'Al comme facteur favorisant les TMS (Ljiljana Kezunović, 2004).

Ainsi, même si dans certains cas, l'Al n'est pas directement mis en cause, les divers rapports et expérimentations décrits ici semblent associer l'Al à de nombreux symptômes douloureux et favoriser l'apparition de certaines pathologies. Nous avons donc choisi d'étudier les effets de l'Al sur la sensibilité viscérale et plus particulièrement dans une pathologie où l'hypersensibilité viscérale joue un rôle prépondérant : le syndrome de l'intestin irritable.

Le syndrome de l'intestin irritable : mécanismes, causes et conséquences.

Définitions de la douleur, du syndrome de l'intestin irritable, et description de ses critères diagnostiques.

I. Le syndrome de l'intestin irritable

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est défini comme un trouble fonctionnel chronique et récidivant du système gastro-intestinal (GI) décrit pour la première fois en 1918. Le terme « trouble fonctionnel » désigne l'absence de toute maladie organique, ou de perturbation structurale, biochimique favorisant les symptômes. Le SII se caractérise par des douleurs abdominales et/ou de l'inconfort associés à une perturbation de la forme et de la fréquence des selles. En l'absence de cause organique décelable, la définition de ce syndrome dépend des critères diagnostiques basés sur les symptômes. Ceux-ci surviennent le plus souvent de manière épisodique. Les douleurs abdominales ou l'inconfort, améliorés par la défécation, indiquent une possible origine colique des symptômes. L'apparition de la douleur associée à une perturbation de la forme et de la fréquence des selles est caractéristique de la modification du temps de transit intestinal, supposant la perturbation des fonctions motrices et sécrétoires intestinales. Le SII est une maladie bénigne sans augmentation de la mortalité, cependant il réduit la qualité de vie des malades de façon similaire à d'autres maladies organiques telles que les reflux gastro-œsophagien, l'asthme ou la migraine.

1. Les critères diagnostiques

Le SII est défini par les critères diagnostiques se basant sur les symptômes. L'établissement du diagnostic est difficile en raison des symptômes communs aux autres troubles gastro-intestinaux, tels que la maladie cœliaque, l'insuffisance pancréatique exocrine, ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Avant d'établir des critères diagnostiques, le diagnostic était basé sur l'exclusion des autres maladies organiques aux symptômes similaires par de multiples examens cliniques. Pour permettre une reconnaissance du SII comme une maladie à part entière basée sur des critères reproductibles, en 1978, Manning et ses collaborateurs ont déterminé les 6 symptômes rencontrés le plus fréquemment dans le SII. Ce premier rapport était principalement basé sur l'observation de la douleur et non

sur la fréquence et la durée des symptômes (Selles plus molles et plus fréquentes lors de l'apparition de la douleur, douleurs soulagées par la défécation, ballonnement abdominal visible, mucus dans les selles, sensation d'évacuation incomplète) (Manning et al., 1978).

Les premiers critères de Rome pour le diagnostic du SII ont été publiés en 1989 (Thomson et al., 1989). Le SII a été défini comme «un trouble gastro-intestinal fonctionnel des intestins et associé aux symptômes suivants: (a) des douleurs abdominales, et / ou (b) des perturbations de la défécation, et / ou (c) des ballonnements ou de la distension (Thomson et al., 1989). Dans les critères de Rome I, la douleur abdominale est un critère obligatoire pour l'établissement du diagnostic.

En 1999, les critères de Rome I ont été revus pour donner lieu aux critères de Rome II. La notion d'inconfort a été ajoutée à la «douleur», et la durée des symptômes a été prolongée de 3 à 12 mois, avec une douleur ou un inconfort abdominal présent pendant au moins 12 semaines, pas obligatoirement consécutives (Drossman et al., 1999).

En 2006, les critères de Rome II ont été revus à nouveau pour mener à la publication des critères de Rome III utilisés actuellement. Les malades doivent avoir souffert de douleurs abdominales ou d'inconfort digestif pendant au moins 3 jours par mois durant les 3 derniers mois (au lieu de 12 mois) en association avec au moins 2 des critères suivants : une amélioration de la douleur par la défécation, une modification de la fréquence des selles et/ou une modification de la consistance des selles évaluée selon l'échelle de Bristol (figure 6). En outre, les symptômes doivent s'être déclarés au moins 6 mois avant la consultation clinique afin d'établir la nature chronique des symptômes (cf annexe 1 : Fiche récapitulative des différents critères diagnostiques du syndrome de l'intestin irritable).

La fréquence des selles est anormale lorsqu'elle est supérieure à 3 fois par jour ou inférieure à 3 fois par semaine

Ainsi, trois sous-groupes sont définis à partir des caractéristiques des selles :

- Le syndrome de l'intestin irritable avec diarrhée (SII-D) (Selles défaites >25% du temps (Bristol 6-7) et selles dures <25% du temps (Bristol 1-2), Fréquence plus élevée chez les hommes et prévalence jusqu'à un tiers des cas.

- Le syndrome de l'intestin irritable avec constipation (SII-C) (Selles dures >25% du temps (Bristol 1-2) et selles molles <25% du temps (Bristol 6-7), Fréquence plus élevée chez les femmes et prévalence jusqu'à un tiers des cas).

-Le syndrome de l'intestin irritable avec alternance de diarrhée et de constipation (SII-M)
(Selles dures et molles >25% du temps, prévalence d'un tiers à la moitié des cas)

En 2016 seront publiés les critères de Rome IV.

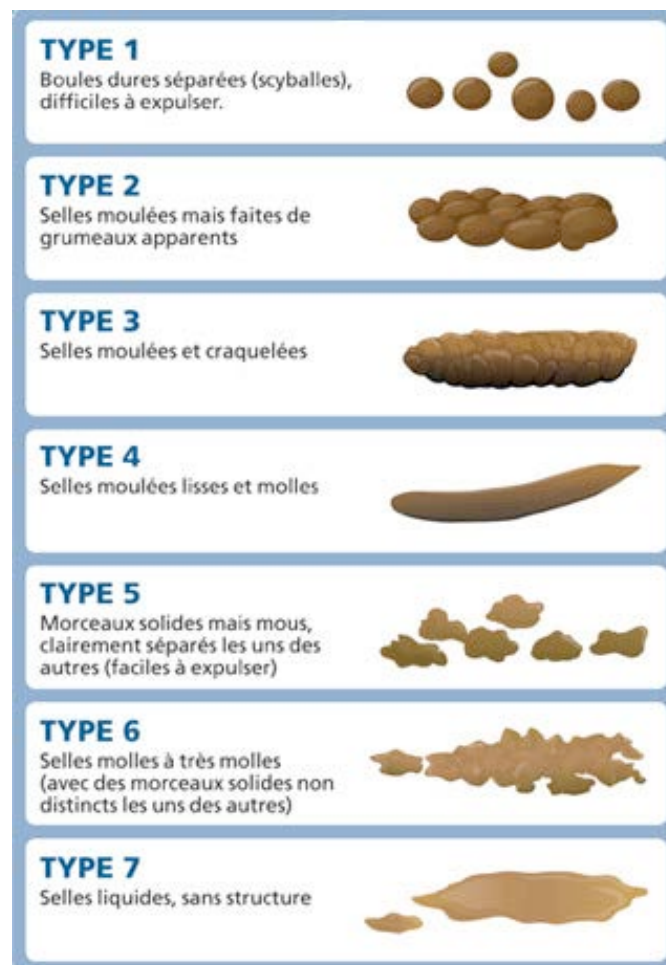


Figure 6 : Echelle de Bristol (d'après Heaton et al., *Gut*. 1992)

2. Les autres symptômes du SII.

De nombreux autres symptômes communs aux patients atteints de SII ont été décrits mais ne font pas partie des critères diagnostiques actuels tels que les douleurs épigastriques, nausées, vomissements, perte de poids, et la satiété précoce (Agréus et al., 1995; Corsetti et al., 2004; Holtmann, 2004; Locke et al., 2005).

Le SII est également associé à des symptômes extra intestinaux récurrents. Ils se caractérisent par des troubles psychiatriques (dépression, anxiété, troubles somatoformes) (Bonavita and De Simone, 2008; Drossman, 1998; Gwee et al., 1999) et non psychiatriques (fibromyalgie, syndrome de fatigues chroniques, troubles de l'articulation temporo-mandibulaire, douleurs pelviennes chroniques, léthargie, maux de tête et de dos, troubles génitaux) (Hershfield, 2005; Johansson et al., 2010; Riedl et al., 2008). Ces nombreux troubles extra intestinaux sont en faveur d'une comorbidité importante chez les patients atteints du SII et doivent être pris en compte pour améliorer les options préventives et thérapeutiques des patients.

Les symptômes les plus récurrents du SII sont principalement décrits et associés à des phénomènes douloureux, mais qu'est ce que la douleur exactement ?

II. Définition de la douleur :

L'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) définit la douleur comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en termes de telles lésions. » (Merskey and Bogduk, 1994). La douleur est une sensation désagréable individuelle, subjective, qui inclut une composante émotionnelle. L'état psychologique, la culture et l'histoire de l'individu modifient la perception de la douleur. La sensation désagréable est définie comme une douleur indépendante de causes et de lésions tissulaires identifiables (Aydede, 2013).

Ainsi, on peut distinguer quatre catégories de douleurs :

-Les douleurs neuropathiques associées à des lésions nerveuses périphériques ou centrales favorisant des douleurs spontanées et continues.

-Les douleurs nociceptives associées à une nociception excessive, induites par les voies neurophysiologiques impliquées dans les phénomènes douloureux. Il s'agit de la voie la plus courante. Un stimulus pathologique périphérique active les mécanismes sensoriels (les nocicepteurs) qui transmettent l'information vers la moëlle épinière et le cortex.

-Les douleurs psychogènes qui sont associées à des désordres psychologiques (dépression, traumatisme).

-Les douleurs idiopathiques qui correspondent à un syndrome douloureux pour lequel aucune cause organique ni lésion n'a pu être mise en évidence. Actuellement, le SII peut être classé dans cette catégorie.

On peut alors distinguer la douleur aiguë de la douleur chronique. La douleur aiguë est induite par une maladie spécifique ou une blessure. Sa durée est inférieure à 3 mois et joue un rôle majeur pour réduire et anticiper les risques de dommage tissulaire. La douleur chronique, dont la durée est supérieure à 3 mois, persiste ou progresse au cours du temps. Elle est considérée comme un état pathologique sans fonction physiologique (Grichnik and Ferrante, 1991).

Les patients atteints de SII développent une hypersensibilité viscérale dans la majorité des cas (Azpiroz, 2002; Azpiroz et al., 2007; Ludidi et al., 2012; Posserud et al., 2007). L'hypersensibilité est définie comme une réponse exagérée du corps à un stimulus. Dans la pratique clinique actuelle, l'hypersensibilité viscérale est étudiée par des stimuli mécaniques appliqués dans la lumière intestinale. Elle se réfère donc à une augmentation de la perception des stimuli mécaniques au niveau de la lumière intestinale perçue comme de la douleur ou de l'inconfort.

L'hypersensibilité se distingue généralement en 2 composantes (figure 7):

-L'allodynie qui définit des sensations de douleurs augmentées en réponse à des stimuli physiologiques habituellement non douloureux (diminution du seuil de perception de la douleur)

-L'hyperalgésie qui définit une augmentation de l'intensité de la sensation douloureuse en réponse à des stimuli douloureux.

L'étude des symptômes des patients atteints par le SII a permis d'établir les critères diagnostiques de Manning et de Rome. Sur la base de ces critères, de nombreuses études

épidémiologiques ont été réalisées pour essayer de mieux comprendre les facteurs pouvant influencer le développement du SII.

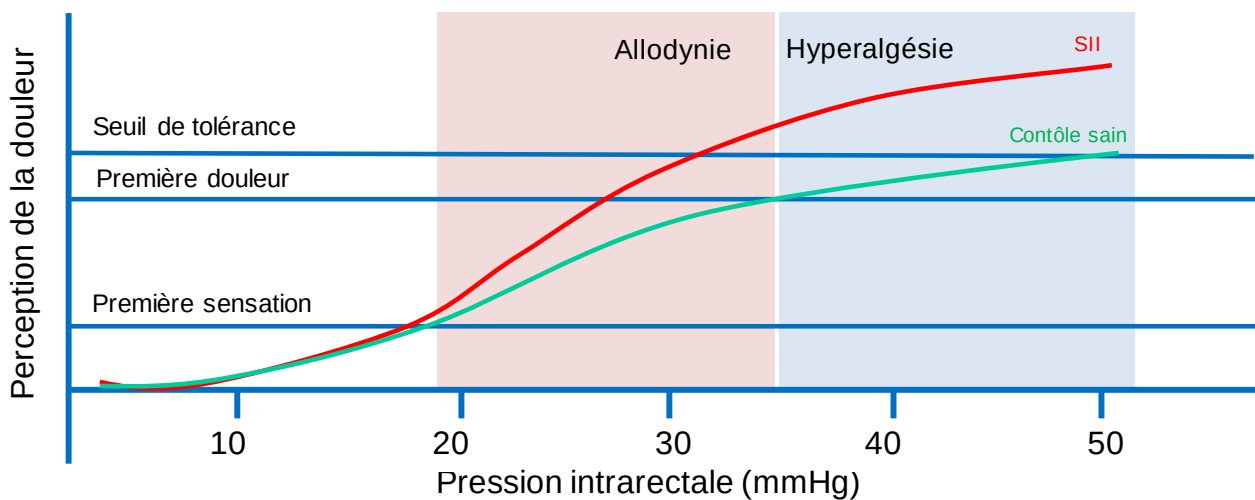


Figure 7 : Diagramme représentant la sensibilité viscérale ressentie par des volontaires sains ou des patients atteints par le syndrome de l'intestin irritable en réponse à une distension colorectale. La distension colorectale permet d'évaluer le seuil de perception de la douleur. La première sensation correspond au seuil auquel la pression est ressentie sans nécessairement induire une douleur. La première douleur correspond au seuil auquel la pression induit la première douleur ressentie. Enfin, le seuil de tolérance à la douleur correspond au niveau de pression auquel l'expérience doit être stoppée en raison d'une augmentation de la perception de la douleur. L'allodynie est une douleur causée par un stimulus habituellement non douloureux tandis que l'hyperalgésie est une réponse exagérée à une stimulation habituellement douloureuse. (D'après Keszthelyi et al., *Eur J Pain*. 2012)

Epidémiologie du syndrome de l'intestin irritable

Le diagnostic du SII peut varier en fonction des critères utilisés pour le déterminer (Manning, Rome II ou Rome III). Les résultats des études épidémiologiques varieront également en fonction des critères utilisés (Ford and Talley, 2012; Quigley et al., 2006; Spiegel et al., 2010).

I. Incidence

Les symptômes du SII sont courants au sein de la population et ne nécessitent généralement pas de soins médicaux, par conséquent il peut exister de fortes variations entre la date des premiers symptômes et celle du diagnostic établi par le médecin (Hungin et al., 2005). Ainsi, il existe peu d'études calculant l'incidence du SII. Cependant, une étude américaine, se basant sur la prévalence du SII dans une même cohorte à 14 mois d'intervalle a montré une incidence de 67 pour mille en se basant sur les critères de Manning (Talley et al., 1992).

II. Prévalence

La majorité des études sur la prévalence du SII a été réalisée en Europe, Asie du sud et en Amérique du Nord. La prévalence estimée par les différentes études varie entre 10% et 25% de la population en fonction du pays étudié (figure 8) (Agréus et al., 1995; Drossman et al., 1993; Goodwin et al., 2013; Heaton et al., 1992; Hungin et al., 2005; Husain et al., 2008; Jones and Lydeard, 1992; Thompson et al., 2002; Wilson et al., 2004). La prévalence internationale du SII est quant à elle estimée à 11,2% de la population avec des variations en fonction des régions. La plus faible est retrouvée en Asie du Sud avec 7% de la population et la plus élevée en Amérique du Sud avec 21% de la population (Lovell and Ford, 2012a).

Les données épidémiologiques varient en fonction de plusieurs critères. Ainsi, la plus forte prévalence est rapportée lorsque ce sont les critères de Manning qui sont employés (Mearin et al., 2001; Saito et al., 2000), et les plus faibles lors de l'utilisation des critères de Rome (Saito et al., 2000). L'hétérogénéité de la prévalence dans le monde peut également être impactée par l'accessibilité aux soins (Grundmann and Yoon, 2010; Haas et al., 2004) et l'acceptation du diagnostic (Quigley et al., 2006). Enfin, de nombreux malades ne consultent

pas pour leurs symptômes. La proportion des malades consultant est estimée à 50% en Italie, 30% aux Pays Bas, 20% en Belgique et 10% en Suisse, France et Espagne (Hungin et al., 2003).

Dans les pays occidentaux, la proportion de femmes atteintes par le SII est 2 à 3 fois supérieure à celle des hommes (Drossmann et al., 1990; Kennedy et al., 1998; Manning et al., 1978). Cependant, cette prévalence n'est pas observée en Asie du Sud, Amérique du Sud et Afrique (Lovell and Ford, 2012b). Des études épidémiologiques approfondies dans les différentes régions du monde sont nécessaires pour élucider les interactions complexes entre les facteurs génétiques, environnementaux, psychologiques et culturels contribuant à l'influence du genre sur le SII. De plus, les femmes développent majoritairement le SII associé à la constipation tandis que les hommes développent majoritairement le SII associé à la diarrhée (Lovell and Ford, 2012b).

Le SII se développe à tout âge, de l'enfance aux personnes âgées. Aucune différence n'a été observée dans la fréquence d'apparition en fonction de l'âge (Y.-R. Tang et al., 2012). Cependant, 50% des patients déclarent avoir eu les 1^{er} symptômes avant 35 ans (Maxwell et al., 1997), et la prévalence diminue chez les personnes âgées de plus de 50 ans (Lovell and Ford, 2012a). Cette observation suggère qu'il peut y avoir une rémission des symptômes au cours du temps et indique que le SII n'est pas incurable. Les patients âgés de 50 ans rapportent des douleurs moins sévères mais une qualité de vie plus impactée (Y.-R. Tang et al., 2012).

Une étude de Drossman et de ses collaborateurs a suggéré que le SII et de nombreux symptômes gastro-intestinaux étaient associés à un statut socioéconomique bas (Drossman et al., 1993). Cette observation est supportée par l'hypothèse selon laquelle des revenus faibles sont associés à une mauvaise hygiène de vie, à l'absence d'accès aux soins adéquats et à l'augmentation du stress dès le plus jeune âge (Marmot et al., 2012). Au contraire, d'autres études suggèrent que la prévalence est plus importante dans les classes socioéconomiques élevées durant l'enfance (Howell et al., 2004; Mendall and Kumar, 1998). De plus, la prévalence du SII est plus faible dans les zones de travail manuel en comparaison des populations à responsabilités professionnelles et managériales impliquant ainsi un possible effet du stress (Grodzinsky et al., 2012). L'augmentation de la prévalence du SII dans un environnement socioéconomique fort est en faveur de l'implication de l'industrialisation et de l'urbanisation dans le développement du SII, et est corrélée avec l'augmentation de la prévalence du SII dans les pays émergents d'Asie, d'Amérique du Sud et d'Afrique (Gwee, 2005). Ces observations soutiennent également le fait que les individus aux revenus plus élevés ont un accès aux soins plus évident, facilitant le diagnostic (Cremonini and Talley, 2005). Cela

pourrait également refléter la modification du mode de vie des populations urbaines associée au changement des habitudes alimentaires (Hulshof et al., 2003).

Encore aujourd'hui, les études épidémiologiques n'ont pas su mettre en avant les facteurs impliqués dans cette maladie.

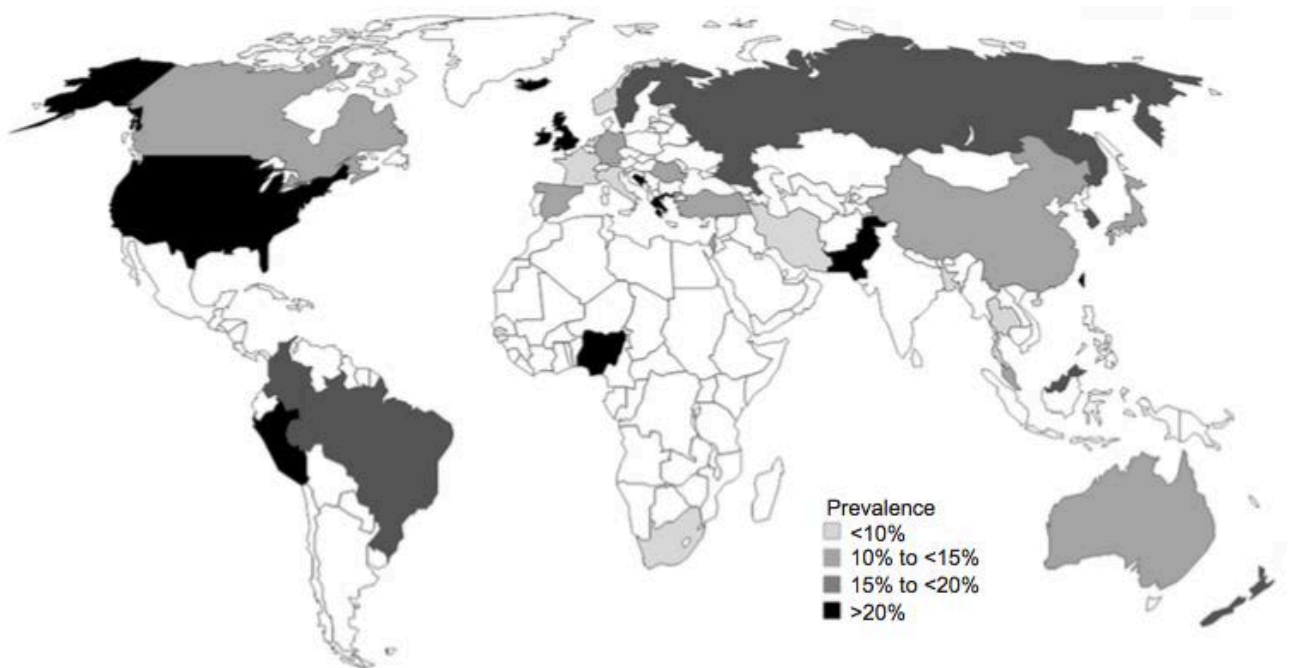


Figure 8 : Estimation globale de la prévalence du syndrome de l'intestin irritable dans le monde. Les estimations de la prévalence du SII varient fortement à l'échelle internationale, à la fois au sein et entre les pays. Cette carte prend en compte l'hétérogénéité des résultats entre les études se basant sur les différents critères diagnostiques (d'après Canavan *et al.*, *Clin Epidemiol.* 2014).

La physiopathologie du syndrome de l'intestin irritable.

La pathogénèse de la maladie n'est pas déterminée et semble multifactorielle. De nombreux facteurs sont suspectés, et notamment des fonctions motrices intestinales anormales, une hypersensibilité viscérale, une réponse nerveuse perturbée, des infections bactériennes, une inflammation à bas grade, des altérations du microbiote, des mutations génétiques.

I. Les troubles de la motilité gastro-intestinale dans le SII.

La motilité gastro-intestinale permet le déplacement du bol alimentaire de la bouche jusqu'à l'anus. Différentes variations de la motilité intestinale ont été mises en évidence chez les patients souffrant du SII. Ainsi, dans le SII-D, on observe une augmentation de la motilité colique associée à des contractions de forte amplitude et une accélération du transit (Cann et al., 1983; Chey et al., 2001; Vassallo et al., 1992; Whitehead et al., 1980). Tandis que dans le SII-C, on observe une diminution de la motilité associée à des contractions faibles et un transit retardé (Bassotti et al., 2003; Bazzocchi et al., 1990; Cann et al., 1983; Stivland et al., 1991; Whitehead et al., 1980). Les patients développent également une réponse motrice exagérée lors d'un stress émotionnel (Welgan et al., 1988), d'une exposition à des hormones impliquées dans la réponse au stress et la motilité intestinale telles que la corticolibérine (CRH) (Fukudo et al., 1998) et la cholécystokinine (CCK) (Chey et al., 2001; Harvey and Read, 1973) et lors d'une distension colorectale (Whitehead et al., 1980). Cependant les mécanismes impliqués dans ce phénomène ne sont pas déterminés.

II. L'hypersensibilité viscérale dans le SII.

L'hypersensibilité viscérale est observée dans 30 à 70% des patients atteints par le SII, et est considérée comme l'un des facteurs diagnostiques majeurs (Azpiroz, 2002; Azpiroz et al., 2007; Ludidi et al., 2012; Posserud et al., 2007). Chez l'Homme et l'animal, la sensibilité viscérale est généralement évaluée à l'aide d'un barostat capable de gonfler et dégonfler un ballon placé dans le rectum ou l'intestin (Hammer et al., 1998).

Les causes exactes de l'hypersensibilité viscérale sont inconnues, cependant les mécanismes de la sensibilité périphérique et centrale semblent impliqués dans la perception de la douleur (Keszthelyi et al., 2012). Comme décrit dans le phénomène d'hyperalgésie post-inflammatoire (Hughes et al., 2009; Vergnolle, 2010), la sensibilisation intestinale post-inflammatoire des patients atteints de SII pourrait être un facteur local majeur contribuant à l'hypersensibilité viscérale (Mayer and Gebhart, 1994). L'altération de la barrière intestinale par l'inflammation pourrait favoriser l'exposition de la sous muqueuse à des antigènes et des médiateurs inflammatoires provenant de la lumière intestinale pour activer les terminaisons nerveuses sensibles situées dans la muqueuse et la sous muqueuse de l'intestin (Dai et al., 2012; Zhou et al., 2010). En corrélation avec cette hypothèse, une augmentation de la perméabilité a déjà été montrée chez les patients atteints de SII-D (Zhou et al., 2009).

Les études animales ont montré l'implication de différents facteurs sur le développement de l'hypersensibilité. Ainsi, des médiateurs inflammatoires comme l'histamine et la tryptase semblent favoriser l'hyperalgésie intestinale (Barbara et al., 2007; Bueno et al., 1997; Spiller et al., 2000). Des pathogènes et bactéries commensales intestinales peuvent exciter les afférences nerveuses ou influencer sur le système immunitaire pour moduler la nociception viscérale (Al-Khatib and Lin, 2009; Rescigno, 2011). Des perturbations du système endocrinien digestif peuvent également favoriser l'hypersensibilité viscérale chez certains patients atteints par le SII (Zhou and Verne, 2011).

III. L'inflammation dans le SII.

L'apparition du SII à la suite d'une infection a été décrite pour la 1^e fois en 1962 (Chaudhary and Truelove, 1962). Les études ultérieures ont montré que les gastro-entérites bactériennes causées par *Salmonella*, *Shigella* ou *Campylobacter* étaient des facteurs de risque de développer un SII Post Infectieux (SII-PI) (Marshall, 2009; McKendrick and Read, 1994; Spiller et al., 2000). Une étude sur une cohorte de 2069 sujets suivis pendant 2 ans, a montré que l'incidence du SII-PI augmentait de 10,1% dans une population contrôle à 36,2% dans une population atteinte par un épisode de gastro-entérite aiguë causé par de l'eau contaminée par *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* et d'autres pathogènes (Marshall, 2009). D'autres facteurs de risque de développer un SII-PI ont été mis en évidence, tels que la durée de la gastro entérite, la fumée de cigarette (Parry and Forgacs, 2005) et être de sexe féminin (G. Barbara et al., 2004; Neal et al., 1997).

1. Implication des mastocytes dans le SII.

Les mastocytes sont des cellules de l'immunité innée produites par les cellules pluripotentes au niveau de la moelle épinière. Ils sont généralement localisés au niveau des nerfs et des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Lorsqu'un ligand active les récepteurs de surface du mastocyte, les granules sécrétoires présentes dans son cytoplasme libèrent leur contenu, principalement de l'histamine, des prostaglandines, des cytokines et des protéases telles que la tryptase et la chymase (figure 9).

En 1962, Hiatt et ses collaborateurs ont décrit une augmentation du nombre de mastocytes au niveau de la musculature des pièces opératoires de côlon de patients atteints de

SII (Hiatt and Katz, 1962). Depuis, de nombreuses études sont venues agrémentées l'hypothèse de l'implication d'une inflammation à bas grade dans le SII. Elles ont mis en évidence, une augmentation des mastocytes dans les biopsies d'iléon terminal (Wang et al., 2004, 2007; Weston et al., 1993), à proximité des terminaisons nerveuses entériques (Giovanni Barbara et al., 2004), dans la muqueuse caecale (O'Sullivan et al., 2000; Park et al., 2003) et dans le côlon descendant (Giovanni Barbara et al., 2004) des patients atteints du SII par rapport aux patients contrôles. Ces malades présentent également une augmentation du nombre de mastocytes activés en corrélation avec une augmentation du relargage de la tryptase et de l'histamine.

Actuellement, les résultats qui impliquent directement les mastocytes dans le SII divergent. Cependant, la plupart des études ont tendance à montrer une augmentation du nombre et de l'activation des mastocytes chez les patients atteints de SII-D (Gecse et al., 2008; Lee et al., 2013, 2008; Róka et al., 2007). Les observations, notamment sur la proximité entre les mastocytes et les terminaisons nerveuses, suggèrent que l'activation des fibres nerveuses par les mastocytes est augmentée. De plus, le rôle de la tryptase et de l'histamine sur l'activation des neurones entériques est aujourd'hui en partie décrit et peut mener à des sécrétions anormales et à l'hypersensibilité viscérale, notamment par l'activation des récepteurs PAR (Cenac, 2011; Quigley, 2013).

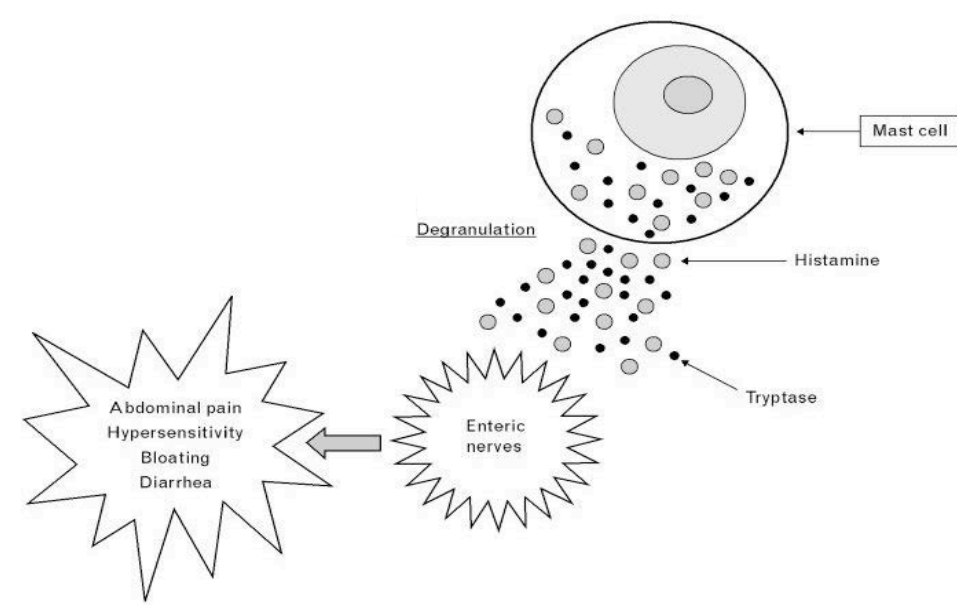


Figure 9 : Implication des mastocytes dans les symptômes du syndrome de l'intestin irritable. L'activation des mastocytes est à l'origine de leur dégranulation. La tryptase et l'histamine relarguées interagissent avec les nerfs du système nerveux entérique et peuvent favoriser l'apparition de certains symptômes du SII. (d'après Chang *et al. Current Opinion in Gastroenterology* 2011)

2. Implication des cellules entérochromaffines et de la sérotonine dans le SII.

Les cellules entérochromaffines (CE) sont localisées dans la muqueuse intestinale. Ces cellules synthétisent, stockent et relarguent la sérotonine (5-HT). Elles jouent un rôle important dans la sécrétion, la motilité et la sensibilité de l'intestin, notamment par l'activation des neurones sensitifs intrinsèques et extrinsèques qui contrôlent le péristaltisme intestinal, les sécrétions et la transmission des informations au système nerveux central (Spiller, 2007).

Différentes études ont montré une augmentation du nombre de CE dans les biopsies rectales de patients atteints de SII-PI (Dunlop et al., 2003a, 2003b; Spiller et al., 2000). Cependant, aucune différence n'a été observée chez les patients SII non PI. Après infection par *C. jejuni*, le nombre des CE dans les biopsies rectales peut être multiplié par cinq la semaine suivant l'infection puis diminue progressivement au cours du temps à 6 et 12 semaines (Spiller et al., 2000). Néanmoins, dans cette étude, un sous groupe de patients dont les symptômes persistaient 1 an après l'infection, présentait toujours des taux anormalement élevés de CE. Une étude plus récente de Cremon et collaborateurs a également montré une augmentation du nombre de CE et de mastocytes, de libération de la 5-HT pour les patients atteints de SII par rapport à des sujets contrôles. De plus, le taux de 5-HT muqueux relargué était corrélé à la sévérité des symptômes abdominaux, notamment pour les patients atteints de SII-D par rapport aux patients SII-C (Cremon et al., 2011). L'analyse des taux de 5-HT en période post prandiale a montré une diminution des taux de 5-HT dans le plasma des patients atteints de SII-C, tandis que ce taux était augmenté chez les patients atteints de SII-D à jeun ou non (Atkinson et al., 2006; Bearcroft et al., 1998; Houghton et al., 2003).

Le traitement par un antagoniste du récepteur à la sérotonine 5-HT₃, l'alosetron, augmente le seuil de sensibilité des patients SII-D lors de la distension colorectale (Delvaux et al., 1998), tandis qu'un agoniste du récepteur 5-HT₄, le tegaserod, améliore les symptômes de SII-C (Ford et al., 2009).

A la vue des multiples effets de la 5-HT sur les sécrétions, la motilité et la sensibilité du tractus gastro-intestinal, les altérations de ce système sont en faveur de l'implication du système sérotoninergique dans la physiopathologie du SII. Ainsi, l'expression des récepteurs à la 5-HT sur les nerfs entériques et les afférences sensorielles (De Ponti and Tonini, 2001; Kapraali et al., 1999), la présence du récepteur 5-HT₂ sur les cellules endothéliales vasculaires (Dunlop et

al., 2003b), les effets prokinétiques et sécrétoires (Dunlop et al., 2003b; Kapraali et al., 1999), sont en faveur de l'implication de la 5-HT dans les douleurs, les diarrhées et selles molles observées chez les patients atteints de SII.

3. Cellules inflammatoires dans le SII.

Le SII est associé dans certains cas à une augmentation de l'infiltrat inflammatoire de la muqueuse colique des patients, et notamment par les lymphocytes T au niveau de la *lamina propria* et dans les cryptes de l'épithélium intestinal (Chadwick et al., 2002; Dunlop et al., 2003a, 2003b; Gwee et al., 1999; Spiller et al., 2000). L'augmentation des lymphocytes T est retrouvée chez les patients atteints de SII-PI et SII non PI et tendent à être plus nombreux dans la muqueuse des patients SII-D par rapport aux SII-C (Chadwick et al., 2002). Des études datant de 2009 ont montré une augmentation des lymphocytes T mais aussi des lymphocytes B chez les patients atteints de SII non PI (Cremon et al., 2009; Lena Ohman et al., 2009; L. Ohman et al., 2009). Ces observations sont en corrélation avec l'hypothèse que le SII est associé à une inflammation à bas grade participant à la génération des symptômes (Barbara, 2006). Cependant, seul 50% des patients ont une infiltration par les cellules immunitaires, et bien que certaines études montrent une augmentation de l'expression d'IL1 β pour les patients atteints par le SII-PI (Wang et al., 2004), d'autres études n'observent pas de différence immunologique entre les malades et les contrôles sains (El-Salhy et al., 2013). Ainsi, l'inflammation à bas grade pourrait être impliquée dans les perturbations de la perméabilité et la sensibilité gastro-intestinale. Or, comme décrit par El Salhy, ces études ne prennent pas en compte les antécédents de gastro-entérites infectieuses des patients SII non PI.

4. Le système nerveux entérique dans le SII.

Le système nerveux entérique (SNE) a un rôle majeur dans le contrôle de la motilité, la régulation de la circulation sanguine intestinale, l'échange et la sécrétion de fluide au travers de la barrière intestinale. Il est capable de coordonner les réflexes viscéraux de manière autonome.

Une augmentation du nombre de fibres nerveuses, exprimant l'énolase, la substance P et la 5-HT, a été mise en évidence dans les biopsies d'iléon terminal et de côlon recto-sigmoïde chez les patients atteints de SII-PI et non PI (Wang et al., 2004). Ces malades présentent également une augmentation de la densité des fibres nerveuses à proximité des mastocytes

(Wang et al., 2004), ainsi qu'une diminution de la distance entre les fibres axonales du SNE et les cellules inflammatoires, telles que les mastocytes (Giovanni Barbara et al., 2004; Park et al., 2003) et les lymphocytes (Kirsch and Riddell, 2006) par rapport aux contrôles. Une étude sur des biopsies jéjunales de patients souffrant de formes sévères du SII, a montré une infiltration du plexus myentérique par les lymphocytes dans 90% des cas ainsi qu'une dégénérescence dans 70% des cas. Ces observations montrent qu'il y a une association étroite entre les nerfs du SNE et les cellules inflammatoires. Cela reflète la plasticité des nerfs de la muqueuse intestinale (Stead et al., 1991), notamment pour le contact avec les mastocytes. Ce phénomène est bien documenté dans l'inflammation intestinale, qui peut favoriser des modifications du SNE et des fonctions des muscles lisses (Collins, 1996).

IV. La perméabilité intestinale dans le SII.

La barrière intestinale permet l'absorption des nutriments, tout en empêchant les substances indésirables, les microbes ou encore les antigènes de pénétrer dans le corps. Elle est composée de cellules épithéliales recouvertes de mucus et de bactéries composant le microbiote intestinal. Des protéines de jonction permettent de former des jonctions intercellulaires, comprenant des jonctions serrées et adhérentes, régulant la perméabilité paracellulaire de la barrière épithéliale intestinale.

Différentes études ont montré une augmentation de la perméabilité intestinale des patients atteints par le SII, et notamment dans 40% des cas pour les patients atteints de SII-D (Bertiaux-Vandaële et al., 2011; Dunlop et al., 2006; Marshall et al., 2004; Zhou et al., 2009). Ces résultats sont en corrélation avec des modifications de l'expression et de la distribution de certaines protéines de jonction. Ainsi, une diminution de l'expression de la zonula occludens 1 (ZO-1) et de l'occludine a été mise en évidence dans la muqueuse colique des patients atteints de SII par rapport aux contrôles sains. La diminution de l'expression de la claudine-1 a été démontrée uniquement dans le cas du SII-D (Bertiaux-Vandaële et al., 2011). Cette étude a également montré que l'augmentation de l'hypersensibilité viscérale était en rapport avec la diminution de l'expression de l'occludine.

Le fonctionnement et l'intégrité des jonctions peuvent être affectés par de nombreuses substances biologiques comme les médiateurs de l'inflammation.

Les études de la muqueuse et des selles des patients atteints par le SII montrent une augmentation des sérines protéases, telles que la tryptase, en particulier dans le SII-D (Annaházi et al., 2013; Gecse et al., 2008; Lee et al., 2010; Tooth et al., 2014). Les sérines protéases de

ces derniers favorisaient l'allodynie et l'augmentation de la perméabilité intestinale chez la souris de façon PAR-2 dépendante, tandis que le traitement par un inhibiteur de sérines protéases inhibait cet effet (Gecse et al., 2008). Différents modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, ont ainsi permis de mettre en évidence que l'exposition à la tryptase augmente la perméabilité paracellulaire en favorisant l'altération de la barrière intestinale chez les patients atteints de SII (Annaházi et al., 2013; Gecse et al., 2008; Jacob et al., 2005).

Enfin, une augmentation de la perméabilité intestinale persistante a été démontrée chez les patients atteints de SII-PI après infection par *E. coli* et *Campylobacter jejuni* (Marshall et al., 2004). Ceci pourrait faciliter l'accès à la *lamina propria* des bactéries et favoriser l'inflammation chronique à l'origine de perturbations de la barrière. Ainsi, l'altération du microbiote intestinal semble également pouvoir influencer la perméabilité viscérale.

V. Le rôle du microbiote dans le SII.

En parallèle de ses effets bénéfiques sur la digestion, la fermentation bactérienne favorise la production de grandes quantités de gaz et pourrait contribuer aux symptômes de ballonnements, flatulences et distensions abdominales couramment observés chez les patients atteints par le SII (Jiang et al., 2008). Les observations sur l'augmentation de l'incidence du SII à la suite de gastro-entérites et l'amélioration des symptômes par les antibiotiques ou les probiotiques ont permis d'établir que le microbiote intestinal a un rôle important dans le SII (Spiller and Garsed, 2009).

Les malades présentent une **altération de la composition du microbiote**. Le microbiote muqueux et luminal varie entre les patients atteints de SII et les contrôles, mais également entre les sous groupes de SII (Rajilić-Stojanović et al., 2011). Cette variation se caractérise par l'altération des groupes bactériens spécifiques, la diminution des sous populations microbiennes et la modification du degré de variabilité du microbiote (Balsari et al., 1982; Maukonen et al., 2006).

Les malades présentent une **altération de l'activité métabolique du microbiote** intestinal. Celle ci se caractérise par une augmentation des bactéries productrices d'acide acétique et propanoïque (Tana et al., 2010) à l'origine de l'altération de la fermentation des carbohydrates peu absorbables. Il en résulte une augmentation de la production d'acides gras à chaînes courtes favorisant le relargage de 5-HT (Fukumoto et al., 2003) par la muqueuse intestinale induisant des contractions coliques, l'augmentation du transit et de la motilité intestinale.

Ces perturbations du microbiote intestinal dans le SII peuvent favoriser des réactions immunitaires et l'inflammation de la muqueuse.

En conditions physiologiques, les cellules immunitaires reconnaissent le ligand des microbes intestinaux par leurs récepteurs Toll-like (TLR). Cependant, une augmentation de l'expression des TLRs et des anticorps anti flagelline a été montrée dans la muqueuse colique des patients atteints de SII (Brint et al., 2011; Schoepfer et al., 2008). Ainsi, les malades développent une altération des interactions entre l'immunité entérique et commensale et/ou les micro-organismes pathogènes à l'origine de l'augmentation des interactions avec les pathogènes favorable à l'inflammation de la muqueuse.

Le microbiote intestinal module également les fonctions intestinales sensori-motrices (Zhou et al., 2009). En effet, un traitement antibiotique peut favoriser l'augmentation de la sensibilité viscérale par la modification du microbiote, alors qu'un traitement probiotique restaure la sensibilité (Verdú et al., 2006). De plus, les probiotiques réduisent également l'hypersensibilité viscérale testée par distension colorectale et augmentent les fonctions motrices de l'intestin grêle chez le rat (Bär et al., 2009; Kamiya et al., 2006; Rousseaux et al., 2007). Une autre étude a montré que la transplantation fécale du microbiote humain à des souris dépourvues de flore intestinale favorise la motilité colique et réduit le transit gastro-intestinal de façon étroitement associée au type et à la quantité des carbohydrates présents dans l'alimentation (Kashyap et al., 2013). Les perturbations du transit gastro-intestinal peuvent modifier le contenu du flux gastro-intestinal et altérer l'environnement pour les bactéries résidentes provoquant des troubles de leurs structures.

Enfin, le traitement par des bactéries lactiques administrées sous forme de probiotiques à des patients SII-D ou contrôles améliore la perméabilité de l'intestin grêle et les symptômes du SII. Cela suggère qu'il peut y avoir une association entre l'altération de la barrière épithéliale, le microbiote intestinal et les symptômes du SII (Zeng et al., 2008).

La nociception viscérale dans le syndrome de l'intestin irritable

I. Les afférences nociceptives.

La principale fonction biologique de la douleur est de détecter les stimuli potentiellement dangereux pour l'organisme.

En conditions normales, aucune sensation consciente n'est perçue au niveau du tube digestif mis à part les sensations physiologiques telles que les ballonnements, la satiété, la faim ou

l'urgence. Alors que les sensations de coupure, d'écrasement ou de brûlure sont peu détectées par ces organes, les distensions causent des sensations fiables, parmi lesquelles on retrouve la douleur (Cervero, 1994).

La partie distale du côlon et du rectum est innervée par deux systèmes anatomiquement et fonctionnellement distincts :

- les nerfs splanchniques lombaires, qui ont leurs terminaisons dans la moelle épinière au niveau thoraco-lombaire

- les nerfs pelviens sacrés, qui ont leurs terminaisons dans la moelle épinière au niveau lombo-sacré.

Ces afférences transmettent les informations de la paroi et des muscles intestinaux, de l'épithélium muqueux et des ganglions du système nerveux entérique et les fibres sensorielles varient en fonction de l'information.

- Les afférences situées dans la muqueuse répondent aux stimuli chimiques et tactiles. Dans la région anale, elles sont responsables de la discrimination des solides, des liquides et des gaz présents dans la lumière intestinale. Elles fournissent également des informations physiologiques sur le passage des matières fécales dans le tube digestif (Blackshaw et al., 2010).

- Les afférences situées dans la musculature répondent à la distension physiologique de l'intestin (<20 mmHg) et transmettent les informations concernant les distensions ou contractions viscérales (Brierley et al., 2004). Elles sont responsables des sensations de remplissage, ballonnement ou distension.

- Les afférences mésentériques et séreuses répondent à des niveaux de distension trop importants et dangereux pour l'organisme (> 30 mmHg) (Brierley et al., 2004). Elles détectent également les fortes amplitudes de contractions viscérales.

- Les afférences à la fois musculaires et muqueuses répondent aux stimuli tactiles et de distensions pour des niveaux physiologiques et supra physiologiques (Brierley et al., 2004). Leurs fonctions précises ne sont pas déterminées, cependant, elles jouent probablement un rôle important dans la détection du bol alimentaire et le passage des selles.

Les fibres afférentes se caractérisent par des caractéristiques fonctionnelles différentes. Ainsi, certaines fibres sont insensibles à la distension et d'autres sensibles à des seuils bas et/ou haut. D'autres fibres n'ont pas de sensibilité mécanique et répondent exclusivement aux stimuli chimiques.

II. Les récepteurs de la nociception.

Au cours des vingt dernières années, les études pharmacologiques, morphologiques et moléculaires ont permis de caractériser de nombreux nocicepteurs. Nous décrirons plus particulièrement les récepteurs aux cannabinoïdes, aux opiacés endogènes, aux protéases et les canaux à potentiel de récepteur transitoire (TRP) en raison de leurs implications dans la douleur viscérale et comme potentielles cibles thérapeutiques.

1. Les récepteurs aux cannabinoïdes.

Le système endocannabinoïde se compose des récepteurs CB1 et CB2, identifiés respectivement en 1990 et 1992 (Howlett et al., 2002; Matsuda et al., 1990), et de leurs ligands endogènes. Ces récepteurs sont exprimés dans le tractus gastro-intestinal, notamment au niveau des cellules intestinales des neurones ganglionnaires du SNE, des cellules épithéliales et des cellules immunitaires (Coutts et al., 2002; Duncan et al., 2008; Storr et al., 2002). L'expression de CB1 est prédominante dans les cellules épithéliales et les neurones, principalement sur les motoneurones, les interneurones et les neurones primaires afférents des plexus myentériques et sous muqueux du système nerveux entérique. Le récepteur CB2, bien qu'exprimé dans le SNE, prédomine dans les cellules immunitaires (Brusberg et al., 2009).

Les deux principaux endocannabinoïdes du tube digestif capables d'activer ces récepteurs sont l'anandamide (également capable d'activer le récepteur TRPV1) et le 2-arachidonyl glycerol. Au niveau du tractus digestif, le système endocannabinoïde est impliqué dans le contrôle de la motilité intestinale, la nociception et l'inflammation intestinale.

1. Implication dans la motilité

Les études *in vitro* et *in vivo* réalisées chez l'animal ou chez l'homme montrent que l'utilisation d'agonistes du récepteur CB1 est capable d'inhiber les contractions musculaires du tube digestif, de diminuer la motilité et le transit intestinal (Capasso et al., 2005; Pinto et al., 2002). Au contraire, l'utilisation d'antagonistes favorise les contractions musculaires, augmente la motilité et le transit (Coutts and Pertwee, 1997; Izzo et al., 1999; Massa et al., 2005; Pertwee et al., 1996). De plus, les études cliniques réalisées sur les patients obèses montrent que la motilité gastro-intestinale est sous le contrôle du système endocannabinoïde (Després et al., 2005; Ruilope et al., 2008).

Le récepteur CB2 ne semble pas avoir d'effet aussi important sur la motilité gastro-intestinale en conditions physiologiques mais interviendrait plutôt en conditions pathologiques (Duncan et al., 2008; Izzo et al., 2001).

Bien que les agonistes et antagonistes ont été utilisés pour traiter les patients atteints de syndrome métabolique et d'obésité, ces molécules n'ont pas été testées sur les patients atteints de SII en raison des nombreux effets secondaires.

2. Implication dans la nociception

Les effets analgésiques des cannabinoïdes sont largement décrits dans la littérature dans des modèles animaux de douleurs aiguës ou chroniques (Campbell et al., 2001). L'utilisation d'agonistes a montré une diminution de la réponse viscéromotrice dans un modèle animal de distension colorectale, tandis que l'administration d'antagonistes augmente la sensibilité viscérale (Kikuchi et al., 2008; Sanson et al., 2006). Ces études mettent en avant un rôle du système endocannabinoïde dans les sensations viscérales.

Cependant, les quelques études cliniques réalisées chez l'homme et notamment les patients atteints du SII n'ont pas permis d'obtenir les mêmes résultats. En effet, ces études montrent que l'utilisation d'agonistes favorise une diminution de la motilité et une augmentation de la compliance du côlon pour les patients contrôles comme ceux atteints par le SII. Cependant, aucune différence au niveau de la douleur ressentie lors de la distension n'a été observée entre les patients contrôles ou SII, ou encore entre les patients traités par un agoniste ou un placebo (Esfandyari et al., 2007; Klooker et al., 2011; Wong et al., 2011).

Les effets secondaires des agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes peuvent être à l'origine de la différence entre les modèles animaux et les observations cliniques, notamment par l'augmentation de l'anxiété et de la sensibilité des personnes recevant le traitement. Les patients pourraient ainsi ressentir la douleur plus rapidement.

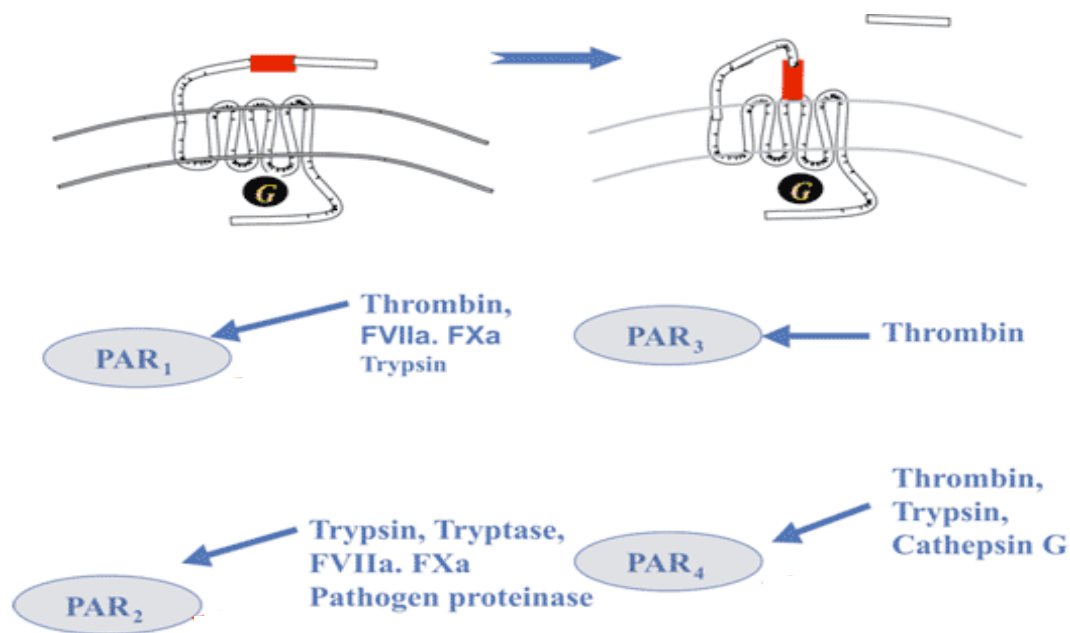


Figure 10 : Mécanismes d'activation des récepteurs activés par les protéases (d'après Vergnolle, *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005)

2. Les récepteurs activés par les protéases

Les récepteurs activés par les protéases (PARs) appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G à 7 domaines transmembranaires. La famille des PARs est composée de 4 membres, PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-4 numérotés ainsi selon l'ordre de leur découverte au cours des années 90. Des sérines protéases clivent le domaine N-terminal extracellulaire et révèlent un nouveau ligand ancré qui se lie sur une région conservée de la boucle extracellulaire ou à l'intérieur du domaine transmembranaire. Les PARs peuvent également être activés par des peptides synthétiques de 5 à 6 acides aminés spécifiques du ligand de chaque récepteur (Scarborough et al., 1992; Vu et al., 1991). Ces récepteurs sont ainsi activés de manière irréversible (Figure 10) (Hollenberg and Compton, 2002; Macfarlane et al., 2001).

Lors de leur découverte, les PARs ont été décrits comme clivés par des protéases distinctes. Ainsi PAR-1, PAR-3 et PAR-4 sont clivés par la thrombine, PAR-2 et PAR-4 par la trypsine et la tryptase. PAR-4 et PAR-1 sont également clivés par la cathepsine G libérée par

les neutrophiles. Les études ultérieures ont montré que les PARs sont activés par les protéases bactériennes (PAR-1, PAR-2, PAR-4), la tryptase relarguée par les mastocytes (PAR-2), les métalloprotéases matricielles ou encore les facteurs de coagulation (PAR-2, PAR-4) (Figure 10) (Coughlin, 1999; Déry et al., 1998; Hollenberg and Compton, 2002).

Ces récepteurs sont fortement exprimés dans le tractus gastro-intestinal et le pancréas. Ils sont également présents dans la totalité des organes et dans la plupart des types cellulaires, cependant, leur expression varie en fonction du type cellulaire et de l'organe étudié. Ainsi, PAR-1 et PAR-2 sont exprimés dans les entérocytes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales de la *lamina propria*, les myofibroblastes intestinaux, les neurones entériques et dans certaines cellules immunitaires telles que les mastocytes, les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes (Vergnolle, 2005). PAR-4 est quant à lui exprimé dans les entérocytes, les neurones entériques, les cellules endothéliales. La répartition cellulaire de PAR-3 n'est pas déterminée à ce jour. Ainsi, l'expression des PARs est variable entre les différents organes. PAR-2 et PAR-4 sont fortement exprimés dans l'intestin grêle et le côlon alors que PAR-3 est exprimé dans l'estomac et l'intestin grêle.

Comme abordé précédemment, le SII présente une physiopathologie complexe associant des facteurs psychologiques, une altération de la motilité intestinale, une microinflammation, une augmentation de la sensibilité viscérale et des modifications des fonctions épithéliales. A la vue de l'expression des PARs dans les différents types cellulaires viscéraux potentiellement impliqués dans le SII, l'activation des PARs pourrait être impliquée dans la génération de cette physiopathologie.

1. Implication dans les transports ioniques

L'activation de PAR-1 et PAR-2 est impliquée dans la sécrétion de chlorure au niveau de l'épithélium intestinal. L'activation de PAR-2 favorise la sécrétion de chlorure quelque soit le type cellulaire étudié. Il induit également la mobilisation du calcium, le rejet de prostaglandines et d'acide arachidonique dans les entérocytes. PAR-1 quant à lui favorise la sécrétion de chlorure au niveau des entérocytes et l'inhibe au niveau des neurones entériques (Figure 11).

La sécrétion d'électrolytes comme le chlorure au niveau des entérocytes est impliquée dans le transport de l'eau à travers la barrière intestinale, favorable à l'apparition de la diarrhée qui est l'un des principaux symptômes cliniques du SII.

2. Implication dans la perméabilité intestinale

Les récepteurs PAR-1 et PAR-2 sont localisés sur les entérocytes. L'activation de PAR-1 favorise l'apoptose cellulaire de la muqueuse intestinale et PAR-2 induit le réarrangement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales à l'origine de l'intégrité de la muqueuse intestinale. Ainsi, ces récepteurs sont à l'origine de perturbations de la perméabilité intestinale (Figure 11).

La perte de l'intégrité de la barrière intestinale a été associée au SII chez l'enfant et l'adulte ce qui suggère que l'augmentation de la perméabilité intestinale favorise la génération du SII (Barau and Dupont, 1990; Spiller et al., 2000). Ainsi, PAR-1 et PAR-2 pourraient être des acteurs majeurs du développement de cette maladie.

3. Implication dans la motilité intestinale

Les récepteurs PARs sont exprimés dans les cellules musculaires lisses et les neurones myentériques de l'intestin. Plusieurs études montrent que PAR-1 et PAR-2 régulent la motilité intestinale de manière physiologique et de manière pathologique en agissant directement sur les neurones sensitifs et l'excitabilité des cellules musculaires lisses (Figure 11) (Mulè et al., 2003; Sekiguchi et al., 2006; Zhao and Shea-Donohue, 2003).

Les agonistes de PAR-1 et PAR-2 induisent la contraction des cellules musculaires lisses gastriques en conditions basales et la relaxation musculaire après contraction du muscle par du carbachol (Cocks et al., 1999; Sekiguchi et al., 2006). L'activation de PAR-1 dans les cellules musculaires lisses isolées du duodénum de rat, induit la relaxation suivie de la contraction, tandis que PAR-2 induit une contraction lente (Kawabata et al., 2000, 1999). Enfin, l'administration *in vivo* d'agonistes de PAR-1 et PAR-2 favorise le transit gastro-intestinal chez la souris. Ces observations impliquent que les PARs jouent un rôle majeur dans la modulation de la motilité intestinale.

Les observations faites sur le rôle des PARs sur la motilité intestinale est en adéquation avec la physiopathologie du SII. L'activation de ces récepteurs pourrait être à l'origine des dysfonctionnements moteurs du tractus digestif observés chez les patients.

4. Implication dans la nociception intestinale

La localisation des PARs sur les afférences nerveuses sensorielles intestinales est à l'origine de l'étude de leur implication dans la nociception digestive (Dale and Vergnolle, 2008; Vergnolle, 2004; Vergnolle et al., 2001), notamment par l'utilisation, *in vivo*, de doses sub

inflammatoires d'agonistes tels que la trypsine ou la tryptase (Cenac, 2011; Vergnolle, 2009). Ces études suggèrent que l'activation de PAR-1, PAR-2 et PAR-4 module le message douloureux et la réponse en fonction du PAR ciblé (Figure 11).

L'injection d'agonistes de PAR-2 favorise l'hyperalgésie sans induction de réponse inflammatoire (Coelho et al., 2002). De plus, l'activité protéolytique dans les surnageants de biopsies de patients est augmentée et ils induisent l'hypersensibilité viscérale chez la souris après injection (Cenac et al., 2007). Ces résultats suggèrent que l'activation des PARs, notamment par les protéases excrétées par les mastocytes, pourrait jouer un rôle majeur dans les douleurs abdominales chroniques ressenties par les patients atteints de SII.

Au contraire, PAR-1 et PAR-4 ont plutôt un rôle analgésique. Ainsi, au niveau somatique, les agonistes de PAR-1 et PAR-4 diminuent la réponse aux stimuli thermiques ou mécaniques et l'hyperalgésie causée par l'inflammation au niveau de la patte (Asfaha et al., 2007, 2002). L'administration d'agonistes de PAR-4 diminue également la réponse viscéromotrice à la distension colorectale et l'hypersensibilité dans un modèle de douleur viscérale. Ces résultats sont favorables à un rôle important de PAR-4 dans l'analgésie du tractus digestif (Annaházi et al., 2012; Augé et al., 2009).

D'après ces observations, les PARs et notamment PAR-2 pourraient être impliqués dans le développement des symptômes douloureux associés avec le SII.

Ces différentes observations permettent de mettre en évidence que les PARs peuvent influencer sur les différentes fonctions impliquées dans la physiopathologie du SII, tels que la modification des transports ioniques, de la perméabilité et de la motilité intestinale et avec les perturbations du système nociceptif, et même dans les microinflammations observées dans le tube digestif de par leur localisation sur les différentes cellules immunitaires (Collins et al., 2001).

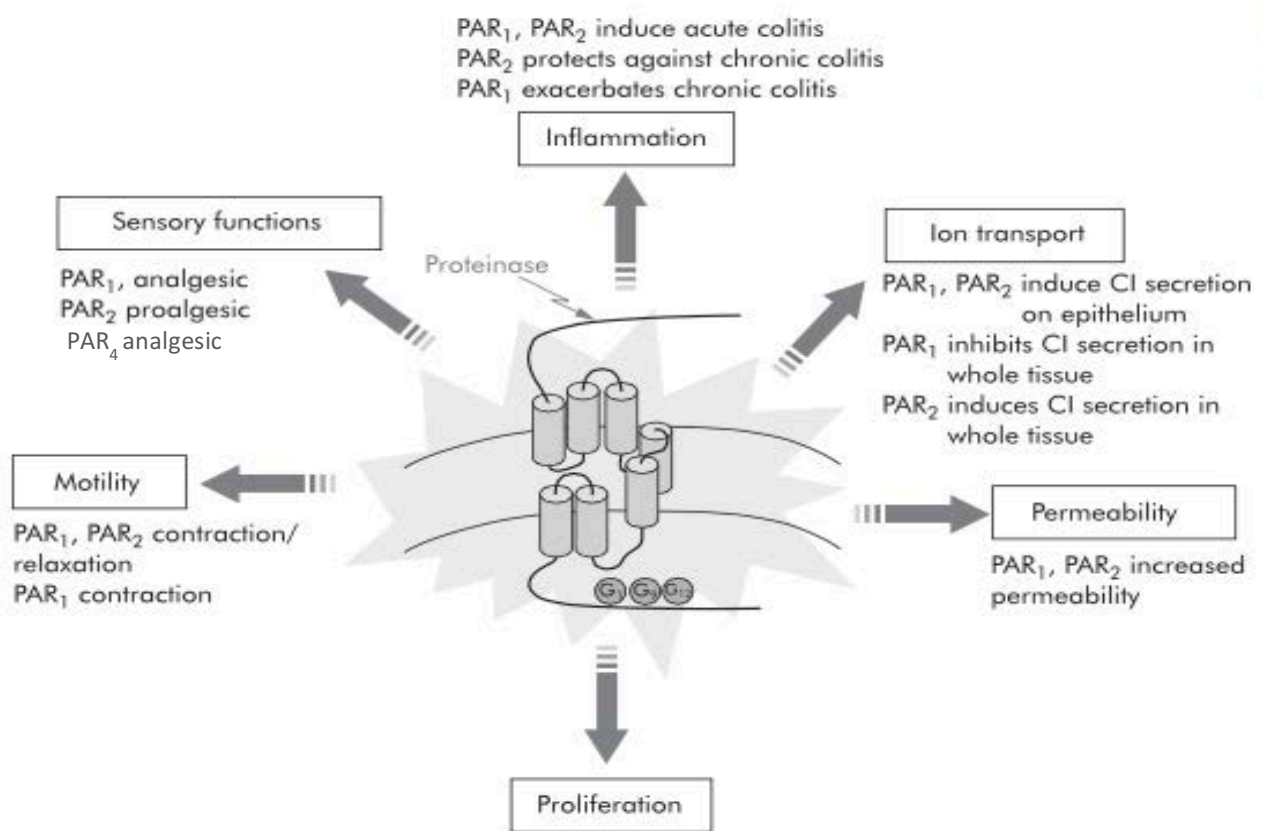


Figure 11 : Effets de l'activation des récepteurs aux protéases sur les fonctions physiologiques de l'intestin (d'après Vergnolle, *Gut*. 2005)

3. Les canaux ioniques à potentiel de récepteur transitoire

1. Description

La superfamille des canaux ioniques à potentiel de récepteur transitoire (TRP) a été identifiée par l'étude des voies de la phototransduction chez la drosophile dans les années 1960. Cette famille est formée par des canaux cationiques non sélectifs et perméables au Ca^{2+} (Venkatachalam and Montell, 2007; Wu et al., 2010).

Ils sont impliqués dans les réponses physiologiques à notre environnement en réagissant aux 5 sens traditionnels (la vision, l'audition, l'olfaction, le goût et le toucher), à la détection des températures et à l'osmolarité. Ils agissent également comme transducteurs primaires de multiples stimuli nocifs (Clapham, 2003; Montell, 2001; Wu et al., 2010).

Depuis leurs découvertes, la famille des TRP a grandi pour atteindre aujourd'hui 28 membres répartis en 6 familles chez les mammifères : TRPC (canonique), TRPV (vanilloïde), TRPM (mélastatine), TRPA (ankyrine), TRPP (polycystine) et TRPML (mucolipine) (Venkatachalam and Montell, 2007; Wu et al., 2010). Ces canaux sont composés de 6 domaines transmembranaires et d'une boucle hydrophile formant le pore du canal entre les segments cinq et six.

Actuellement, seuls TRPV, TRPM et TRPA sont décrits comme impliqués dans la détection et la transduction de la nociception et de la douleur. Nous étudierons ici TRPV1, TRPV4, TRPM8 et TRPA1 qui sont les seuls à avoir été étudiés au niveau viscéral.

2. Implication dans la douleur viscérale

a) TRPV1

TRPV1 a été caractérisé comme nocicepteur impliqué dans la douleur thermique et chimique. Cependant, les études montrent qu'il est également impliqué dans l'hypersensibilité mécanique (Holzer, 2011).

Il est majoritairement exprimé dans les neurones des systèmes nerveux périphérique et central et dans d'autres tissus tels que la vessie, les poumons, les kératinocytes, le tissu dentaire, les fibroblastes, les mastocytes, les follicules pileux, les vaisseaux sanguins, les testicules, les ovaires.

Des expériences de distension colorectale ont montré que la capsaïcine, agoniste naturel de TRPV1, induit l'hypersensibilité viscérale tandis que l'utilisation d'antagonistes diminuait l'hypersensibilité induite par un modèle de stress par séparation néonatale chez le rat (van den Wijngaard et al., 2009).

Chez des volontaires humains, l'instillation intestinale de capsaïcine provoque des brûlures d'estomac, des crampes, nausées, sensations de chaleur et une hypersensibilité viscérale testée par distension colorectale (C. L. Chen et al., 2010; Hammer and Vogelsang, 2007; Kindt et al., 2009; Lee et al., 2004; Schmidt et al., 2004). Un rapport entre l'intensité de la douleur viscérale et le nombre de fibres nerveuses exprimant TRPV1 a également été mis en évidence chez les patients atteints de SII (Akbar et al., 2010). Cette observation a été corrélée avec l'augmentation de la sensibilité des patients après ingestion de capsaïcine par rapport à des sujets sains (Gonlachanvit et al., 2009; Hammer et al., 2008). Les mêmes observations ont été réalisées dans d'autres maladies impliquant des douleurs viscérales comme la dyspepsie fonctionnelle (Hammer et al., 2008).

b) TRPV4

TRPV4 est exprimé de façon ubiquitaire et participe à la signalisation du Ca^{2+} intracellulaire, la transduction de la pression osmotique et mécanique, la sensibilité à la température, la régulation du volume cellulaire, et le maintien de l'homéostasie énergétique (Bourinet et al., 2014; Ho et al., 2012, p. 4; Ye et al., 2012). Son expression fonctionnelle dans les neurones du ganglion rachidien postérieur et du ganglion trigéminal (Gasser) laisse penser que TRPV4 pourrait être impliqué dans la transduction des stimuli thermiques et mécaniques au niveau des tissus somatiques et viscéraux conduisant à la douleur (Alessandri-Haber et al., 2005, 2003).

Les études *in vivo* montrent que l'utilisation d'agonistes de TRPV4 conduit à l'augmentation de la réponse mécano sensorielle des fibres afférentes nerveuses mésentériques et séreuses (Brierley et al., 2008) ainsi qu'à l'hypersensibilité viscérale dépendante de la dose injectée (Cenac et al., 2008). Au contraire, lorsque les souris sont knock out pour le gène de TRPV4, la réponse mécano sensorielle des afférences nerveuses et la sensibilité viscérale en condition d'hyperalgésie sont diminuées. Le même résultat est observé lors de l'utilisation de SiRNA dirigée contre TRPV4 (Brierley et al., 2008; Cenac et al., 2008). Ce récepteur est également impliqué dans la médiation de l'hypersensibilité induite par PAR-2, la sérotonine et l'histamine (Cenac et al., 2010, 2008).

Chez l'Homme, la concentration en Acides Gras polyinsaturés, agonistes de TRPV4, est augmentée dans les surnageants de biopsies de patients atteints par le SII. Lorsqu'ils sont administrés à la souris contrôle, ils induisent l'hypersensibilité viscérale. Cet effet est inhibé lorsque l'expression de TRPV4 est éteinte par SiRNA (Cenac et al., 2015).

Ainsi, TRPV4 semble être un médiateur important de l'hypersensibilité viscérale et pourrait constituer une cible privilégiée dans le traitement des douleurs viscérales.

c) TRPA1

TRPA1 est principalement exprimé dans les neurones du ganglion rachidien postérieur, du ganglion trigéminal et du ganglion inférieur du nerf vague (Barabas et al., 2012; Story et al., 2003). En fonction du tissu ciblé, il est plus ou moins co exprimé avec TRPV1 dans les fibres nerveuses. La co expression est forte dans les fibres afférentes du muscle et du côlon tandis qu'elle est faible au niveau de la peau (Malin et al., 2011). Dans le tube digestif, TRPA1 est fortement exprimé dans les cellules entérochromaffines chez l'humain et le rat (Nozawa et al., 2009).

TRPA1 est impliqué dans la réponse aux stimuli chimiques nocifs, la mécanotransduction et mécano sensibilité intestinale (Brierley et al., 2011, 2009). Cependant, il n'a pas la capacité d'être un mécanosenseur à lui seul, il fonctionne comme second transducteur (Vilceanu and Stucky, 2010).

In vivo, le traitement par des agonistes de TRPA1 favorise l'augmentation de la sensibilité à la douleur lors de la distension colorectale chez la souris adulte (Cattaruzza et al., 2010). Le traitement des souris par de l'huile de moutarde, modèle d'irritation colique néonatal, entraîne également une hypersensibilité viscérale aux agonistes TRPA1 chez l'adulte (Christianson et al., 2010). Cette étude a aussi mis en évidence que l'expression et la fonction de ce récepteur peuvent être modifiées à long terme dans le côlon. Bien que l'expression de TRPA1 ne modifie pas la sensibilité viscérale en conditions basales, les souris knock out pour TRPA1 ne présentent pas d'hypersensibilité viscérale par rapport aux souris sauvages dans un modèle de colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS), et TRPA1 médie l'hyperalgésie induite par le récepteur PAR-2 (Cattaruzza et al., 2010). Une étude de Terada et de ses collaborateurs sur la douleur pancréatique a également montré que TRPA1, en collaboration avec TRPV1, module la nociception pancréatique induite par PAR-2 (Terada et al., 2013).

TRPA1 semble donc avoir un rôle proalgésique majeur au niveau viscéral, notamment en modulant la réponse d'autres récepteurs impliqués dans la douleur.

d) TRPM8

TRPM8 est exprimé dans les neurones du système nerveux périphérique qui se projettent au niveau de la peau, de l'épithélium de la cavité orale, de la pulpe dentaire, de la langue et des organes viscéraux innervés par les nerfs pelvien (y compris le côlon) et vagal (Dhaka et al., 2008; Harrington et al., 2011; Takashima et al., 2007; Xing et al., 2008).

TRPM8 est principalement activé par les températures froides inoffensives à nocives et participe aux sensations de douleurs induites par le froid (Liu and Qin, 2005; Zakharian et al., 2010). Il est également activé par de nombreuses substances chimiques et joue un rôle comme récepteur chimique.

Dans les modèles animaux d'hypersensibilité colique post-inflammatoire, les agonistes de TRPM8 diminuent la sensibilité viscérale et atténuent significativement la sensibilité accrue à des stimuli mécaniques. Les essais cliniques utilisant de la menthe poivrée, agoniste naturel de TRPM8, ont montré que l'activation de ce récepteur diminue l'hypersensibilité colique des

patients SII (Harrington et al., 2011). Les mécanismes impliqués dans l'effet observé sont inconnus, ils laissent cependant supposer un rôle important de TRPM8 dans l'hypersensibilité viscérale et dans les pathologies associées, notamment par sa colocalisation avec TRPV1 et TRPA1. En opposition avec ces résultats, une étude de Hosoya et de ses collaborateurs a montré que l'expression de TRPM8 est augmentée dans le côlon inflammatoire de souris après induction d'une colite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) et le TNBS. Ils ont également montré que l'activation de TRPM8 était associée à l'augmentation de la douleur (Hosoya et al., 2014). Ces résultats sont en faveur du rôle important de TRPM8 dans la sensibilité viscérale, cependant, l'action de TRPM8 sur l'activation ou l'inhibition de TRPV1 et TRPA1 n'a pas été abordée dans cet article.

D'autres expériences sont nécessaires pour élucider le rôle de TRPM8 dans l'hypersensibilité viscérale.

4. Les autres canaux et récepteurs suspectés

1. Les récepteurs sensibles à l'ATP

Les canaux ioniques ATP-dépendants sont des récepteurs ionotropiques multimériques identifiés dans les terminaisons nerveuses afférentes du côlon. Ils se composent des récepteurs purinergiques ATP dépendant : P2X, et des récepteurs couplés aux protéines G : P2Y.

Les récepteurs P2X₃ et P2X₇ sont impliqués dans l'hypersensibilité viscérale chez le rongeur, et notamment en conditions post inflammatoires (Deiteren et al., 2015; Keating et al., 2011; Shinoda et al., 2009; Xu et al., 2008).

2. Les canaux sodiques voltage dépendants

Les canaux sodiques voltage-dépendants (Na_v) sont membres de la superfamille des canaux ioniques. Ils se composent de dix molécules fonctionnelles situées dans les systèmes nerveux central et périphérique avec des propriétés communes (Wood, 2004).

L'injection intrarectale de lidocaïne, inhibiteur de ces canaux, diminue la sensibilité rectale et les douleurs abdominales des patients atteints par le SII (Verne et al., 2005). Une augmentation du sous type de récepteur Na_v1.7 a également été observée dans les fibres nerveuses de biopsies rectales de patients souffrant d'hypersensibilité par rapport à des sujets sains (Yiangou et al., 2007).

3. Les canaux calciques voltages dépendants

En fonction du type de courant généré (charge longue (L), rapidement inactivé (N), L et transitoire (T)), les canaux calciques voltages dépendants sont répartis en 3 familles.

Les études de l'hypersensibilité viscérale dans divers modèles de SII chez le rat ont montré que l'inhibition du canal $Ca_v 3.2$, canal de type T (transitoire rapidement inactivé et à faible seuil d'activation), diminue l'hypersensibilité viscérale (Marger et al., 2011). Au niveau des muscles lisses de la paroi intestinale, les canaux de type L (canaux calciques à haut seuil d'activation et inactivation lente) participent aux contractions et à la motilité gastro-intestinale (Choudhury et al., 2009; Zhang et al., 2010).

Ces études mettent en évidence l'implication de ces récepteurs dans la sensibilité et la motilité viscérale.

4. Les canaux ioniques sensibles à l'acidité

Les canaux ioniques sensibles à l'acidité (ASICs) sont des canaux voltage-indépendants activés par les protons extracellulaires et sont présents sous 6 isoformes. Ils sont exprimés sur les afférences primaires de l'intestin grêle et du côlon.

Les études dans des modèles d'hypersensibilité viscérale chez la souris et le rat ont mis en évidence que les ASICs, et plus particulièrement ASIC1 et ASIC3, contribuent à l'augmentation de la sensibilité testée par distension colorectale, en conditions non inflammatoires (Holzer, 2015).

L'altération du microbiote est soupçonnée d'augmenter la formation d'acides acétiques et propanoïques favorables à l'activation de ces récepteurs. Cependant, le rôle et les mécanismes par lesquels ces récepteurs participent à la douleur viscérale sont méconnus.

5. Les récepteurs de la cholécystokinine

Le récepteur de la cholécystokinine (CCK), CCK1 et CCK2, sont localisés principalement dans le tractus digestif, le cerveau et le système nerveux central (Crawley and Corwin, 1994; Miyasaka and Funakoshi, 2003).

Les études sur les patients atteints de SII montrent que la CCK induit des douleurs abdominales et altère la motilité gastro-intestinale, notamment en période post prandiale (Roberts-Thomson et al., 1992; Sjölund et al., 1996; van der Schaar et al., 2013). L'administration d'antagonistes diminue les douleurs abdominales (D'Amato et al., 1999).

Ces observations mettent en avant l'éventuelle implication de la CCK et de ces récepteurs dans le SII.

6. Les récepteurs du facteur de libération de la corticotrophine (CRFR)

Ces récepteurs, activés par la corticotrophine (CRF), sont divisés en deux sous types : CRFR1 et CRFR2 et font partie des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ils sont exprimés principalement dans les régions du cerveau participant au stress, aux émotions et à la nociception, mais également dans la muqueuse intestinale et le SNE. La CRF est une hormone relarguée principalement en réponse au stress.

Les études animales ont montré que ces récepteurs sont impliqués dans la sensibilité viscérale, la perméabilité intestinale, la réponse au stress et l'anxiété. De plus, les effets du stress sur ces symptômes sont dépendants de l'activation des mastocytes médiée par la CRF.

Chez l'Homme, la CRF semble être impliquée dans l'anxiété, la motilité colique et les douleurs abdominales des patients atteints du SII (Buckley et al., 2014).

Ces études mettent en évidence le rôle important de la CRF dans l'implication de l'axe cerveau-intestin dans les symptômes du SII.

La compréhension des mécanismes impliqués dans les symptômes des patients atteints de SII permet de mieux caractériser la maladie, mais aussi de développer des stratégies thérapeutiques mieux ciblées.

Stratégies thérapeutiques

Le SII est un trouble fondé sur les symptômes observés. De ce fait, les traitements visent à traiter les principaux symptômes abdominaux et intestinaux tels que la douleur, les crampes, les ballonnements, la diarrhée et la constipation. Nous verrons ici les stratégies thérapeutiques adoptées dans les différentes formes de SII.

I. Importance du sport

L'exercice accélère le transit colique et améliore l'ensemble des symptômes du SII (Johannesson et al., 2011; Song et al., 2012). Ainsi, il est recommandé aux patients atteints par le SII d'augmenter l'activité physique journalière avec au moins 20 minutes de marche chaque jour.

II. Modification des habitudes alimentaires

Les symptômes du SII sont souvent associés à la phase post prandiale. Les cas où les patients présentent des allergies alimentaires sont rares. Cependant, ils souffrent la plupart du temps d'intolérances ou de sensibilités alimentaires. Ainsi, 90% des patients atteints du SII sont prêts à modifier leurs habitudes alimentaires dans le but d'améliorer leurs symptômes (Hayes et al., 2014). De nouvelles recommandations émergent pour favoriser un régime alimentaire sans gluten et pauvre en oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides, et polyols fermentables (FODMAP) (cf chapitre Les facteurs impliqués dans le développement du Syndrome de l'intestin irritable/ II.3. Influence de la nourriture).

Le principe d'exclusion alimentaire semble faire ses preuves (Halmos et al., 2014; Vazquez-Roque et al., 2013), néanmoins, il doit être réalisé à l'aide d'un diététicien pour éviter les carences alimentaires.

III. Traitement des patients atteints de SII-D

1. Antidiarrhéiques

Les médicaments antidiarrhéiques, tels que le lopéramide, sont souvent les premiers utilisés chez les patients SII souffrant de diarrhée. Ces traitements inhibent le péristaltisme intestinal, prolongent le transit et réduisent le volume fécal. Les études cliniques sur les patients atteints de SII-D montrent que le lopéramide réduit la fréquence et augmente la consistance des selles. Cependant, il ne permet pas de traiter les autres symptômes retrouvés chez les malades tels que les douleurs abdominales et les ballonnements (Efsskind et al., 1996; Hanauer, 2008). D'autres traitements sont possibles, notamment par les chélateurs des acides biliaires tels que le diphénoxylate ou l'atropine, cependant, ces deux dernières molécules peuvent mener à de l'accoutumance et traverser la barrière hémato-encéphalique.

2. Les agents serotoninergiques ; Antagonistes du récepteur 5-HT₃

La sérotonine influence la motilité et la sensibilité gastro-intestinale (Mawe and Hoffman, 2013). L'Alosetron, antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT₃, a un mode d'action central et périphérique. Il réduit les douleurs abdominales, la fréquence des selles et améliore

leurs consistances (Andresen et al., 2008). Certains patients développent des constipations sévères et des colites ischémiques (Chang et al., 2006a), ce médicament a donc été retiré du marché puis réintroduit aux Etats Unis sous certaines conditions.

L'ondansetron, un autre antagoniste du récepteur 5-HT₃, moins puissant que l'alosetron, est à l'essai. Il améliore significativement la consistance des selles, l'urgence de la défécation, la fréquence des selles et les ballonnements. Cependant, il n'a pas d'effet sur la douleur (Garsed et al., 2014).

3. Les antispasmodiques

Les contractions intestinales post prandiales sont partiellement régulées par le système cholinergique et les antispasmodiques ont des propriétés anticholinergiques ou de blocage des canaux calciques favorables à la relaxation des muscles lisses intestinaux. Ainsi, l'utilisation d'antispasmodiques tels que l'otilonium et l'hyoscine, améliore les symptômes de crampes abdominales et la consistance des selles molles de certains patients (Ford et al., 2014a).

L'Huile de menthe poivrée est également considérée comme antispasmodique grâce à sa capacité de blocage des canaux calciques. Elle améliore les symptômes des patients atteints de SII et notamment les douleurs abdominales (Khanna et al., 2014).

IV. Traitement des patients atteints de SII-C

1. Régime alimentaire riche en fibres

L'ajout de fibres naturelles ou synthétiques au régime alimentaire est un traitement simple et peu coûteux pour augmenter le transit intestinal des patients souffrant du SII et de constipations moyennes. Néanmoins, seul le traitement par des fibres solubles améliore les symptômes du SII en comparaison avec le traitement par des fibres insolubles (son de blé par exemple). Ces dernières contiennent des FODMAPs qui peuvent potentiellement exacerber les symptômes (Moayyedi et al., 2014).

2. Les agents laxatifs

Les laxatifs osmotiques sont régulièrement utilisés comme traitement de première ligne des patients atteints par le SII-C. L'administration de polyéthylène glycol, appartenant à la famille de ces agents, améliore la fréquence et la consistance des selles, mais n'a pas d'effet sur les douleurs abdominales et les ballonnements (Chapman et al., 2013). En fonction de la dose administrée, des effets secondaires peuvent se produire tels que des ballonnements, des gaz et des selles molles.

Les laxatifs stimulants tels que le lactulose et le sorbitol sont aussi couramment utilisés chez les patients atteints de SII-C. Cependant, aucune étude n'a validé l'utilisation de ces agents sur le SII-C. Ils sont à l'origine d'effets secondaires capables d'aggraver les symptômes déjà présents tels que les douleurs et les crampes abdominales (Brandt et al., 2005).

3. Agents favorisant les sécrétions

Le Lubiprostone est un dérivé de la prostaglandine E1 qui déclenche la sécrétion du chlorure intestinal par l'activation des canaux chlorure de type 2 et favorise la sécrétion des fluides intestinaux. Cette molécule améliore la motilité intestinale, la fréquence des selles et certains symptômes tels que les ballonnements et les douleurs (Drossman et al., 2009). L'utilisation de cette molécule est approuvée pour le traitement du SII-C. Les effets secondaires potentiels sont des nausées, la diarrhée, des maux de tête.

Le Linaclotide est un agoniste de la guanylate cyclase de type C qui induit l'augmentation de la sécrétion de chlorure, et favorise la sécrétion des fluides intestinaux par l'intermédiaire de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Au niveau extracellulaire, la GMPc réduit l'activation des fibres nerveuses afférentes impliquées dans la douleur viscérale (Castro et al., 2013). Les études cliniques ont montré que le Linaclotide améliore la fréquence des selles, les douleurs abdominales et les ballonnements. Il est ainsi recommandé pour le traitement du SII-C. La diarrhée est l'effet indésirable le plus fréquent avec 20% des patients (Chey et al., 2012).

V. Traitements visant à modifier le microbiote

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui confèrent un avantage pour la santé de l'hôte lorsqu'ils sont consommés en quantités suffisantes. Les prébiotiques sont des nutriments, généralement des hydrates de carbone, qui favorisent la croissance des bactéries probiotiques. Les synbiotiques sont la combinaison de prébiotiques et de probiotiques.

Le traitement par les probiotiques se base sur l'hypothèse que les patients atteints par le SII ont une dysbiose. Leur mode d'action est peu connu et ils pourraient agir en modifiant le microbiote intestinal, en participant à la régulation du pH intestinal, de l'immunité ou encore des acides biliaires. Les études montrent que le traitement par les probiotiques semble favoriser l'amélioration des symptômes tels que les douleurs abdominales, les ballonnements et les flatulences (Ford et al., 2014a). Des biais existent dans les études réalisées à ce sujet et des études complémentaires sont nécessaires (Brenner et al., 2009).

La rifaximine est un antibiotique à large spectre non absorbé par l'intestin. Lorsque les patients atteints de SII développent des gaz et des ballonnements, en raison de la croissance anormale de bactéries dans l'intestin grêle, il peut être utilisé pour soulager les symptômes. En effet, les études cliniques réalisées chez les patients atteints de SII sans constipation ont montré que le traitement par la rifaximine favorise l'amélioration prolongée des symptômes de ces patients (Menees et al., 2012). Le rôle des autres antibiotiques dans le traitement SII reste inconnu.

VI. Les agents à action centrale

1. Les antidépresseurs

En raison de leurs effets sur la perception de la douleur, de l'humeur, et la motilité, les antidépresseurs sont couramment utilisés pour traiter les patients atteints par le SII sous ses formes modérées à sévères.

Les antidépresseurs tricycliques tels que la nortriptyline et l'amitriptyline sont les mieux décrits dans le traitement du SII. Les propriétés anticholinergiques de ces médicaments favorisent la diminution du transit intestinal et soulagent la douleur et les spasmes intestinaux (Ford et al., 2014a). Cependant, des effets secondaires peuvent apparaître tels que des sécheresses de la bouche, de la rétention urinaire, des dysfonctionnements sexuels et de la fatigue.

Les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine sont également efficaces contre les symptômes du SII (Ford et al., 2014b). Les effets de ces médicaments varient en fonction de la molécule utilisée. Ainsi, le citalopram favorise plutôt le rétablissement du tonus et de la sensibilité du côlon tandis la paroxétine agit favorablement sur la diarrhée.

Les inhibiteurs de la recapture de la noradrénaline (par exemple, la venlafaxine) ont un rôle important dans la suppression de la douleur. Ces inhibiteurs ont également des effets périphériques en favorisant notamment la relaxation du côlon (Grover and Camilleri, 2013).

VII. Les thérapies psychologiques

Les thérapies psychologiques, notamment par la psychothérapie, l'hypnothérapie, ou thérapies cognitivo-comportementales, offrent une alternative aux traitements classiques des patients atteints par le SII cités précédemment. Les études réalisées sur ces méthodes de soins sont en faveur de l'amélioration de l'état général des malades (Ford et al., 2014b). Cependant, ces thérapies sont peu pratiquées malgré les résultats encourageants.

VIII. Médecines alternatives

De nombreux patients se tournent vers les médecines alternatives, telles que l'acupuncture ou l'utilisation d'herbes chinoises. Cependant, les quelques études réalisées ne sont pas en faveur du soulagement des symptômes par ces méthodes (Hussain and Quigley, 2006; Manheimer et al., 2012).

De nombreuses stratégies thérapeutiques existent pour soulager les patients atteints du SII. Cependant, aucun de ces traitements ne permet de guérir la maladie et une meilleure compréhension de la physiopathologie du SII semble être la clé pour aboutir à de nouvelles thérapies. Ainsi, il semble important d'étudier en profondeur le rôle de l'alimentation, du mode de vie et du comportement des populations pour mieux comprendre comment soigner cette maladie.

Les facteurs impliqués dans le développement du syndrome de l'intestin irritable

I. Facteurs héréditaire et familiaux dans le SII

Depuis longtemps, les antécédents familiaux sont pris en compte dans l'établissement du diagnostic du SII (Davidson and Wasserman, 1966).

1. L'agrégation familiale.

Une étude a montré que les patients atteints par le SII (33,9%) sont plus susceptibles d'avoir des antécédents familiaux par rapport à des patients témoins (12,6%) (Kanazawa et al., 2004). De plus, dans un couple, le conjoint atteint par le SII a une probabilité plus élevée d'avoir un membre de sa famille au 1^e degré atteint par ce syndrome en comparaison de son conjoint sain (Locke et al., 2000a). D'autres études ont également mis en évidence que la prévalence du SII est plus forte dans l'entourage parental des malades par rapport à des sujets sains (Kalantar et al., 2003; Saito et al., 2010b, 2008). Enfin, une étude suédoise a montré qu'il y a une augmentation du risque de développer le SII lorsque des parents au 1^e, 2^e ou 3^e degré sont atteints par le SII et que le facteur de risque est associé avec le degré parental le plus proche (Waehrens et al., 2015). Ainsi, ces différentes études semblent mettre en avant que l'agrégation familiale joue un rôle dans le développement du SII.

2. Les études sur les jumeaux.

La plupart des études réalisées sur les jumeaux ont tendance à mettre en évidence que la composante génétique est non négligeable dans le développement du SII. Ainsi, trois études indépendantes ont montré que le taux de concordance est compris entre 17,2% et 33,3% pour les jumeaux monozygotes et compris entre 8,4% et 13,3% pour les jumeaux dizygotes (Bengtson et al., 2006; Levy et al., 2001; Morris-Yates et al., 1998). Cependant, une autre étude n'a pas mis en évidence de différence entre les jumeaux monozygotes et dizygotes (Mohammed et al., 2005). Néanmoins, les jumeaux partagent le même environnement familial, il se pourrait donc que l'environnement joue un rôle plus important que la génétique dans l'agrégation du SII (Levy et al., 2001).

3. Les études génétiques :

La plupart des études sur les variations génétiques dans le SII se sont concentrées sur les voies de signalisation de la sérotonine, le contrôle de la réponse immunitaire, la synthèse d'acides biliaires, l'activité neuropeptidique et les sécrétions intestinales (Camilleri, 2009; Camilleri et al., 2012; Saito, 2011; Saito et al., 2010a). Ces études ont permis de mettre en avant 60 gènes candidats potentiellement impliqués dans le développement du SII (D'Amato, 2013). Camilleri et ses collaborateurs ont étudié l'implication des différents polymorphismes dans le SII (Camilleri, 2013). Cependant, très peu de polymorphismes semblent avoir une implication réelle dans les symptômes du SII. Plusieurs études se sont concentrées sur la relation entre le SII et le génotype 5-HTTLPR, qui contrôle l'expression de la SLC6A4 (protéine de transport de la sérotonine). Cependant, les résultats sont contradictoires et ne permettent pas de conclure à une implication de ce génotype dans le SII (Jarrett et al., 2007; Kohen et al., 2009; Van Kerkhoven et al., 2007; Yuan et al., 2014). L'implication du membre 15 de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale sur le développement du SII a été reconnue dans 3 cohortes différentes (Wouters et al., 2014; Zucchelli et al., 2011). Cependant, une autre étude a infirmé ces observations (Ek et al., 2014).

L'implication de la génétique semble non négligeable dans le développement du SII. Cependant, l'environnement semble également pouvoir jouer un rôle majeur dans le développement de cette maladie, notamment par l'exposition familiale aux mêmes facteurs environnementaux

II. Les facteurs environnementaux et le SII.

Gwee a réalisé une étude épidémiologique de l'implication environnementale sur la prévalence du SII en se basant sur les publications décrivant l'épidémiologie, les symptômes et les causes possibles du SII dans les pays en voie de développement, nouvellement développés et développés (Gwee, 2005). En suivant les mêmes critères, il observe que la prévalence du SII est différente entre les pays en voie de développement tels que la Thaïlande (4,4% de la population) (Danivat et al., 1988), et les pays développés tels que les Etats Unis (22% de la population) (Drossman et al., 1993). En suivant les critères de Rome II, une prévalence croissante a également été observée entre les zones en voie de développement d'Asie, telles que le sud de la Chine, et les zones développées telles que Singapour qui a subi une industrialisation

et une urbanisation extrêmement rapide. D'ailleurs, au cours des années, une prévalence croissante a été mise en évidence au sein même de Singapour pour le SII et les maladies gastro-intestinales (Gwee et al., 2004; Ho et al., 1998; Kang et al., 1996, 1992).

Une autre étude de Waehrens et de ses collaborateurs a mis en évidence l'implication de la génétique dans la transmission du SII au 1^e, 2^e et 3^e degré. Cependant, cette étude décrit également une augmentation du risque de développer un SII entre conjoint, impliquant une cause non génétique, probablement environnementale (Waehrens et al., 2015). Nous étudierons ici ces facteurs pouvant influencer le développement du SII.

1. Influence de l'environnement familial

Les études sur les enfants et les jeunes adultes permettent de mettre en avant certains facteurs de risque du SII et de nombreuses études ont montré que la survenue d'événements traumatiques lors des premiers jours de vie favorise le développement du SII (Chitkara et al., 2008). Ainsi, l'exposition aux conditions de guerre pendant les deux premières années de vie, comprenant des événements stressants, la malnutrition, ou des maladies infectieuses plus fréquentes, a été associée à un risque accru de développer le SII. Cependant, le facteur précis impliqué n'est pas déterminé (Klooker et al., 2009). Une autre étude a évalué l'influence de la nutrition fœtale et du poids de naissance sur le développement du SII dans une population de jumeaux. Cette étude montre que les sujets nés avec un poids inférieur à 1500 grammes sont significativement plus susceptibles de développer le SII que les sujets avec un poids supérieur. De plus, les symptômes apparaissent à un âge plus précoce pour le groupe de poids inférieur (7,7 ans plus tôt) (Bengtson et al., 2006). Une autre étude sur l'environnement des enfants âgés de 6 à 18 ans a montré que les jeunes qui habitent dans une famille monoparentale, sont exposés à des températures basses, consomment excessivement du poivre ou des produits froids, de l'alcool ou fument, présentent une augmentation de la prévalence du SII (Dong et al., 2005). Une association positive a été montrée avec la diminution du temps d'allaitement, le partage de la chambre pendant l'enfance et l'exposition à un animal herbivore dans une étude où 17% des sujets ont développé un SII (Koloski et al., 2015). Enfin, une étude sur 333 patients atteints de SII avant l'âge de 15 ans a montré que 31% avaient un parent décédé, ou séparé; 19% avaient un parent alcoolique, et 61% étaient en conflit avec leurs parents (Hislop, 1979).

Ces études semblent être en faveur d'une implication de l'environnement infantile dans le développement du SII, cependant, cela pourrait également venir de l'apprentissage social.

2. Influence du stress

La réponse au stress est médiée par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et par le système nerveux sympathique (Elenkov and Chrousos, 2002). L'excrétion de corticolibérine (CRH) favorise la libération de corticotrophine (CRF) au niveau hypothalamique et aboutit à la sécrétion de cortisol dans la circulation. La CRH contrôle ainsi les réponses autonomes, immunologiques et émotionnelles au stress (Turnbull and Rivier, 1997).

Les études épidémiologiques ont mis en évidence que les événements stressants dès le plus jeune âge (Creed et al., 1988; Dinan et al., 1991; Drossman et al., 1996; Howell et al., 2004), les maladies psychiatriques ou les situations anxiogènes (Ford et al., 1987) sont des facteurs de stress environnementaux importants dans la prédisposition, le développement et l'installation des symptômes du SII. L'axe HHS contrôle le système endocrinien en réponse au stress (Dickhaus et al., 2003; Posserud et al., 2004) et l'administration de CRH exogène entraîne la libération accrue de CRF et de cortisol chez les patients atteints de SII (Dickhaus et al., 2003; Dinan et al., 2006). Il semble donc que l'axe HHS favorise une réponse au stress qui est exagérée dans le SII.

Enfin, dans un modèle de stress chez le rat par séparation maternelle (Coutinho et al., 2002), les animaux présentent une altération permanente de la réponse au stress qui est associée chez l'adulte à de l'hyperalgésie viscérale et des perturbations de la motilité colique.

Ainsi, le stress semble avoir une importance majeure dans le SII en favorisant les anomalies sensorielles, motrices et immunologiques, observées dans ce syndrome.

3. Influence de la nourriture

Les patients atteints par le SII ont tendance à adapter leur régime alimentaire pour améliorer leurs symptômes (Bhat et al., 2002; Bischoff and Crowe, 2005; Locke et al., 2000b; Nanda et al., 1989; Simrén et al., 2001; Young et al., 1994) et semblent éviter les aliments tels que le lait et les produits laitiers, les produits à base de blé, la caféine, le chou, les oignons, les pois, les haricots, les épices fortes, les aliments frits et fumés (Böhn et al., 2013; Nanda et al., 1989; Ostgaard et al., 2012; Simrén et al., 2001). La nourriture est susceptible de favoriser le développement des symptômes gastro-intestinaux du SII par différents mécanismes tels que

l'activation du système immunitaire, l'action directe de molécules bioactives ou la distension luminale (Gibson, 2011).

Ainsi, différentes études ont été réalisées dans le but de comprendre quel type de nourriture peut influencer la physiopathologie du SII.

1. L'allergie alimentaire

L'allergie alimentaire correspond à une réaction immunitaire indésirable en réponse à un aliment. Elle peut être divisée en deux catégories :

- les réactions allergiques médiées par les immunoglobulines E (IgE) qui entraînent une réaction d'hypersensibilité immédiate. Elles se traduisent par des symptômes hétérogènes (Brandtzaeg, 2010) avec au niveau gastro-intestinal, des oedèmes de la langue et des lèvres, des nausées, des douleurs abdominales, de la diarrhée ou des constipations (Bischoff et al., 1996).
- les réactions allergiques médiées par les IgE, les lymphocytes T, les mastocytes et les éosinophiles qui produisent des médiateurs pro inflammatoires. Les symptômes de ce type de réaction sont retardés. Les maladies associées sont la dermatite atopique, la maladie coeliaque, l'oesophagite, la gastro-entérite, l'entérocolite ou encore la proctite.

L'augmentation de la prévalence des allergies atopiques chez les patients SII-D (White et al., 1991) et la diminution significative des symptômes lors du traitement par le cromoglycate de sodium, stabilisateur membranaire des mastocytes (Stefanini et al., 1995), suggèrent que l'hypersensibilité alimentaire joue un rôle dans la pathogenèse du SII. Un test de réponse allergique dans un sous groupe de patients SII avec suspicion d'allergies a montré que 77% de ces malades avaient une allergie et que l'adaptation du régime alimentaire améliorait les symptômes dans 83% des cas (Bischoff et al., 1997). Malgré ces résultats, l'implication de l'allergie alimentaire dans le SII est peu documentée et toutes les études ne corroborent pas ces résultats.

2. L'hypersensibilité aux graisses

Les lipides sont un groupe complexe de substances chimiques et regroupent les triglycérides, le cholestérol, les phospholipides et les stérols.

Accarino et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que les patients atteints de troubles fonctionnels gastro-intestinaux, et notamment du SII, peuvent développer de l'hypersensibilité viscérale et des réflexes exagérés à une stimulation normale du tube digestif comme l'ingestion de graisses (Accarino et al., 2001). En effet, les lipides inhibent la motilité et retardent le transit de l'intestin grêle à l'origine de la rétention de gaz et de ballonnements abdominaux. Ces

observations sont en corrélation avec les symptômes dont se plaignent les patients après l'ingestion de graisses (Serra et al., 2002). Au contraire, les lipides favorisent également l'activité motrice colique par le réflexe gastro colique et conduisent à la diarrhée. Ce phénomène peut également être exacerbé dans le SII.

Enfin, l'instillation de lipides au niveau duodénal augmente la sensibilité et la perception rectale à la distension chez les patients atteints par le SII (Simrén et al., 2003). Ces résultats semblent être en faveur de l'implication des lipides dans l'aggravation des symptômes abdominaux décrits chez les patients atteints par le SII.

3. Le cas des FODMAPs dans le SII (Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides, et Polyols Fermentables).

Les hydrates de carbone (HDC) alimentaires sont classés en sucres, oligosaccharides et polysaccharides en fonction de degré de polymérisation (Cummings and Stephen, 2007). Il existe un sous groupe d'HDC à chaînes polypeptidiques courtes décrit comme «fermentable» en raison de la fermentation colique causée par le manque d'enzymes de digestion ou l'absorption incomplète au niveau de l'intestin grêle.

Ils sont répartis de la manière suivante :

Les Fructanes représentent la source alimentaire majeure d'HDC fermentables. Au niveau du tractus digestif, la digestion des fructanes est très faible en raison de l'absence d'enzyme capable de digérer les liaisons β (2-1) fructosyl-fructose (Roberfroid, 2007). On les trouve principalement dans le blé, les oignons (Dunn et al., 2011; van Loo et al., 1995), comme additifs de textures (Niness, 1999), ou comme prébiotiques (Roberfroid et al., 2010). Les malades en consomment environ 3,6g par jour en Angleterre (Staudacher et al., 2012).

Les galacto-oligosaccharides sont constitués de monomères de galactose et d'un glucose en position terminale. Le manque d' α -galactosidase chez l'homme conduit à la fermentation colique et à un effet prébiotique de ces sucres (Macfarlane et al., 2008). Ils sont présents dans le lait maternel, les légumes et certaines céréales, noix et graines (Biesiekierski et al., 2011; Tsung Min Kuo, 1988). Ils peuvent également être ajoutés dans les préparations pour nourrissons, les produits laitiers et dans les boissons (Macfarlane et al., 2008; Sangwan et al., 2011). Les patients atteints par le SII en consomment environ 2 g par jour (Staudacher et al., 2012).

Les disaccharides et monosaccharides. L'absorption intestinale de ces sucres n'est pas complète chez de nombreuses personnes et ils favorisent ainsi la fermentation colique.

Le lactose est un disaccharide formé de glucose et de galactose, et hydrolysé par la lactase en phase de digestion. Cependant, 70% des humains, sans variation de la prévalence entre les patients atteints de SII et la population générale (Barrett et al., 2009; Yang et al., 2013), présentent une hypolactasie à l'origine de sa malabsorption intestinale (Lomer et al., 2008). Le lactose est présent dans le lait des mammifères, le pain, les gâteaux et les produits amincissants (Matthews et al., 2005) et les patients atteints par le SII en consomment environ 7g par jour (Staudacher et al., 2012).

Le fructose est un monosaccharide de carbone absorbé de manière variable en fonction de la dose ingérée (Jones et al., 2011). Il est transporté par les récepteurs au glucose (GLUT) sur la membrane apicale de l'épithélium intestinal (Jones et al., 2011). Il est principalement présent dans les fruits, les jus de fruits et les produits sucrés avec des édulcorants. La consommation moyenne des patients atteints du SII au Royaume-Uni est de 17 g par jour (Staudacher et al., 2012).

Les polyols sont des sucres-alcools dont le sorbitol et le mannitol font partie. L'absorption de ces éléments est passive, variable entre les individus (Fordtran et al., 1967) et a lieu majoritairement dans l'intestin grêle proximal (Fordtran et al., 1965). De plus, l'absorption des polyols est incomplète dans 60-70% des personnes saines, comme pour les patients atteints par le SII (Hyams, 1983; Yao et al., 2014). Ils sont naturellement présents dans les fruits, les légumes, les gommes à mâcher sans sucre (10x la quantité retrouvée dans les fruits et légumes) (Yao et al., 2014). Les malades en consomment moins de 1 g par jour (Staudacher et al., 2012).

Les polysaccharides : Les polysaccharides à chaînes longues, et notamment ceux de la paroi cellulaire des plantes tels que la cellulose, l'hémicellulose ou la pectine, ne sont pas tous digérés et sont fermentés par le microbiote intestinal (Flint et al., 2012; Hartemink et al., 1999; Slavin et al., 1981). Ces HDC ont un degré de polymérisation plus important, sont fermentés plus lentement et produisent moins de gaz que les HDC à chaînes courtes décrits précédemment (Hernot et al., 2009). De petites quantités de protéines et de lipides entrent dans le côlon à partir des sources exogènes (alimentaires) et endogènes (par exemple, les globules rouges). Cependant, leurs effets sur la fermentation et les sous-produits métaboliques ne sont pas bien documentés (Scott et al., 2013).

a) Le rôle des FODMAPs dans les symptômes du SII

Les propriétés des HDC à chaînes courtes peuvent favoriser ou exacerber les symptômes des patients atteints par le SII.

Tout d'abord, un régime accru en HDC fermentables favorise l'augmentation de la teneur en eau de l'iléon dans un modèle d'iléostomie. Cette étude montre que les FODMAPs sont des molécules actives osmotiquement. Ils peuvent ainsi aggraver les douleurs abdominales et favoriser la diarrhée en absence d'adaptation de l'absorption colique (Barrett et al., 2010). L'ingestion d'une solution de mannitol a confirmé cette observation au niveau de l'intestin grêle par imagerie à résonance magnétique (Marciani et al., 2010).

La mesure des taux d'hydrogène et de méthane dans l'air expiré est utilisée pour évaluer la production de gaz émanant de la fermentation colique. Ainsi, une étude de Ong et de ses collaborateurs a montré qu'un régime élevé en FODMAPs favorise l'augmentation d'hydrogène expiré par des sujets sains et des patients atteints de SII par rapport à un régime pauvre en FODMAPs (Ong et al., 2010). Cependant, en opposition avec les contrôles, les malades présentent rapidement des symptômes gastro-intestinaux tels que des douleurs abdominales, des ballonnements, des gaz, des brûlures d'estomac et des nausées lors de la prise d'aliments riches en FODMAPs. Ces observations confirment que la fermentation bactérienne des HDC à chaînes courtes est importante et favorise l'induction de ballonnements, de flatulences excessives, de la distension abdominale et de douleurs chez des sujets souffrant d'hypersensibilité viscérale (Ong et al., 2010).

Une étude par scintigraphie de l'influence des HDC sur la motilité intestinale a montré que l'ingestion de fructose et de sorbitol diminue le temps de transit oro-caecal du bol alimentaire chez les personnes saines (Madsen et al., 2006). Les HDC peuvent donc perturber la motilité gastro-intestinale.

Enfin, une étude sur le rat a montré que l'ingestion de fructo-oligosaccharides favorise l'augmentation de la perméabilité intestinale (Bovee-Oudenhoven et al., 2003).

D'après ces observations, les HDC fermentables semblent être impliqués dans la majeure partie des symptômes observés chez les patients atteints par le SII. En effet, ils favorisent l'augmentation de l'osmolarité, la motilité, la production de gaz et la perméabilité intestinale. Ils sont ainsi une cible privilégiée pour le traitement de cette maladie.

Le syndrome de l'intestin irritable dans la famille des intolérances environnementales idiopathiques.

Les intolérances environnementales idiopathiques (IEI), également appelées à tort hypersensibilités chimiques multiples, regroupent des maladies qui se caractérisent par des symptômes multiples, récurrents et non spécifiques. Ces maladies sont liées à une réponse aberrante aux facteurs environnementaux d'origines physique, chimique ou biologique, et parmi lesquels on retrouve les xénobiotiques chimiques, les métaux, les radiations, la nourriture, les médicaments, les allergènes, les endotoxines. Bien que la plupart de ces agents soient reconnus comme toxiques, dans les IEI, les symptômes se produisent à des concentrations inférieures à celles connues pour susciter la toxicité (IP CS/WHO, 1996).

Les symptômes sont variables et ciblent principalement le système nerveux central, les voies respiratoires et muqueuses et/ou le tractus gastro-intestinal. La prévalence des IEI est plus forte chez les femmes (Bell et al., 2001) et les signes cliniques ont tendance à se chevaucher fortement entre les différentes conditions. Ainsi, plutôt que de considérer les symptômes comme isolés, les praticiens ont regroupé ces symptômes en différents syndromes tels que le SII, le syndrome de fatigue chronique, la fibromyalgie, le syndrome de la guerre du Golfe et d'autres affections symptomatiques (Kipen and Fiedler, 2002; Wiesmüller et al., 2003).

Comme décrit précédemment, les études sur les facteurs environnementaux susceptibles d'être impliqués dans le SII sont principalement focalisées sur le rôle de la nourriture et des infections virales ou bactériennes et aucune étude n'a évalué le rôle des polluants environnementaux dans la pathogénèse de cette maladie. Cependant, la pollution chimique environnementale joue un rôle primordial dans la physiopathologie des autres maladies appartenant aux IEI, telles que l'hypersensibilité chimique multiple (Gibson and Vogel, 2009), la fibromyalgie (Bradley, 2008; Buchwald and Garrity, 1994), le syndrome du Golf (également associé à l'Al) (Jamal, 1998; Petrik et al., 2007), et présentant des symptômes similaires au SII comme les douleurs abdominales, l'hypersensibilité et l'anxiété.

De plus, d'autres études semblent montrer que les polluants environnementaux favorisent l'apparition de symptômes qui sont également observés dans le SII. En effet, le système gastro-intestinal est fortement exposé aux polluants présents dans la nourriture, l'eau et l'air, notamment par la clairance mucociliaire (Möller et al., 2004). Les particules de l'air peuvent ainsi jouer un rôle non négligeable sur les perturbations du tube digestif.

Les études ont montré que les particules de l'air sont associées au développement et à la gravité des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Ananthakrishnan et al.,

2011; Kaplan et al., 2010), ainsi qu'à l'appendicite (Kaplan et al., 2009). Une étude épidémiologique a également mis en évidence que l'exposition à des polluants atmosphériques favorise des douleurs abdominales non spécifiques dans deux populations distinctes. L'inhalation de ces particules par des souris induisait également des perturbations de la motilité et de la sensibilité gastro-intestinale (Kaplan et al., 2012). Dans une autre étude, l'ingestion de particules par des souris induisait des modifications de la composition du microbiote et de la production d'acides gras à chaînes courtes traduisant des perturbations du processus de fermentation intestinale (Kish et al., 2013; Zarling and Ruchim, 1987). Enfin, ces particules favorisent le réarrangement des jonctions serrées de la barrière épithéliale à l'origine de l'augmentation de la perméabilité intestinale (Mutlu et al., 2011) et de la réponse immunitaire. Parmi les composants de ces particules, le bisphénol A (Braniste et al., 2010) et l'Al (Pineton de Chambrun et al., 2014) sont capables à eux seuls de perturber la perméabilité intestinale.

Ces différentes études montrent que l'ingestion de polluants environnementaux est la cause de symptômes similaires au SII. De plus, l'implication de ces polluants est déjà prouvée dans les maladies partageant une symptomatologie commune avec le SII.

Mon travail de thèse a permis d'étudier l'implication de l'un de ces polluants : l'Al, dans les perturbations de la sensibilité viscérale et les mécanismes liés à ce phénomène. Les résultats obtenus sont présentés dans la partie suivante.

Partie 2 : Résultats expérimentaux

Article 1 : Effets toxicologiques de l'exposition de cellules épithéliales intestinales humaines à de l'aluminium

Introduction

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction bibliographique, l'Al est le métal le plus abondant de notre environnement. Il est naturellement présent dans les sols, les minéraux, les roches et les terrains argileux. La biodisponibilité de l'Al est favorisée par l'activité humaine, notamment par les industries métallurgiques et l'utilisation d'engrais qui acidifient les sols et facilitent sa solubilisation et son absorption par les végétaux (Krewski et al., 2007). De nombreuses formes d'Al sont produites par l'industrie pour des produits d'utilisation courante. Parmi ses diverses applications, l'Al est utilisé comme additif alimentaire et comme agent de traitement pour l'eau potable. Il est également présent dans les emballages alimentaires, les ustensiles de cuisine et de nombreux médicaments. Ainsi, les voies d'exposition à l'Al sont multiples et l'ingestion d'Al présent dans la nourriture représente une voie d'exposition majeure. Les données sur les doses d'exposition humaine varient considérablement entre les différentes études, les pays et les populations ciblées. En 2006, la dose hebdomadaire tolérable a été fixée à 1 mg/kg en Europe (EFSA, 2008) puis réévaluée de façon provisoire à 2 mg/kg en 2011 (JECFA, 2011). Cependant, la dose d'Al ingérée peut excéder cette recommandation dans une proportion non négligeable de la population et les dosages de l'Al dans les produits de consommation courante ont montré que la dose d'exposition maximale par l'alimentation peut atteindre 20,8 mg/kg/j (EFSA, 2013). En général, les doses moyennes d'ingestion journalière d'Al semblent comprises entre 40 et 500 µg/kg/j dans les pays industrialisés (Arnich et al., 2012; Rose et al., 2010; Yang et al., 2014).

La toxicité de l'Al a été étudiée dans de nombreux modèles *in vitro*, et *in vivo* et son implication est démontrée ou suspectée dans diverses pathologies chez l'Homme. Les propriétés de l'Al permettent de penser qu'il pourrait être impliqué dans la physiopathologie de la maladie de Crohn (Lerner, 2007). En accord avec cette hypothèse, nous avons montré au sein du laboratoire que l'Al aggravait l'inflammation colique spontanée ou induite chimiquement chez la souris. Dans cette même étude, nous avons montré que le traitement de cellules épithéliales intestinales par de l'Al favorisait l'augmentation de l'expression de certaines

cytokines inflammatoires et perturbait la prolifération cellulaire (Pineton de Chambrun et al., 2014). Alors que la toxicité de l'Al sur les épithéliums pulmonaires et mammaires a déjà été démontrée (AbdelMageed et al., 2014; Lin et al., 2008), aucune étude n'a évalué la toxicité de l'Al sur la muqueuse intestinale qui représente le premier site de contact avec l'Al ingéré.

Peu de données existent concernant les effets de l'Al sur l'épithélium intestinal et le but de cette étude était de mieux comprendre les effets de l'Al en évaluant son rôle sur la viabilité cellulaire, l'apoptose, la prolifération, les fonctions mitochondriales et le stress oxydatif dans une lignée de cellules épithéliales intestinales. Puis, pour comprendre les mécanismes impliqués dans les perturbations des fonctions cellulaires, nous avons évalué les variations du transcriptome des cellules traitées par l'AlP.

Résultats

Toxicological consequences of experimental exposure to aluminum in human intestinal epithelial cells

Authors: M Djouina^{1,2}, N Esquerre^{1,2}, P Desreumaux¹, C Vignal¹, M Body-Malapel¹

Food and Chemical Toxicology, 2016

1. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U995 - LIRIC - Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France

2. Contributed equally to this work.

Corresponding author: Dr. Mathilde Body-Malapel

Address: U995. Faculté de Médecine. Pôle Recherche 1 place Verdun Lille 59045 France

E-mail address: mathilde.body@univ-lille2.fr

Highlights:

- Cytotoxicity, mitochondrial membrane depolarization and G1/S arrest were induced by aluminum (200 µg/ml, 24h).

- ROS generation appeared from 800 µg/ml aluminum treatment.
- Carcinogenesis and inflammation are the most modulated processes upon aluminum treatment.

Keywords: Aluminum. HT-29 cells. Cytotoxicity. Transcriptomics.

Abstract:

Aluminum (Al), a non-essential element, is ubiquitous in industrialized societies. Whereas adult intake is estimated between 3 and 12 mg/day according to dietary aluminum studies conducted in many countries, it is not known if aluminum may have a toxic effect on intestinal epithelium. The aim of this work was to evaluate the cytotoxicity and RNA expression patterns induced in HT-29 cells by aluminum. Both classical toxicological methods and a global transcriptomic approach were used. Cytotoxicity determined by MTT assay showed a time and dose dependent decrease of cell viability in aluminum treated cells compared to control cells. Cell cycle analysis by flow cytometry revealed that aluminum induced accumulation of cells in phase G0/G1, associated with a decrease in the proportion of cells in S and G2/M phases. Aluminum led to apoptosis as evidenced by nuclear morphology changes and mitochondrial membrane perturbations, and induced reactive oxygen species generation. Transcriptomic pattern argued in favor of pro-tumorigenic and pro-inflammatory effects of aluminum in intestinal epithelial cells. These results highlight several pathways by which aluminum has a disturbing impact on intestinal epithelial cells, supporting that the effects of aluminum on intestine warrants further investigation.

1. Introduction

Aluminum occurs naturally in the environment and is also released due to anthropogenic activities such as mining and industrial uses in the production of aluminum metal and other aluminum compounds (EFSA 2008). A variety of aluminum compounds are produced and used for different purposes, such as in water treatment, papermaking, fire retardant, fillers, food additives, colors and pharmaceuticals. Aluminum metal, mainly in the form of alloys with other metals, has many uses including in consumer appliances, food packaging and cookware.

Therefore, ingestion of aluminum from both the diet and drinking water is a common form of human exposure. The French population's mean exposure to aluminum in food is estimated at 40,3 $\mu\text{g/kg bw/day}$ in adults and 62,2 $\mu\text{g/kg bw/day}$ in children (Arnich et al. 2012). In other European countries, the levels of aluminum exposure via food range between 28,6 $\mu\text{g/kg bw/day}$ and 214 $\mu\text{g/kg bw/day}$ with the highest exposure levels in Spain (Canary Islands) for adults and in UK for children (Gonzalez-Weller et al. 2010; Rose et al. 2010). Mean exposure level in Canada was about 124 $\mu\text{g/kg bw/day}$ and 176 $\mu\text{g/kg bw/day}$ in China with the highest exposure levels observed in children 471,7 $\mu\text{g/kg bw/day}$ (Health-Canada 2007; Yang et al. 2014). Based on occurrence data for food in combination with consumption data, the survey on aluminum exposure highlighted that in France 0,2% of adults and 1,6% of children, a non-negligible part of the population in Canada and European countries and almost all the population in China, consume more aluminum than the health-based guidance value of 1mg/kg bw/week (143 $\mu\text{g/kg bw/day}$) established by the European Food and Safety authority (EFSA), considering food as the sole source of exposure to aluminum (Millour et al. 2011).

The intestinal epithelium is the first physiological barrier that aluminum meets after ingestion. Oral bioavailability, namely, the part of aluminum which is absorbed through the gut and reached the systemic circulation, is very low and considered to be between 0.1 and 1% (Powell and Thompson 1993). Therefore, the majority of ingested aluminum remains associated with the gut (Powell et al. 1994), nevertheless, the toxic effect that aluminum can have on the intestinal mucosa has scarcely been studied. This work aimed to evaluate the cytotoxic effects of aluminum on the HT-29 cell line, which is derived from human colorectal adenocarcinoma and that presents epithelial morphology. A transcriptomic approach was used as a complement to the classical tools for cytotoxicity testing, in order to highlight some mechanistic pathways affected by aluminum.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and aluminum treatments

Human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells (LGC Standards, France) were grown at 37°C under a 5% CO₂ humidified atmosphere, using DMEM supplemented with, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine (Invitrogen, France) and 10% fetal calf serum (Eurobio, France). Cells were seeded at the density of 1.0×10^4 cells/well into 96-well plates for quantitative analysis and 1.0×10^5 cells/well into 12-well plates, containing a sterile glass coverslip in each well, for morphological studies. After removing cell culture medium and washing in PBS, exponentially growing cells were incubated with new medium containing serial dilutions of aluminum phosphate (Sigma-Aldrich, France). Stock solution of Aluminum (5 mg/ml) was prepared in water and frozen at – 20°C. The working solutions, ranging from 0 to 800 µg/ml were prepared fresh.

2.2. MTT assay

HT-29 cells were incubated with increasing doses of aluminum (25µg/ml to 800µg/ml) for 24, 48 and 72 hours. At the end of incubation period, a 10 µl sample of the 5 mg/ml MTT (3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) stock solution was added to individual wells, and incubated for 4 h at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere (TACS® MTT Cell Proliferation Assay, Trivigen). When the purple precipitate is clearly visible under the microscope, 100 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well in order to solubilize

formazan crystals. The absorbance of the samples was read with a 570 nm filter using a multi-well assay plate reader (MDS Analytical Technologies, Saint-Grégoire, France).

2.3. Cell cycle analysis

To analyze cell cycle distribution, HT-29 cells treated for 24 hours with aluminum were collected by trypsinisation, washed with PBS and fixed with ice-cold 70% ethanol for 30 min at 4°C. Cells were then resuspended in 500 µl of staining buffer consisting of 2 µg/ml propidium iodide (MACS Miltenyi Biotec, Germany) and 2.5 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich, France), and incubated in the dark at 37 °C for 20 min. A total of 20,000 events were collected for each sample and nuclei were analyzed using a BD Accuri TM C6 flow cytometer (BD Biosciences, France).

2.4. Visualization of apoptotic cells

After 24 hours treatment with 100 and 200 µg/ml of aluminum , HT-29 cells were washed twice in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. Nuclear integrity was visualized by DNA staining with 10 µg/ml of fluorescent dye Hoechst 33258 (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, France). The stained nuclei were observed under a DM 5500 B fluorescence microscope (Leica Microsystemes, France).

2.5. JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit

Mitochondrial membrane potential (MMP) was assessed using the cyanine dye JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) (MitoProbe™ JC-1, Molecular Probe, ThermoFisher Scientific, France). Red emission from the dye is attributed to a potential-dependent aggregation of JC-1 in the mitochondria. Green fluorescence reflects

the monomeric form of JC-1, appearing in the cytoplasm after mitochondrial membrane depolarization. After treatment with 100 and 200 µg/ml of aluminum, HT-29 cells were incubated with JC-1 (2 µM) diluted in PBS at 37°C for 30 min. A mitochondrial membrane potential disrupter, CCCP (Carbonyl Cyanide 3-ChloroPhenylhydrazone) was used at 50 µM as a positive control for mitochondrial membrane depolarization. The cells were washed three times with PBS and 20,000 events were collected using a BD Accuri TM C6 flow cytometer.

2.6. Detection of reactive oxygen species

HT-29 cells were treated with increasing concentrations of Aluminum (from 50 to 800 µg/ml) for 24 hours. In order to measure the intracellular reactive oxygen species (ROS) level, we used the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (MolecularProbes, ThermoFisher Scientific, Saint Aubin, France) method. In brief, cells were loaded with 10 µM H₂DCFDA for 30 min at 37°C and then washed twice with PBS. H₂DCFDA is non-fluorescent until hydrolyzed by intracellular esterases and readily oxidized to the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS. Fluorescence was monitored on a Fluoroskan microplate reader (Thermo Scientific, USA) with excitation and emission wavelengths of 488 and 530 nm, respectively.

2.7. Transcriptome analysis

2.7.1. Treatment and mRNA expression level analysis

HT-29 cells were treated during 3h with aluminum (100 µg/ml). Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel) following the manufacturer's instructions. The RNA quality and concentration were determined by measuring the absorbance ratios 260/280

nm and 260/230 nm using a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) and a 2100 bioanalyser (Agilent Technologies).

Human Whole Genome Agilent 44K 60-mer oligonucleotide Microarray was performed according to the Two-Color Microarray-Based Gene Expression protocol (Agilent Technologies). Microarrays were scanned using the Agilent scanner G2505C and Feature Extraction software (v10.5). Data were processed with the GeneSpring (v10) for normalization, filtering, and statistical analysis. The genes upregulated or downregulated with a ≥ 1.5 fold-change and with statistical significance ($P < 0.05$) were sorted using asymptotic P value computation and Benjamini Hochberg false discovery rate multiple testing corrections.

2.7.2 Ingenuity Pathway Analysis

A list of differentially-expressed proteins and their gene/protein ID numbers was uploaded to the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software to investigate the biological networks associated with these proteins (<http://www.ingenuity.com>). The IPA program uses a knowledgebase derived from the scientific literature to relate genes or proteins based on their interactions and functions. IPA generates biological networks, canonical pathways and functions relevant to the uploaded dataset. Highly regulated biological networks and functions are identified using association rules among focus genes/proteins in a particular experiment. Each of these networks is scored and ranked for the enrichment of regulated genes/proteins in a particular network over competing networks. A right-tailed Fisher's exact test is used for calculating p-values to determine if the probability that the association between the proteins in the dataset and the functional and canonical pathway can be explained by chance alone. The final scores are expressed as negative log of p-values and used for ranking.

2.7.3. Validation of microarray results using real-time PCR.

The genes with the highest variability induced by aluminum, ie the most upregulated genes (FOSB, HMOX1, ANKRD30BP2, GDF15), and the most down-regulated genes (RBM43, HDC, PLXND1, DES) were validated by quantitative PCR.

Reverse transcription was performed using the High Capacity cDNA Archive kit and quantitative PCR with SybrGreen (Life Technologies). Primer sequences designed using Primer Express 3 (Life Technologies) are available under request. Melting curve analyses were performed for each sample and gene to confirm specificity of the amplification. Because the exposure to aluminum did not show any significant alterations of POLR2A mRNA expression, the relative expression of each gene of interest was normalized to the relative expression of this gene. The quantification of target gene expression was based on a comparative cycle threshold (Ct) value. The fold change of the target genes was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001).

3. Results

3.7. Cytotoxic effects of aluminum

Aluminum cytotoxicity was evaluated in HT-29 cells using the MTT assay, which measures mitochondrial metabolism. Since the conversion of MTT into formazan takes place in living cells, the amount of formazan produced is directly correlated with the number of viable cells present. We assess the range of concentrations from 25 to 800 $\mu\text{g/ml}$, which is current in metals cytotoxicity studies (Al-Qubaisi et al. 2013; Braydich-Stolle et al. 2010) and in studies evaluating the effects of aluminum *in vitro* (Eisenbarth et al. 2008; Franchi and Nunez 2008).

Aluminum phosphate, one of the main low molecular weight complexes of aluminum *in vivo* (Dayde et al. 1990), was used. As shown in figure 1, there was a decrease of viable cells after 72 hours of incubation with aluminum from the dose of 25 $\mu\text{g/ml}$, which was worsened in a dose-dependent manner. A significant decrease in MTT assay compared to control cells was noted in HT-29 cells treated during 24 hours or more with 200 $\mu\text{g/ml}$ of aluminum. A drastic diminution of cell viability according to time response effect on cell viability was observed at the dose of 800 $\mu\text{g/ml}$.

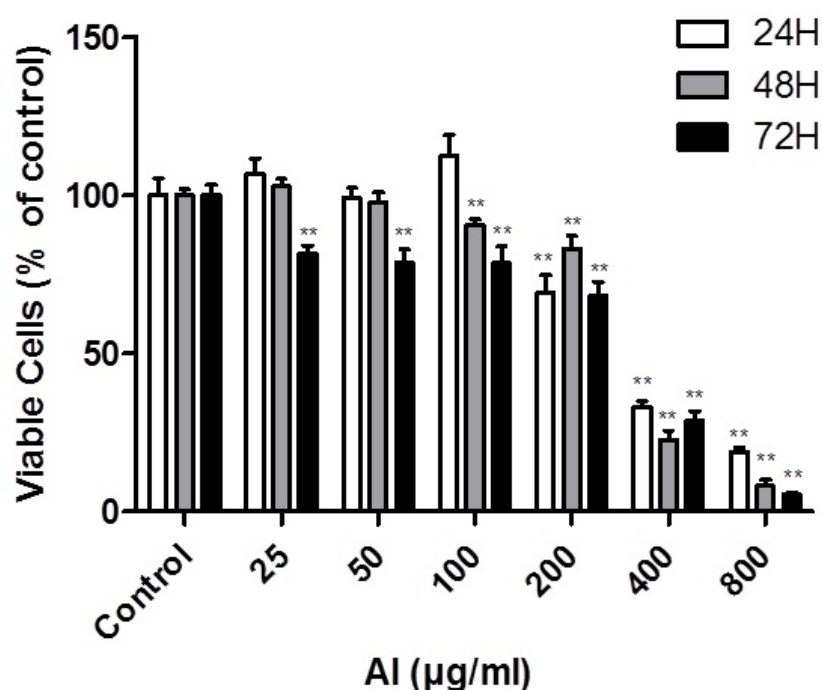


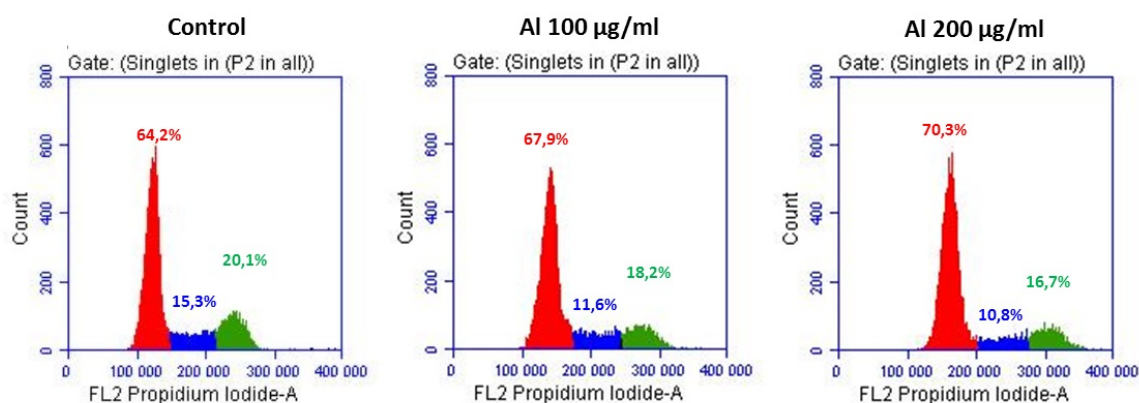
Figure 1. Cytotoxic effect of 24, 48 and 72 hours exposure to increasing Aluminum concentrations (from 0 to 800 $\mu\text{g/ml}$) on HT-29 cells measured by MTT assay (n= 6 per condition). Values are mean $\pm$ SEM. **p<0.01.

3.8. Effects of aluminum on cellular cycle

To determine whether aluminum regulates the cell cycle progression of HT-29 cells, asynchronous cells were treated with 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ aluminum for 24 hours. These

concentrations were selected based on their effect on cell death after 24 hours incubation (cf Figure 1): 100 $\mu\text{g/ml}$ is the highest concentration which did not induce cell death and 200 $\mu\text{g/ml}$ is the lowest concentration which started to induce cell death. DNA was stained with propidium iodide followed by FACS analysis. We observed a 106 and 112 % increase in the G0/G1 phase of the cell cycle, upon exposure to 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of aluminum respectively, compared to control cells. This was associated with a 10 and 30 % reduction in the proportion of cells in S phase, and a 14 and 16 % reduction in the proportion of cells in G2/M phase (Fig. 2). These results are indicative of an arrest at the G1/S restriction point.

A



B

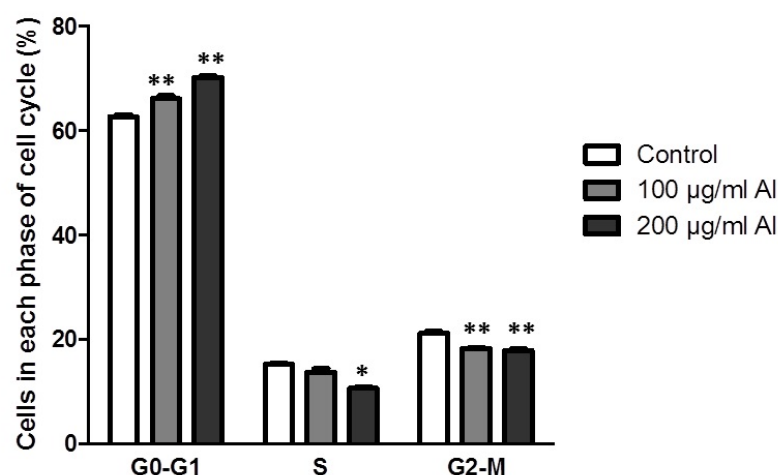


Figure 2. Cell cycle distribution in aluminum treated HT-29 cells. Cells were treated with aluminum at 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ during 24 hours ($n = 5$ per condition). A. Representative cell

cycle distribution in control cells and in cells treated with 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of aluminum. B. Percentage of cells in G0/G1, S and G2/M phases.

3.9. Effects of aluminum on nuclear morphology

To further explore the impact of aluminum on apoptosis, we evaluated the effects of treatment with aluminum at a non-cytotoxic dose (100 $\mu\text{g/ml}$) and at the first cytotoxic dose (200 $\mu\text{g/ml}$) on nuclear morphology and mitochondrial membrane depolarization. The changes in nuclear morphology of HT-29 cells following 24 hours exposure to 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ aluminum were analyzed under a fluorescence microscope by Hoechst 33258 staining (Fig 3). HT-29 cells in the untreated group showed normal shape with round intact nuclei, whereas the aluminum-treated cells became more scarce and showed reduced nuclear size, strong fluorescent spot, and pyknotic nuclei, especially at the 200 $\mu\text{g/ml}$ aluminum concentration. At both 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of aluminum, some cells exhibit brighter nuclei, because of the nuclear fragmentation and chromatin condensation which are hallmarks of apoptosis.

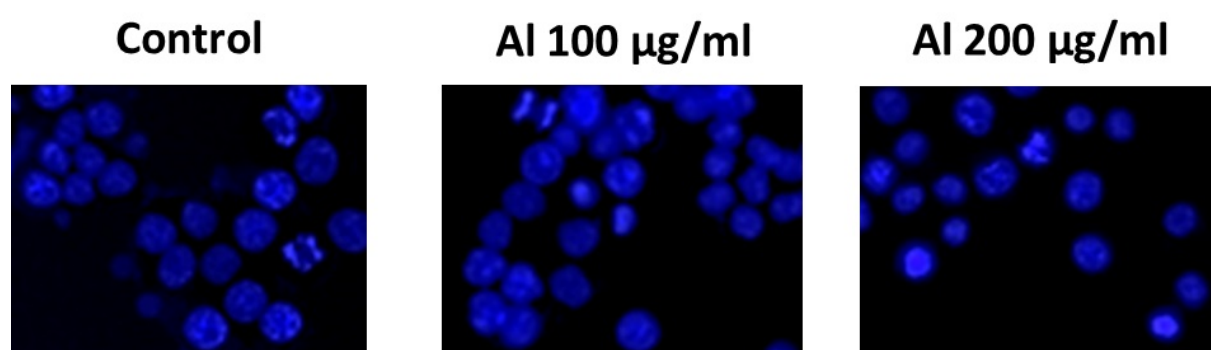


Figure 3: Effect of aluminum on nuclear morphology of HT-29 cells. Cells were stimulated with aluminum at 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ during 24 hours (n=4 per condition). Representative pictures

of cells stained with Hoechst 33258 and visualized under a fluorescence microscope (magnification x400).

3.10. Effects of aluminum on mitochondrial membrane potential

We investigated the effect of aluminum on mitochondrial membrane potential (MMP) by using a fluorescence-based mitochondria-specific voltage-dependent dye, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazol-carbocyaniniodide (JC-1) (Fig 4). MMP provides a valuable indicator of cells health and functional status. JC-1 is a lipophilic cationic dye that enters the mitochondria in a concentration that is proportional to the membrane potential. Mitochondria with normal membrane potential concentrate JC-1 into aggregates (red fluorescence), while in depolarized mitochondria JC-1 forms monomers (green fluorescence). As compared to control cells, aluminum treated cells exhibit a shift from red to green fluorescence (reduced JC-1 aggregation), reflecting a mitochondrial membrane permeabilization, indicative of apoptosis. As a positive control, HT-29 cells were incubated with CCCP, an uncoupling agent that fully abolishes the MMP.

A

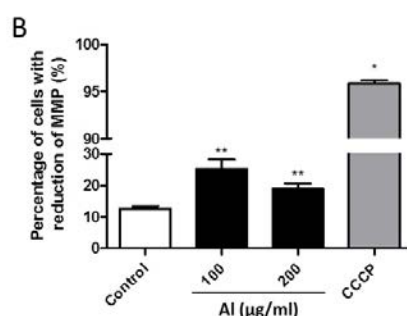
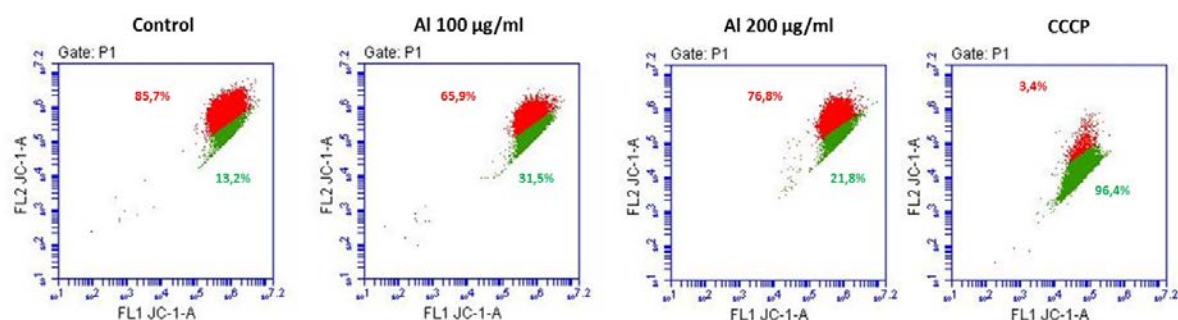


Figure 4: Effect of aluminum on mitochondrial membrane potential. HT-29 cells were treated with 100 and 200 µg/ml aluminum for 24h, then stained with JC-1 (n=5 per condition). (A) Representative dot plot from a single analysis. (B) Percentage of cells with reduced mitochondrial membrane potential (MMP). Incubation of cells with CCCP was used as a positive control of mitochondrial membrane perturbation.

3.5. Effects of aluminum on intracellular ROS production

The capacity of aluminum to cause oxidative stress was evaluated in HT-29 cells by a converting reaction of dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) to dichlorofluorescein (DCF), which mainly derives from the intracellular production of hydrogen peroxide. DCFDA is deacetylated by esterases to form DCFH, a non-fluorescent compound that is transformed into DCF, highly fluorescent, after reacting with intracellular ROS. Cells treated for 24 hours with aluminum showed a 165 % increase of DCF fluorescence at the dosage of 800 µg/ml (Fig 5), reflecting an increase production of ROS.

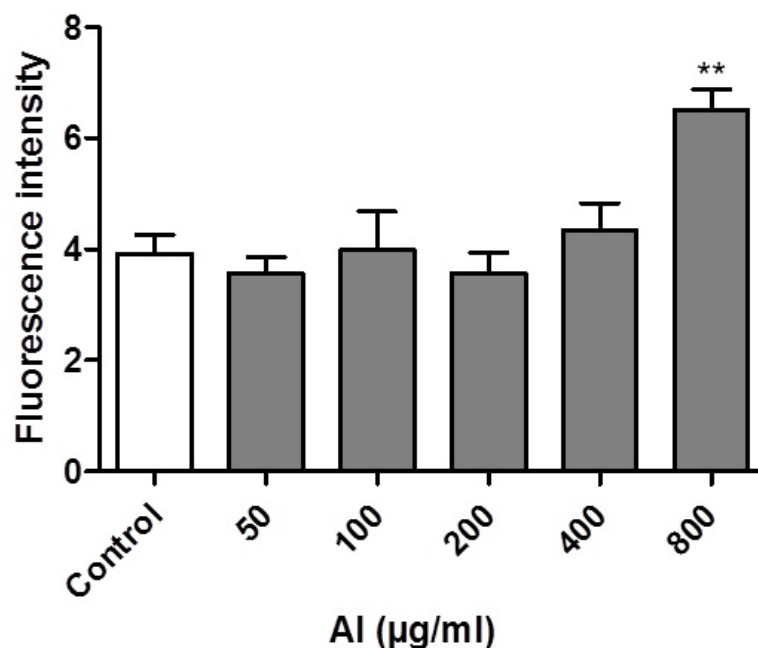


Figure 5: Effect of aluminum on ROS production. HT29 cells were treated with increasing concentrations of aluminum (from 50 to 800 µg/ml) for 24 hours (n=6 per condition). Intracellular ROS levels were quantified using the H₂DCFDA method. The values represent mean ± SEM.

3.6. Transcriptomic effects of aluminum

In order to get a better understanding of which molecular pathways might be affected by aluminum, we investigated the gene expression profiles of HT-29 cells treated for 24 hours with the non-cytotoxic dosage of 100 µg/ml. To identify aluminum-affected transcripts, significant change was defined as transcripts with an absolute change of ≥ 1.5 compared with the control group and a $p \leq 0.05$. Using these criteria, 41 transcripts were differentially expressed after aluminum incubation. Twenty-five genes demonstrated a significant increase in expression, and 16 showed repression (Table 1). The highest up-regulations were observed for FOSB (fold 2,8), HMOX1 (fold 2,7), ANKRD30BP2 and GDF15 (fold 2.0), and IL8 (fold 1.9).

The highest down-regulations were observed for RBM43 (fold -2.4), HDC, PLXND1, and DES (fold -2). The 4 most up-regulated genes detected by microarray analysis were confirmed to be up-regulated by real-time PCR analysis (Figure 6). Real-time PCR also confirmed the trend to downregulation observed for RBM43, PLXND1 and DES. Some undetermined values in aluminum treated samples precluded any quantification for HDC gene.

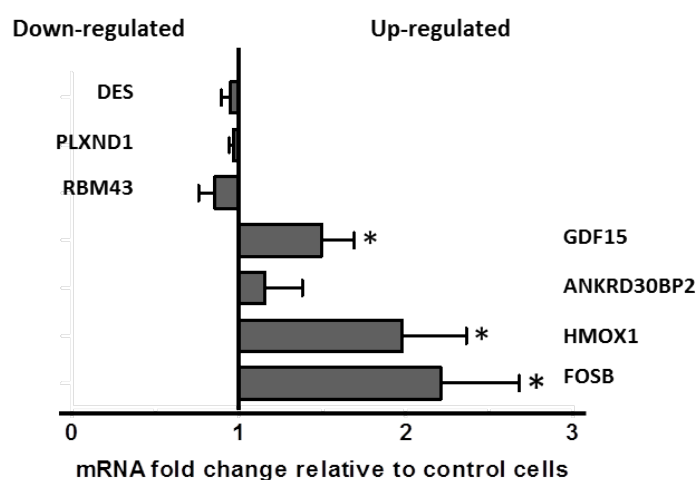


Figure 6: Validation of microarray data by real-time PCR analysis. Average fold changes induced in HT-29 cells by aluminum treatment (100 µg/ml, 24 h) relative to untreated cells.

We investigated the biological interaction among the genes associated with aluminum exposure using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) functional analysis. The genes with greatest magnitude of differential expression were submitted to IPA for human diseases and disorders; molecular and cellular functions; and physiological system development and functions (Table 2). The most significant diseases and disorders biological functions associated with aluminum were related to cancer. Cell death and survival was the top significant molecular and cellular functions induced by aluminum. And, hematological system development and function was

the most significant physiological system development and functions categories linked to aluminum.

IPA Tox function analysis was also performed to identify toxicity that might be occurring to any particular systems. Based on the extent of alterations in the gene expression, IPA Tox function analysis predicted significant increased levels of LDH, hematocrit alterations, and significant heart (13 molecules), liver (8 molecules) and kidney (12 molecules) toxicity (Table 3).

The de novo network analysis used the gene lists derived from the microarray data from these experiments and found known relationships between the genes that created the pathways (Fig 7).

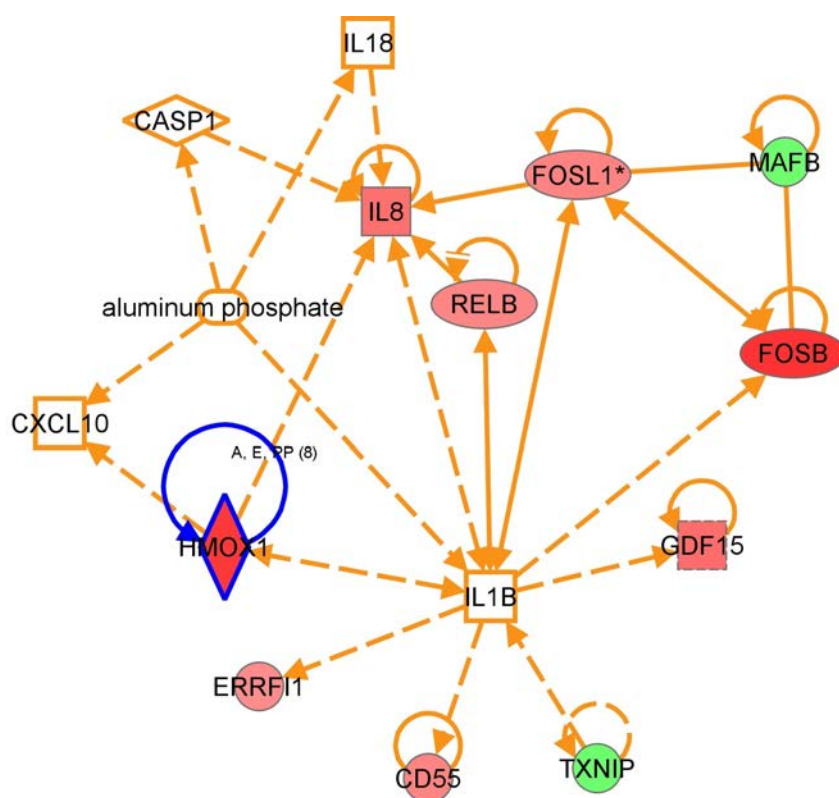


Figure 7: De novo pathways analysis based on significant changes quantified in HT29 cells incubated with aluminum. Pathways were built with Ingenuity Pathway Analysis taking the genes with significant expression changes and identifying known relationships between these

genes. Green indicates down-regulated genes and red indicates up-regulated genes. The white genes did not have significant gene expression changes but link the genes in the network that are significantly modulated. The intensity of the color indicates the degree of the expression change. Solid lines indicate direct interaction, while dashed lines indicate indirect interaction. Lines indicate binding between molecules, while arrows indicate molecule that can act on another which may or may not also bind.

4. Discussion

An increasing body of evidence implicates aluminum as a potentially hazardous environmental agent. Aluminum has a causal role in the encephalopathy, osteomalacia, and microcytic anemia of chronic renal failure (Wills and Savory 1985). Besides, studies demonstrating the neurotoxicity of aluminum both in experimental animals and in humans continue to accumulate, feeding the still controversial link between aluminum and Alzheimer's disease (Wang et al. 2015). Furthermore, a role of aluminum is suspected as an adjuvant for induction of Crohn's disease (Lerner 2007), a highly debilitating disease characterized by an excessive uncontrolled intestinal inflammation, of which incidence is particularly elevated in industrialized countries and in rise in emerging countries (Cosnes et al. 2011). Recently, it has been demonstrated that ingestion of an environmentally relevant dose of aluminum worsened intestinal inflammation in mice with chemically-induced and spontaneous colitis (Pineton de Chambrun et al. 2014). Aluminum increased the intensity and duration of macroscopic and histologic inflammation, colonic myeloperoxidase activity, inflammatory cytokines expression, and decreased the intestinal epithelial cell renewal compared with control animals. Furthermore, after its ingestion, 38% of aluminum accumulates within the intestinal mucosa, which makes the gut the main storage for aluminum in the body (Powell et

al. 1994). Although the data on the amounts of aluminum actually present in the human intestinal lumen and mucosa are not available, it can be speculated that they reach high levels, especially in the case of chronic exposure (Vignal et al. 2016). Despite these data arguing in favor of a potential hazard of ingested aluminum for intestinal homeostasis, basic knowledge of the cytotoxic impact of aluminum on intestinal epithelial cells was not available. Therefore, in this work, we studied the impact of aluminum on the HT-29 cell line.

We determined that aluminum phosphate induced cytotoxicity, assessed by MTT, starting from 25 µg/ml. In human pneumocytes (the bronchoalveolar carcinoma-derived cells A459), exposure to Al₂O₃ nanoparticles for 24 hours at 10 and 25 µg/ml doses significantly decreased cell viability compared to control (Lin et al. 2008). In mammary epithelial cells, both AlCl₃ and AlO₄P₃ started to decrease cell proliferation at doses as low as 12.8 µM (AbdelMageed et al. 2014). Therefore, our findings in intestinal epithelial cells are in line with data reported in other epithelial cell lines. Moreover, it must be highlighted that intestinal epithelial cells are likely more exposed to aluminum than pulmonary or mammary cells, as the principal route of aluminum entry is the ingestion of food containing aluminum (EFSA 2008; Saiyed and Yokel 2005). Indeed, when we measured in the general population aluminum levels present in colon wall; an amount of 114 µg of aluminum /g dry weight was reached (unpublished data). This concentration detected in the whole colon wall is presumably underestimated compared to the one present in the gut lumen, directly in contact with the intestinal cells. Therefore, even if this study on the aluminum levels in human digestive tissues must be completed to draw definitive conclusion, data available to date allow us to speculate that the concentrations of aluminum used in this study are physiologically realistic.

After 24 hours of treatment with 200 µg/ml of aluminum, HT-29 exhibited an important level of cell death quantified by cytotoxicity assay, which is concordant with the increase of

mitochondrial depolarization observed by JC-1 assay. This is associated with the arrest of some cells at the G1/S restriction point, which can contribute to reduced cell proliferation. In accordance to these data, it has been shown that aluminum citrate incubation for 5 days (50 µg/ml) inhibited Caco-2 epithelial cell proliferation by 440% without modification of cell death (Pineton de Chambrun et al. 2014). Similarly *in vivo*, aluminum citrate administration to mice for 10 days after dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis was associated with an inhibition of epithelial cell proliferation, compared to control animals. Further studies have to explore the clinical impact of cytotoxicity and cellular proliferation inhibition induced by aluminum on intestine.

One of the most popularly proposed modes of action for metal toxicity is oxidative stress. The results obtained in the present study showed that aluminum induces oxidative stress from the 800 µg/ml concentration. These data are in line with the reported decrease of intestinal glutathione levels observed in rats orally treated with 200 mg/kg of aluminum during 7 days (Orihuela et al. 2005). Nevertheless, the cytotoxicity observed below 800 µg/ml concentration is not associated with ROS production. Therefore, generation of ROS does not appear as a key mechanism of aluminum induced cytotoxicity.

In order to identify genes whose expression was affected by aluminum, we used a microarray including a large number of transcripts, combined with Ingenuity-based analysis. This assay brought us several data converging towards a tumorigenic effect of aluminum in intestinal epithelial cells. Firstly, an upregulation of 2 members of the AP-1 family, FOSB and FOSL1, was observed. Blocking of FOS inhibit colon tumor growth in a xenograft model (Pandey et al. 2012). FOSL1 (also known as FRA1) is strongly expressed in tumor cells at the invasive front of human colorectal cancers (CRC), and directly controls epithelial-mesenchymal plasticity in CRC cells (Diesch et al. 2014). Similarly, HMOX-1 (Heme oxygenase-1) is involved in carcinogenesis

and tumor progression (Chau 2015). Although HMOX-1 is an endoplasmic reticulum resident protein, HMOX-1 nuclear localization is evident in tumor cells of cancer tissues. It has been shown that HMOX-1 is susceptible to proteolytic cleavage and translocates to nucleus to facilitate tumor growth and invasion independent of its enzymatic activity. In cancer cells, HMOX-1 overexpression promotes proliferation and survival. Upregulation of GDF15 by aluminum could also participate to CRC promotion. GDF15 (Growth differentiation factor 15, also known as PTGF-b, TGF-PL or MIC-1) serves as a negative prognostic marker in CRC, and high expression of GDF15 in tumor tissue and high plasma levels correlate with an increased risk of recurrence and reduced overall survival (Wallin et al. 2011). Nevertheless, as histidine decarboxylase expression and activity are upregulated in CRC tumors, and its activity is higher in metastatic tumors than in no-metastatic ones, the down regulation of HDC by aluminum is discordant with the potential carcinogenic effect of aluminum in intestine (Cianchi et al. 2005). Besides, microarray data gave several lines of evidence supporting a pro-inflammatory effect of aluminum in intestinal epithelial cells. HMOX-1 expression has been found upregulated by several pollutants such as ultrafine particles in macrophages and pulmonary epithelial cells (Li et al. 2003), or by the mycotoxin deoxynivalenol in colon of intoxicated piglets (Alizadeh et al. 2015). HMOX-1 is usually used in toxicology as a sensitive marker of oxidative stress. Furthermore, HMOX-1 is highly induced in colon of ulcerative colitis patients (Takagi et al. 2008). Upregulation of IL8 could also contribute to both pro-inflammatory and pro-tumorigenic effects of aluminum in HT-29. IL-8, also called CXCL8, belongs to a superfamily of chemically related chemokines that stimulate neutrophil chemotaxis and degranulation. IL-8 is rapidly generated in the presence of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α and IL-1 β . Once generated, IL-8 binds to specialized proteins, called CXCR2 receptors, on the surface of nearby cancer cells. Binding of IL-8 to CXCR2 leads to activation of various transcription

factors, including NF- κ B and AP-1, via the Akt and MAPK signaling pathways, that ultimately causes the growth and survival of colon cancer cells. Both in vitro and in vivo in colon cancer cells, overexpression of IL-8 promotes tumor growth, metastasis, chemoresistance and angiogenesis (Ning et al. 2011). Finally, as a role of HDC has been demonstrated in the control of *Y. enterocolitica* infection, its down regulation by aluminum suggest an unexpected role of aluminum in resistance to infection (Handley et al. 2006).

In the light of the results obtained, we can conclude that aluminum exerts a complex effect on intestinal epithelial cell, disturbing cell cycle progress, proliferation and inflammation. More detailed studies are required, therefore, to evaluate the possible physiopathological processes that exposure to aluminum, especially in chronic situations, may cause in intestinal mucosa and how those processes may affect its structure and functionality. Taken as a whole, our data support that aluminum belongs to metals which are not innocuous for intestinal epithelium.

Funding

NE was funded through Digestscience (European Research Foundation on Intestinal Diseases and Nutrition). This work was supported by IRENI (Institut de Recherche en ENvironnement Industriel, financed by the Communauté Urbaine de Dunkerque, the Région Nord Pas-de-Calais, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France), the CNRS (France) and the European Regional Development Fund (ERDF)).

Acknowledgements

The authors acknowledge Martin Figeac who performed the DNA microarray analysis and the ingenuity pathway analysis (Plateforme de génomique structurale et fonctionnelle, Université

Lille 2, France) and Beatrice Bernocchi (LIRIC UMR 995) for technical assistance in ROS detection experiment.

References

- AbdelMageed M, Foltopoulou P, Betancur-Boissel M, McNiel E. 2014. Differential effects of aluminum exposure on epithelial and mesenchymal cells. *Cancer Research* 74.
- Al-Qubaisi MS, Rasedee A, Flaifel MH, Ahmad SH, Hussein-Al-Ali S, Hussein MZ, et al. 2013. Cytotoxicity of nickel zinc ferrite nanoparticles on cancer cells of epithelial origin. *Int J Nanomedicine* 8:2497-2508.
- Alizadeh A, Braber S, Akbari P, Garssen J, Fink-Gremmels J. 2015. Deoxynivalenol impairs weight gain and affects markers of gut health after low-dose, short-term exposure of growing pigs. *Toxins (Basel)* 7:2071-2095.
- Arnich N, Sirot V, Riviere G, Jean J, Noel L, Guerin T, et al. 2012. Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd french total diet study. *Food Chem Toxicol* 50:2432-2449.
- Braydich-Stolle LK, Speshock JL, Castle A, Smith M, Murdock RC, Hussain SM. 2010. Nanosized aluminum altered immune function. *ACS Nano* 4:3661-3670.
- Chau LY. 2015. Heme oxygenase-1: Emerging target of cancer therapy. *J Biomed Sci* 22:22.
- Cianchi F, Cortesini C, Schiavone N, Perna F, Magnelli L, Fanti E, et al. 2005. The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 11:6807-6815.
- Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. 2011. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140:1785-1794.
- Dayde S, Filella M, Berthon G. 1990. Aluminum speciation studies in biological fluids. Part 3. Quantitative investigation of aluminum-phosphate complexes and assessment of their potential significance in vivo. *J Inorg Biochem* 38:241-259.
- Diesch J, Sanij E, Gilan O, Love C, Tran H, Fleming NI, et al. 2014. Widespread fra1-dependent control of mesenchymal transdifferentiation programs in colorectal cancer cells. *PLoS One* 9:e88950.
- EFSA. 2008. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials (afc). Safety of aluminium from dietary intake. *The EFSA Journal* 754:1-34.
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. 2008. Crucial role for the nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453:1122-1126.
- Franchi L, Nunez G. 2008. The nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated il-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 38:2085-2089.
- Gonzalez-Weller D, Gutierrez AJ, Rubio C, Revert C, Hardisson A. 2010. Dietary intake of aluminum in a spanish population (canary islands). *J Agric Food Chem* 58:10452-10457.
- Handley SA, Dube PH, Miller VL. 2006. Histamine signaling through the h(2) receptor in the peyer's patch is important for controlling yersinia enterocolitica infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9268-9273.
- Health-Canada. 2007. Canadian total diet study. Dietary intakes of contaminants & other chemicals for different age-sex groups of canadians.
- Lerner A. 2007. Aluminum is a potential environmental factor for crohn's disease induction: Extended hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 1107:329-345.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 111:455-460.
- Lin W, Stayton I, Huang Y-W, Zhou X-D, Ma Y. 2008. Cytotoxicity and cell membrane depolarization induced by aluminum oxide nanoparticles in human lung epithelial cells a549. *Toxicological & Environmental Chemistry* 90.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods* 25:402-408.
- Millour S, Noel L, Kadar A, Chekri R, Vastel C, Sirot V, et al. 2011. Pb, hg, cd, as, sb and al levels in foodstuffs from the 2nd french total diet study. *Food Chem* 126:1787-1799.
- Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, et al. 2011. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer* 128:2038-2049.

Orihuela D, Meichtry V, Pregi N, Pizarro M. 2005. Short-term oral exposure to aluminium decreases glutathione intestinal levels and changes enzyme activities involved in its metabolism. *J Inorg Biochem* 99:1871-1878.

Pandey MK, Liu G, Cooper TK, Mulder KM. 2012. Knockdown of c-fos suppresses the growth of human colon carcinoma cells in athymic mice. *Int J Cancer* 130:213-222.

Pineton de Chambrun G, Body-Malapel M, Frey-Wagner I, Djouina M, Deknuydt F, Atrott K, et al. 2014. Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol* 7:589-601.

Powell JJ, Thompson RP. 1993. The chemistry of aluminium in the gastrointestinal lumen and its uptake and absorption. *Proc Nutr Soc* 52:241-253.

Powell JJ, Ainley CC, Evans R, Thompson RP. 1994. Intestinal perfusion of dietary levels of aluminium: Association with the mucosa. *Gut* 35:1053-1057.

Rose M, Baxter M, Brereton N, Baskaran C. 2010. Dietary exposure to metals and other elements in the 2006 uk total diet study and some trends over the last 30 years. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 27:1380-1404.

Saiyed SM, Yokel RA. 2005. Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives. *Food Addit Contam* 22:234-244.

Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Nukigi Y, Okada H, Suzuki T, et al. 2008. Increased intestinal expression of heme oxygenase-1 and its localization in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 23 Suppl 2:S229-233.

Vignal C, Desreumaux P, Body-Malapel M. 2016. Gut: An underestimated target organ for aluminum. *Morphologie DOI* : 10.1016/j.morpho.2016.01.003.

Wallin U, Glimelius B, Jirstrom K, Darmanis S, Nong RY, Ponten F, et al. 2011. Growth differentiation factor 15: A prognostic marker for recurrence in colorectal cancer. *Br J Cancer* 104:1619-1627.

Wang Z, Wei X, Yang J, Suo J, Chen J, Liu X, et al. 2015. Chronic exposure to aluminum and risk of alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neurosci Lett*.

Wills MR, Savory J. 1985. Water content of aluminum, dialysis dementia, and osteomalacia. *Environ Health Perspect* 63:141-147.

Yang M, Jiang L, Huang H, Zeng S, Qiu F, Yu M, et al. 2014. Dietary exposure to aluminium and health risk assessment in the residents of shenzhen, china. *PLoS One* 9:e89715.

Tables

Up-regulated genes	
Name	Fold change
FOSB	2,798
HMOX1	2,703
ANKRD30BP2	2,041
GDF15	1,995
IL8	1,935
AGPAT9	1,844
FOSL1	1,687
CLCF1	1,682
SYT15	1,676
CD55	1,675
RELB	1,656
FOSL1	1,654
GCLM	1,643
SLC7A11	1,615
GCLM	1,613
CLIP4	1,590
DHRS9	1,569
OK/SW-CL.58	1,562
SLC7A11	1,558
ERRFI1	1,558
C1orf114	1,537
SLC7A11	1,536
TMEM88	1,520
STXBP5L	1,515
DMD	1,508
Down-regulated genes	
Name	Fold change
RBM43	-2.392
HDC	-1.994
PLXND1	-1.980
DES	-1.962
MEIS1	-1.927
CDH7	-1.849
SPTLC3	-1.799
RIMBP3 (includes others)	-1.749
HS1BP3	-1.715
FBXL16	-1.651
TXNIP	-1,563
RNF144B	-1,552
MAFB	-1,540
CALHM2	-1,520
OR7G3	-1,519
FAM46B	-1,502

Table 1. Gene transcripts differentially expressed ≥ 1.5 in HT-29 cells following aluminum treatment (100 μ g/ml). Table displays the genes that are arranged according to their up- or down-regulated expression and to the magnitude of altered expression.

Diseases and disorders		
Name	p-value	# Molecules
Cancer	3.72E-07 - 2.07E-02	18
Gastrointestinal Disease	3.72E-07 - 1.33E-02	11
Cardiovascular Disease	3.13E-05 - 1.90E-02	11
Inflammatory Response	7.21E-05 - 2.25E-02	11
Endocrine System Disorders	1.33E-04 - 2.07E-02	6
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cell Death and Survival	1.62E-05 - 2.20E-02	18
Protein Synthesis	3.96E-05 - 2.42E-04	3
Cellular Movement	7.51E-05 - 2.25E-02	9
Cellular Development	1.56E-04 - 2.31E-02	14
Cellular Growth and Proliferation	1.56E-04 - 2.31E-02	14
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Hematological System Development and Function	4.55E-05 - 2.32E-02	15
Tissue Morphology	4.55E-05 - 2.32E-02	14
Immune Cell Trafficking	1.36E-04 - 2.25E-02	6
Tissue Development	1.36E-04 - 2.16E-02	12
Cardiovascular System Development and Function	1.67E-04 - 2.32E-02	9

Table 2. Biological functions associated with aluminum treatment in HT-29 cells. Key functional groups and their number of genes involvement in aluminum exposure by IPA analysis.

Assays: Clinical Chemistry and Hematology		
Name	p-value	# Molecules
Increased Levels of LDH	2.16E-02 - 2.16E-02	1
Increased Levels of Red Blood Cells	1.48E-01 - 1.48E-01	1
Increased Levels of Hematocrit	1.51E-01 - 1.51E-01	1

Cardiotoxicity		
Name	p-value	# Molecules
Cardiac Fibrosis	9.33E-04 - 1.33E-02	3
Cardiac Infarction	2.39E-03 - 2.39E-03	3
Cardiac Necrosis/Cell Death	3.38E-03 - 3.38E-03	3
Heart Failure	1.33E-02 - 1.53E-01	2
Congenital Heart Anomaly	1.90E-02 - 7.74E-02	2
Hepatotoxicity		
Name	p-value	# Molecules
Liver Inflammation	1.13E-03 - 1.13E-03	3
Liver Damage	8.35E-03 - 8.35E-03	1
Liver Fibrosis	1.33E-02 - 1.33E-02	2
Liver Regeneration	1.83E-02 - 1.83E-02	1
Liver Degeneration	4.59E-02 - 4.59E-02	1
Nephrotoxicity		
Name	p-value	# Molecules
Renal Necrosis/Cell Death	2.08E-04 - 5.70E-02	2
Kidney Failure	2.67E-03 - 1.35E-01	3
Renal Inflammation	6.68E-03 - 3.10E-01	3
Renal Nephritis	6.68E-03 - 3.10E-01	3
Glomerular Injury	1.24E-01 - 1.24E-01	1

Table 3: Toxicological functions associated with aluminum treatment in HT-29 cells. Key functional groups and their number of genes involvement in aluminum exposure by IPA toxicological analysis.

Conclusion

L'épithélium intestinal est une surface d'échange privilégiée entre le corps humain et le milieu extérieur. Les quantités d'Al ingérées et ses propriétés ont permis de suspecter un rôle adjuvant de l'Al dans l'induction de la maladie de Crohn (Lerner, 2007). De plus, nous avons montré au sein du laboratoire que l'Al aggravait l'inflammation colique et perturbait la muqueuse intestinale (Pineton de Chambrun et al., 2014). Par conséquent, nous avons choisi d'évaluer par ce travail de thèse les effets toxiques de l'Al sur l'épithélium intestinal.

Cette étude, réalisée sur les cellules épithéliales intestinales HT-29, a démontré que l'Al perturbait l'homéostasie cellulaire en exerçant un effet cytotoxique sur les cellules. En effet, nous avons montré que l'Al diminuait la viabilité cellulaire des cellules épithéliales intestinales de façon dose-dépendante. De plus, L'Al perturbe la morphologie cellulaire et favorise la dépolarisation mitochondriale ce qui pourrait entraîner une augmentation de l'apoptose, des

perturbations du cycle cellulaire et diminuer la prolifération des cellules HT-29. Aux faibles doses d'exposition, le stress oxydatif ne semble pas être la cause principale des phénomènes observés. Enfin, l'analyse transcriptomique est en faveur d'un effet carcinogène et pro-inflammatoire de l'Al sur la cellule épithéliale intestinale.

Ces données expérimentales suggèrent que l'Al perturbe l'homéostasie de la cellule épithéliale intestinale. Il faudrait maintenant comprendre plus précisément par quels mécanismes physiopathologiques l'Al perturbe la structure et les propriétés cellulaires.

Article 2 : L'ingestion d'aluminium favorise le développement d'une hypersensibilité colorectale chez les rongeurs.

Introduction

Les facteurs environnementaux, et notamment les facteurs ingérés tels que la nourriture, semblent jouer un rôle prépondérant dans la physiopathologie du SII. L'implication de la pollution chimique environnementale est bien décrite dans les autres maladies de la famille des intolérances environnementales idiopathiques et semble pouvoir influencer sur la douleur abdominale, la réponse immunitaire, les perturbations du microbiote et la perméabilité gastro-intestinale. Cependant, son rôle dans le SII n'a pas été étudié.

Parmi les polluants environnementaux présents dans l'air, le sol et l'alimentation, nous avons sélectionné l'Al comme xénobiotique majeur capable d'influer sur le SII. En effet, les modes de contamination chez l'homme sont multiples et notamment alimentaires via la consommation d'aliments riches en additifs, cultivés dans les sols acides riches en Al, les ustensiles de cuisine, l'eau de boisson particulièrement en zone urbaine, et la prise de certains médicaments. L'Al est retrouvé dans les fluides corporels et peut développer des effets mutagènes, pro-inflammatoires, immunogènes, excitotoxiques et pro-oxydants. De plus, l'Al a été associé à de nombreux phénomènes douloureux locaux ou généralisés, notamment au niveau intestinal, et semble participer à la pathogénèse de maladies présentant des phénomènes de douleurs chroniques comme le syndrome de la myofasciite à macrophages ou l'ostéomalacie.

Nous avons montré que l'administration orale d'Al avait un effet délétère sur l'intégrité de la barrière intestinale, en augmentant la translocation bactérienne de l'intestin vers les ganglions mésentériques, traduisant une augmentation de la perméabilité intestinale. De plus, les observations sur les doses d'exposition à l'Al et les effets sur l'organisme ainsi que sur la douleur nous ont amené à étudier son effet sur la sensibilité viscérale. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'ingestion d'Al pouvait favoriser l'hypersensibilité viscérale.

Le but de cette étude a été, dans un premier temps, d'évaluer l'impact de l'Al à des doses cohérentes avec l'exposition humaine sur la sensibilité viscérale, et dans un deuxième temps, de comprendre les mécanismes impliqués dans ce phénomène.

Matériel et Méthodes

Modèles animaux et traitements utilisés : Pour les expériences de tomographie par émission de positons, des rats adultes Sprague Dawley (100-150g) et des souris mâles C57BL/6 ont été fournis par Janvier. Les expériences ont été réalisées dans les animaleries de l'institut Pasteur de Lille et de l'université de Lille. Les souris génétiquement modifiées pour le gène PAR-2 et leurs contrôles sauvages ont été générés à Toulouse dans l'animalerie du centre de Physiopathologie de l'hôpital Purpan. Les souris génétiquement modifiées pour le gène kit C57BL/6 Kit^{W-sh/W-sh} ont été générées à l'institut Pasteur de Lille et les souris contrôles C57BL/6 ont été fournies par Janvier. L'intoxication par l'AlCi a été réalisée par voie orale pour tous les animaux. Ainsi, les rats ont reçu 0,5, 1,5 et 3 mg/kg/jour d'AlCi à des temps d'exposition variables en fonction de la dose. Les rats ont également reçu du ZnCi par voie orale à la dose de 1,5 mg/kg/jour, du Cromoglycate de Sodium par voie intrapéritonéale à la dose de 50 mg/kg/jour, de la morphine par injection sous cutanée à la dose de 1mg/kg 30 minutes avant la distension, du butyrate par voie rectale à la dose de 200Nm deux fois par jour pendant 3 jours et de l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) par voie rectale à la dose de 150 mg/kg un mois avant la distension. Les souris ont reçu 1,5 mg/kg/jour pendant 1 mois. L'AlCi, le ZnCi, le Cromoglycate de Sodium, le butyrate et le TNBS ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Etude de la sensibilité viscérale et de la distension colorectale chez le rat. Les rats mâles ont été acclimatés aux conditions de l'animalerie une semaine avant chaque expérience. L'hypersensibilité colique a été testée par distension colorectale. Le seuil de pression nécessaire pour induire une réponse comportementale du rat, se caractérisant par la contraction de l'abdomen en réponse au gonflement d'un ballon inséré dans le côlon, a été mesuré (Figure 12). Cette réponse se caractérise par une élévation de la partie postérieure de l'animal et une contraction abdominale bien visible. Les ballons de distension ont été préparés en ligaturant un ballon en latex souple de 2 cm de long à l'extrémité d'un cathéter de 2 mm de diamètre. Les rats ont été légèrement anesthésiés avec de l'isoflurane, puis le ballon a été inséré par l'anus jusqu'au côlon descendant laissant la fin du cathéter à 1 cm de l'anus et fixé à la queue avec de l'adhésif pour éviter l'éjection. Les animaux ont ensuite pu récupérer pendant 30 minutes avant le début de la distension. Un barostat électronique (Distender series II, G&J Electronics, Canada) a été utilisé pour réaliser les distensions colorectales. Le test a été réalisé avec des pressions croissantes continues jusqu'à observation d'un comportement douloureux ou jusqu'à

la pression maximale de 80mmHg. Toutes les expériences impliquant des animaux ont été approuvées par le comité d'éthique local.

Etude de la sensibilité viscérale et de la distension colorectale chez la souris. Trois jours avant l'expérience de distension colorectale, deux électrodes ont été implantées dans le muscle abdominal oblique externe des souris anesthésiées par un mélange de xylazine et de kétamine. Les électrodes ont ensuite été extériorisées à l'arrière du cou et protégées par une tubulure en plastique suturée à la peau. Lors de la distension, les électrodes ont été reliées à un amplificateur (Octal Bio Amp, ADInstruments, Inc, Colorado Springs, CO) connecté à un système d'acquisition d'électromyographie (ADInstruments, Inc, Colorado Springs, CO). Un cathéter composé d'un ballonnet de 10,5 mm de diamètre a été doucement introduit dans le côlon, 5 mm au dessus du rectum. Les animaux ont ensuite pu récupérer pendant 30 minutes avant le début de la distension. Le ballon a, par la suite, été gonflé de manière séquentielle avec des distensions de 10 secondes, à des pressions de 15, 30, 45, et 60 mm Hg et des intervalles de 5 minutes de repos entre chaque pression. L'activité électromyographique des muscles abdominaux a été enregistrée pendant les phases de distension et de repos (activité basale) et la réponse viscéromotrice de chaque animal a été calculée en utilisant un logiciel LabChart 5 (ADInstruments).

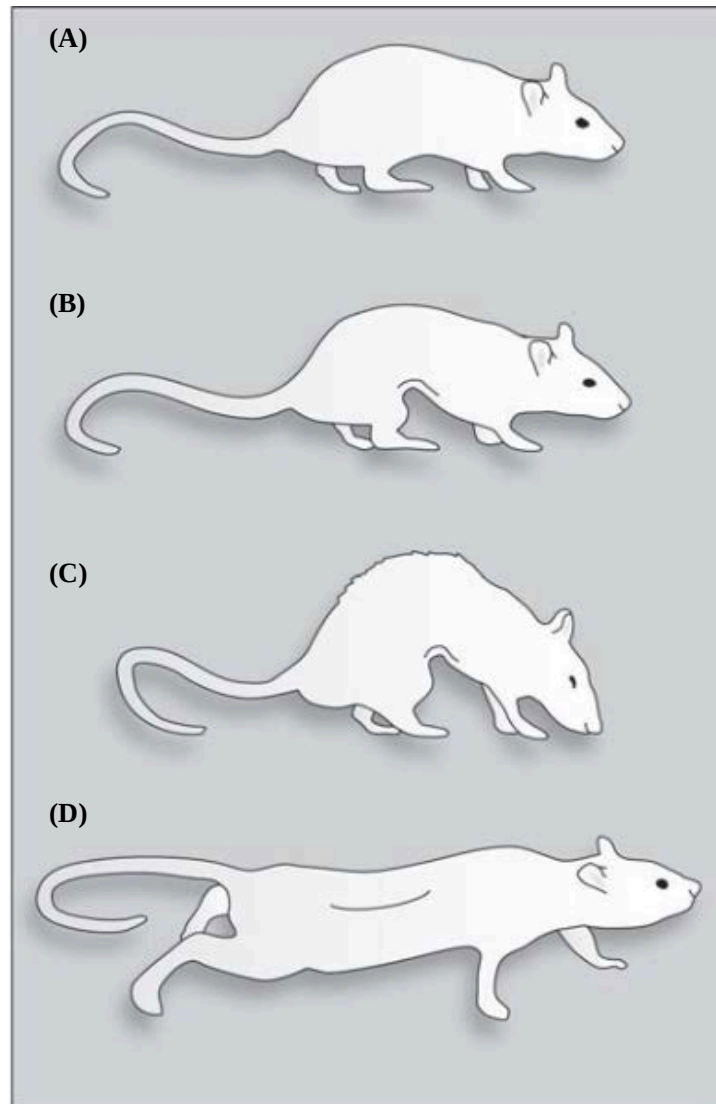


Figure 12 : Comportements du rat en réponse à la distension colorectale. Le réflexe de rétraction abdominal est causé par la contraction musculaire. La pression à laquelle le premier réflexe est observé est retenue comme le seuil nociceptif. On observe en A le comportement normal du rat. En B, la réponse comportementale précède la douleur. En C, le réflexe de rétraction abdominal (évalué comme le réflexe en réponse à la douleur) et en D, le réflexe d'étirement en réponse à la douleur (également évalué comme seuil nociceptif mais rarement rencontré)

Quantification des ARNm par PCR quantitative en temps réel. Des échantillons de côlon ont été homogénéisés à l'aide de billes en céramique et d'un appareil permettant de lyser les tissus (Precellys, Bertin Technologies). L'ARN total a été extrait à partir des broyats coliques avec le kit NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel). L'ARN a ensuite été converti en ADNc avec le kit de rétro transcription Applied Biosystems. L'expression des gènes, impliqués dans l'inflammation, la transduction de la douleur et la perméabilité intestinale, a été quantifiée à l'aide du système de PCR en temps réel StepOne™ et en utilisant du SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Les taux relatifs d'ARNm ont été déterminés selon la méthode de ΔC_t et les valeurs ont été normalisées sur l'expression des gènes de référence (Polr2a pour la souris et GAPDH pour le rat). (Tableau 1)

Tableau 1 : Amorces utilisées en PCR chez le (A) rat et (B) la souris

(A)	Séquences des amorces sens	Séquences des amorces anti-sens
Gapdh	CTGTTCTAGAGACAGCCGCATCT	ACACCGACCTTCACCATCTTG
Tnf	GACCCTCACTCAGATCATCTTCT	TCCGCTTGGTGGTTTGCTA
Il1b	GACCTGTTCTTTGAGGCTGACA	CTCATCTGGACAGCCCAAGTC
Cxcl1/Kc	CAGACAGTGGCAGGGATTCA	GTGGCTATGACTTCGGTTTGG
IL10	TCAGCCAGACCCACATGCT	ATGTTGTCCAGCTGGTCCTTCT
Cd68	ACGGACAGCTTACCTTTGGA	GAGAGCAGGTCCAGGTGAAT
Cd11c	ACCAATAACGCCAGTTGCT	TCGCATACATGTTCTTCACACAAG
Chromogranin A	CGGCAGCATCCAGTTCTCA	CGACTGACCATCATCATCTTCTG
Hdc	GCAGCAAGGAAGAACAAAATCC	CAACAAGACGAGCGTTCAGAGA
Cnr1	GCTGGTATCAAATGCCAAGGAA	GTTCTCATCTGGTAGTTGGGCCTAT
Trpa1	TCAATGTGTCCGTTTATTCCAA	CATAGCTGGCGGCAAAAGTG
F2r11 (Par-2)	CCGAACGAAGAAGAAGCACCTT	GGAGCAGTACATATTGCCGTAGAAA
F2r13 (Par-4)	TTTCATCGGCAGACCTTCCT	AGCGCATCATGACACAGCAT
Trpv1	CAGCAGCAGTGAGACCCTTAA	TGTCCTGTAGGAGTCGGTTCAA
Trpv4	ACCACGGTGGACTACCTGAG	AGCCATCGACGAAGAGAGAA

(B)	Séquences des amorces sens	Séquences des amorces anti-sens
Polr2a	CCCACAACCAGCTATCCTCAA	GGTGCTGTGGGTACGGATACA
Par2	CCGGGACGCAACAACAGT	CCCTTTCCAGTGATTGG
Trpv1	CACCACGGCTGCTTACTATCG	CCCAACGGTGTTATTCAGCTTAT
Tjp1	GTGCCCTGAAAGAAGCGATTCT	ATGCAAATCAAGGTCATCACTTGT
Cldn4	AAGTGCACCAACTGCATGGA	TCCGGCGGTGATCATGA

Dosage de l'activité myéloperoxydase. L'infiltrat des tissus par les polynucléaires neutrophiles a été analysé par dosage de l'activité enzymatique de la myéloperoxydase (MPO). Les côlons de rats ont été homogénéisés dans du PBS 50 mM (Sigma-Aldrich) contenant 0,5% de bromure d'hexadécyltriméthylammonium. Ils ont été congelés et décongelés trois fois puis centrifugés. L'activité MPO a été dosée dans le surnageant. L'ajout de 1 mg/ml de dichlorhydrate dianisidine (Sigma-Aldrich) et de 5.10^{-4} % d' H_2O_2 a permis de doser l'activité MPO dans le surnageant par mesure de la densité optique à 450 nm. La MPO de neutrophiles humains (Sigma-Aldrich) a été utilisée pour réaliser la gamme étalon. Une unité de densité optique équivaut à la quantité de MPO nécessaire pour dégrader 1 μ mol d' H_2O_2 par minute à 25°C. Les valeurs de densité optique mesurées pour les différents échantillons ont été normalisées à la teneur en protéine totale de chaque échantillon. (DC™ protein assay, Bio Rad).

Analyses histologiques et immunohistochimiques. Les échantillons de côlons ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 24 heures, puis ils ont été déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes de 4 μ m d'épaisseur ont ensuite été colorées par le May Grünwald Giemsa (MGG). Pour l'analyse des différentes populations cellulaires, les coupes de côlon ont été bloquées avec du sérum de chèvre à 2% puis incubées une nuit à 4 ° C avec l'anticorps primaire (anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la sérotonine de rat (Abcam), anticorps monoclonal de souris dirigé contre CD68 de rat (Abd Serotec) et anticorps monoclonal de souris dirigé contre la tryptase mastocytaire humaine (Dako)), puis avec l'anticorps secondaire (anticorps de lapin anti Immunoglobulines de chèvre conjugué avec l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen), anticorps biotinylé de lapin anti immunoglobulines de souris (Dako)). Les différentes cellules marquées positivement pour CD68, la sérotonine ou la tryptase ainsi que les éosinophiles marqués par le MGG ont été comptées en aveugle par deux investigateurs.

Quantification de l'histamine. Les taux d'histamine ont été quantifiés dans le surnageant des broyats de côlon par ELISA en accord avec les instructions du fabricant (Histamine EIA Kit, Spi Bio). Les résultats ont été normalisés sur la quantité totale de protéines présente dans les échantillons par dosage protéique (DC™ protein assay, Bio Rad).

Mesure de la perméabilité intestinale *in vivo*. La perméabilité de la barrière intestinale a été étudiée *in vivo* par la méthode au FITC-Dextran. Les souris ont été mises à jeun sur la nuit précédant l'expérience. Elles ont ensuite été gavées avec 15 mg de FITC-dextran 4kDA (FD4, Sigma Aldrich). Après 3 heures, le sang a été prélevé dans le sinus rétro-orbital. L'intensité de

fluorescence a ensuite été évaluée dans le sérum des souris à l'aide d'une courbe standard réalisée par des dilutions en série de FITC-dextran.

Tomographie par émission de positons par injection de [^{18}F] FDG, et analyse des données. Les expériences de tomographie par émission de positons (TEP) ont été réalisées sur la plateforme d'imagerie du vivant de la faculté de médecine de Lille, sous la direction du Dr Ravasi. Ces expériences ont été réalisées sur des souris C57BL/6 mâles âgées de 17 mois et traitées ($n = 5$) ou non traitées ($n = 6$) avec de l'AlCi, par un appareil d'imagerie du petit animal Micro PET (Inveon, Siemens, Knoxville , TN, USA). Pour cette expérience, tous les animaux ont été privés de nourriture 6 heures avant l'injection du radiotraceur. Le [^{18}F] FDG ($13 \pm \text{MBq}$; $150 \mu\text{l}$) a été administré par injection intrapéritonéale, l'animal était conscient et en contention. Suite à l'injection, la souris a été replacée dans sa cage pendant 45 minutes pour permettre la biodistribution du [^{18}F] FDG. La souris a ensuite été anesthésiée à l'isoflurane et placée en position couchée sur la plateforme du scanner. A l'aide d'un laser, la souris a été positionnée de sorte à ce que le cerveau soit au centre du champ d'acquisition. Un scanner (80KV et 500 mA) a d'abord été réalisé avant le déplacement automatique de la souris vers le champ d'acquisition du TEP, 60 minutes après l'injection du traceur radioactif. L'acquisition a duré 15 minutes. Les données du scanner ont ensuite été formatées en 3 images représentant 5 minutes chacune, reconstruites et corrigées pour la dispersion et l'atténuation.

Les valeurs détectées par le scanner ont été converties en MBq/mL à l'aide du logiciel Inveon Research Workflow (IRW version 3.0, Siemens). Ce logiciel permet d'extraire les données du TEP-Scan et de dessiner les régions d'intérêts manuellement (ROI). Les valeurs de TEP des différentes régions tridimensionnelles d'intérêt du cerveau ont été sélectionnées afin d'extraire les données des régions d'absorption cérébrale. Les régions d'intérêts étudiées sont les suivantes : bulbes olfactif, striés, Pons, l'hippocampe, les colliculus inférieur et supérieur, le thalamus et le cortex. Une ROI servant de blanc a également été réalisée en dehors de la souris. Les résultats semi-quantitatifs des différences régionales d'absorbance du radiotraceur au niveau cérébral sont normalisés par rapport à l'absorption du cervelet. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de la dose de radiotraceur injectée en fonction du poids (% de la dose injectée/g).

Extraction des lipides du côlon. Les côlons de souris ont été broyés dans $500 \mu\text{L}$ de HBSS (Invitrogen) et $5 \mu\text{L}$ de standard interne (LxA₄-d5, LTB₄-d4 et 5-HETE-d8 à la concentration de 400 ng/mL dilués dans du méthanol) à l'aide du broyeur FastPrep®-24 (MP biomedical).

Deux cycles de broyage ont été réalisés (6,5m/s, 30 secondes), 10 µL ont été prélevés pour le dosage protéique et 300 µL de méthanol froid ont été ajoutés aux échantillons. Après centrifugation (3000 rpm, 15 min, 4 °C), les surnageants ont été prélevés et dilués par de l'H₂O jusqu'à 2 mL. Les échantillons ont été extraits sur phase solide à l'aide d'une plaque 96 puits HRX (50 mg/puit ; Macherey Nagel, Hoerd, France) conditionnée (méthanol 100% / méthanol 10%). Après un lavage (méthanol 10%), les échantillons ont été élués (méthanol 100%). Après évaporation sous flux d'azote, les échantillons ont été resuspendus dans 10 µL de méthanol 100% et conservés à -80°C pour quantification par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Quantification des lipides coliques par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem. Pour séparer simultanément 32 lipides d'intérêts et 3 standards internes deutérés, les analyses de LC-MS/MS ont été réalisées sur un système de chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) (Agilent LC1290 Infinity) couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle Agilent 6460 (Agilent Technologies) équipé d'une source d'ionisation par électrobulbion réglée sur le mode négatif (Le Faouder et al., 2013). Un gradient d'élution a été réalisé pour l'UHPLC en phase inverse à l'aide d'une colonne ZorBAX SB-C18 (2.1 mm, 50 mm, 1.8 µm) (Agilent Technologies). Les phases mobiles étaient constituées d'un mélange d'eau, d'Acétonitrile et d'acides formique (75:25:0.1;v/v/v) (A) et d'un mélange d'Acétonitrile et d'acides formique (100:0.1, v/v) (B). Le gradient d'élution de B était de 0% à 0 min, 85% à 8,5 min, 100% à 9,5 min, 100% à 10,5 min et 0% à 12 min à un débit de 0,35 mL/min. L'échantillonneur automatique a été réglé sur 5°C et le volume d'injection était de 5 µL. Les données ont été acquises en mode suivi de réactions multiples avec des conditions optimisées (optiques ioniques et énergie de collision). La détection des pics, l'intégration des données et l'analyse quantitative ont été réalisées à l'aide du logiciel d'analyse MassHunter Quantitative (Agilent Technologies). Pour chaque standard, 10 dilutions ont permis de réaliser une courbe d'étalonnage avec des concentrations comprises entre 0.95 ng/mL et 500 ng/mL. Une régression linéaire avec un facteur de pondération de 1/X a été appliquée pour chaque composé. La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été déterminées pour les 32 composés en mesurant le rapport du signal sur bruit (S/B). La LD correspondait à la plus faible concentration associée à un S/B supérieur à 3 et la LQ correspondait à la plus faible concentration associée à un S/B supérieur à 5. Toutes les valeurs inférieures à la LQ ont été exclues. Les blancs ont également été analysés et aucun pic n'a été détecté. La quantification des métabolites dérivés des AGPI a été convertie en Z-score et

regroupée en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson pour le critère de distance et l'algorithme de Ward pour le critère d'agglomération.

Statistiques. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ s.e.m. Les différences entre les groupes ont été comparées par les tests statistiques de Mann-Whitney et ANOVA. Le critère de significativité statistique était de 5%.

Résultats

Caractérisation des effets de l'aluminium sur la sensibilité viscérale

I. Effets de l'administration orale d'aluminium, à une dose pertinente chez l'homme, sur la sensibilité viscérale.

L'implication de l'Al dans la modulation de la sensibilité viscérale a été étudiée. Pour cela, la contraction réflexe de l'abdomen en réponse à la distension colorectale (DCR) a été évaluée chez des rats mâles répartis en un groupe contrôle et un groupe intoxiqué pendant 30 jours par de l'AlCi (1,5 mg/kg par jour). La pression à laquelle la contraction prolongée de l'abdomen est observée a permis de déterminer le seuil de douleur, et dans la figure 1, les résultats sont exprimés en pourcentage de variation du seuil de douleur. Ainsi, un seuil de pression inférieur pour la contraction décrit une sensibilité accrue.

Après 2 et 4 jours d'intoxication, aucune différence de sensibilité n'a été observée entre les rats contrôles et ceux intoxiqués par l'Al (Figure 1). A partir du 8^e jour suivant le début de l'intoxication, les premiers effets de l'Al sur la sensibilité viscérale ont été observés (Figure 1). Ainsi, le seuil de douleur en réponse à la DCR a été diminué de 22% après 8 et 15 jours dans le groupe traité par l'Al par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$). Cette différence a atteint 30% après 1 mois d'intoxication ($P < 0,001$).

Ces résultats suggèrent que l'ingestion chronique d'une dose d'Al pertinente chez l'Homme diminue le seuil de douleur et augmente la sensibilité viscérale chez le rat.

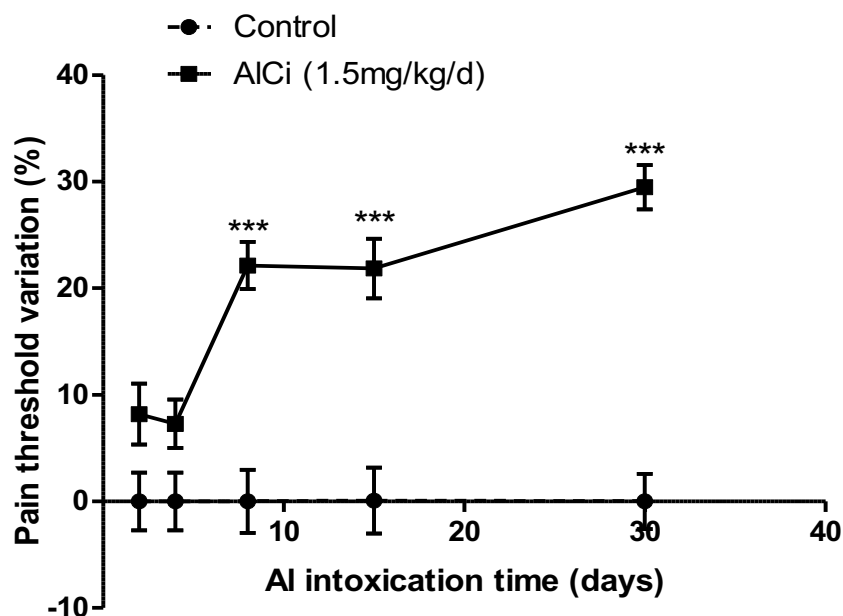


Figure 1 : Effets de l'administration orale d'Al sur la variation du seuil de sensibilité en réponse à la DCR. Des rats mâles ont été traités avec de l'eau (n = 10) ou de l'AlCi à la dose de 1,5 mg/kg/j (n = 10). Le reflexe de contraction abdominale a été évalué à 2, 4, 8, 15 et 30 jours d'intoxication. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation du seuil de douleur des rats traités par rapport au groupe contrôle. *** P <0,001

II. L'aluminium ingéré peut-il avoir un effet dose réponse sur la sensibilité viscérale ?

Une augmentation de la sensibilité viscérale a été montrée en réponse à une dose d'intoxication orale pertinente chez l'Homme. Dans le but d'étudier le rôle de la dose dans cet effet, les rats ont reçu 3 doses d'Al et le seuil de douleur a été évalué par DCR dans les 3 groupes et comparé au groupe contrôle. La dose faible étudiée était de 0,5 mg/kg/jour, la dose moyenne de 1,5 mg/kg/jour et la dose élevée de 3 mg/kg/jour. Alors qu'une diminution significative du seuil de pression nécessaire à l'apparition de la douleur a été observée après 8 jours pour les doses de 0,5 mg/kg/jour ($p < 0,05$) et 1,5 mg/kg/jour ($p < 0,001$) (figure 2a), l'administration d'une dose supérieure (3 mg/kg/jour) a favorisé l'abaissement de ce seuil à partir du 2^e jour d'intoxication ($p < 0,001$) (figure 2b).

Ces résultats sont en faveur d'un effet de la dose sur l'intensité et la rapidité d'apparition de l'hypersensibilité viscérale entre les groupes témoins et traités par l'Al.

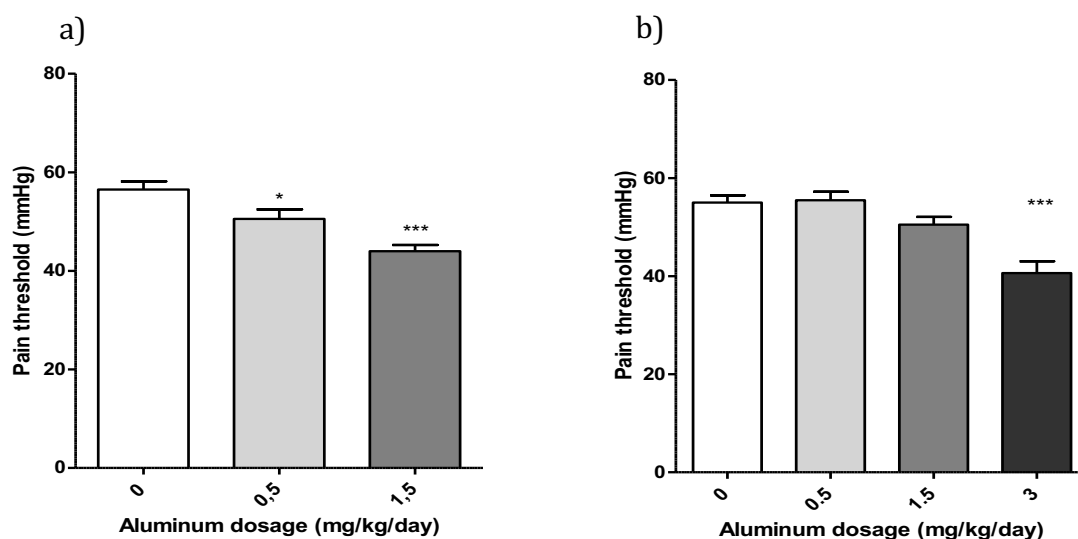


Figure 2 : **Effet dose-réponse de l'administration orale d'Al sur la sensibilité viscérale.** (a) Le seuil de douleur en réponse à la DCR a été testé à 8 jours d'intoxication par 0, 0,5 et 1,5 mg/kg/j d'Al, et (b) à 2 jours d'intoxication par 0, 0,5, 1,5 et 3 mg/kg/j. * $P < 0,05$, *** $p < 0,001$

III. Les effets de l'aluminium sur l'hypersensibilité viscérale sont-ils persistants dans le temps ?

La cinétique d'apparition de l'hypersensibilité est variable en fonction de la dose d'Al ingérée. Après avoir observé une différence significative à 2 jours pour les rats traités par la dose de 3 mg/kg/j et 8 jours pour les rats traités par 0,5 et 1,5 mg/kg/j d'Al, l'intoxication a été stoppée et les DCR poursuivies chaque semaine afin d'évaluer la durée de persistance de l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al en fonction de la dose ingérée.

Ainsi, pour les rats traités par la dose de 0,5mg/kg/jour, une augmentation significative de la sensibilité en réponse à la distension colrectale s'est produite à 8 jours d'intoxication et a continué 14 jours après arrêt du traitement ($p < 0,05$) (figure 3a). Les rats traités par 1,5 mg/kg/jour ont développé une hypersensibilité viscérale significative 8 jours après le début du traitement qui a duré 5 jours sans intoxication (figure 3b). Enfin, les rats ayant reçu la dose de 3 mg/kg/jour ont eu une diminution significative du seuil de sensibilité après 2 jours de traitement, et cet effet a duré 19 jours (figure 3c). De plus, une tendance plus élevée de l'hypersensibilité viscérale a été remarquée pendant 4 semaines pour les doses les plus faibles

et 5 semaines pour la plus forte jusqu'à obtenir le seuil de sensibilité équivalent au groupe contrôle.

L'hypersensibilité viscérale en réponse à la DCR est donc persistante en cas d'arrêt de l'intoxication.

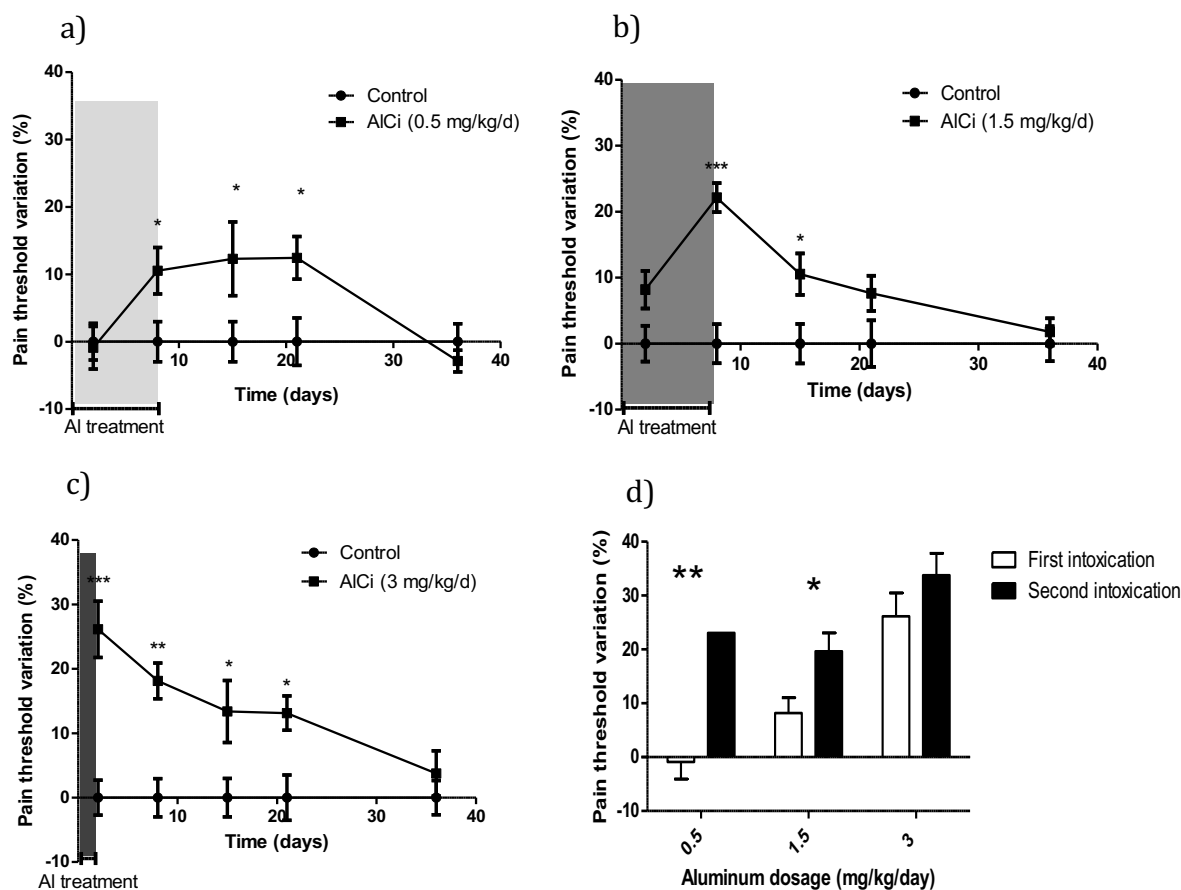


Figure 3 : Cinétique de la variation du seuil de douleur en réponse à la DCR pendant et après l'administration d'Al à 3 doses d'exposition. Les rats ont été intoxiqués par 0,5 mg/kg/j (a), 1,5 mg/kg/j (b) et 3 mg/kg/j (c) (n = 10 par groupe) et la variation du seuil de douleur en réponse à la DCR a été évaluée par rapport au groupe contrôle (n = 10). Après arrêt de l'intoxication, les DCR ont été continuées à 6, 13, 19 et 34 jours pour la dose de 3mg/kg/j et à 7, 13 et 28 jours pour les doses de 0,5 et 1,5mg/kg/j pour évaluer la cinétique de récupération du seuil de sensibilité viscérale basal. Après récupération, une DCR a été réalisée 2 jours après une nouvelle intoxication par la même dose pour chaque groupe (n=5) (d). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation du seuil de douleur des rats traités par rapport au groupe contrôle. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001.

IV. Une tolérance vis-à-vis des effets de l'aluminium peut-elle s'installer au cours du temps ?

Dans le but d'étudier l'éventuelle tolérance de l'organisme envers les effets de l'Al, la cinétique d'apparition de l'hypersensibilité viscérale a été étudiée lors d'une 2^e intoxication. Chaque groupe de rats de l'expérience précédente a reçu la même dose d'Al après la récupération complète du seuil de sensibilité basal. La DCR a été réalisée 2 jours après le début de la nouvelle intoxication.

Alors que les doses de 0,5 et 1,5mg/kg/j n'induisaient pas d'hypersensibilité viscérale après 2 jours lors de la 1^e intoxication, on observe lors de cette 2^e intoxication une diminution du seuil de douleur. Pour la dose de 3mg/kg/j, l'effet déjà observé à 2 jours n'est pas plus fort lors de cette 2^e intoxication certainement à cause de la réponse déjà élevée lors de la 1^e intoxication (figure 3d).

Ainsi, une 2^e intoxication décroît fortement le temps d'apparition de l'hypersensibilité, même si aucune persistance de cet effet n'était observée.

V. L'intensité de douleur induite par l'aluminium est-elle comparable à des modèles connus pour influencer sur l'hypersensibilité viscérale ?

La diminution du seuil de douleur induit par l'Al chez le rat mâle a été comparée au seuil de sensibilité observé dans des modèles d'hypo- ou hypersensibilité viscérale connus. Ainsi la sensibilité viscérale après 1 mois d'intoxication orale par la dose de 1,5mg/kg/j a été comparée avec les effets de la morphine, du butyrate et du TNBS. Tandis que l'injection de morphine augmente le seuil de douleur de 27,4% par rapport à des rats contrôles ($p < 0,05$), respectivement, l'Al, le butyrate et le TNBS induisent une diminution du seuil de sensibilité de 29,4% ($p < 0,001$), 33,6% ($p < 0,001$) et 41,3% ($p < 0,01$) par rapport à leur contrôle (figure 4a).

L'hypersensibilité viscérale causée par 1 mois d'Al à une dose pertinente par rapport à l'exposition humaine induit un seuil de douleur comparable à des modèles de douleurs provoquées chimiquement.

VI. Les effets observés sont-ils spécifiques de l'aluminium ?

La forme chimique de l'Al utilisée au cours des diverses expériences est de l'AlCi. Afin de confirmer que l'effet observé n'est pas commun à tous les métaux ou encore causé par le Citrate de la solution, les rats ont été intoxiqués par 1,5mg/kg/jour de ZnCi pendant 15 jours.

Les DCR ont été réalisées à 4 et 15 jours d'intoxication et aucune variation de la sensibilité viscérale n'a été observée en comparaison des rats contrôles (figure 4b).

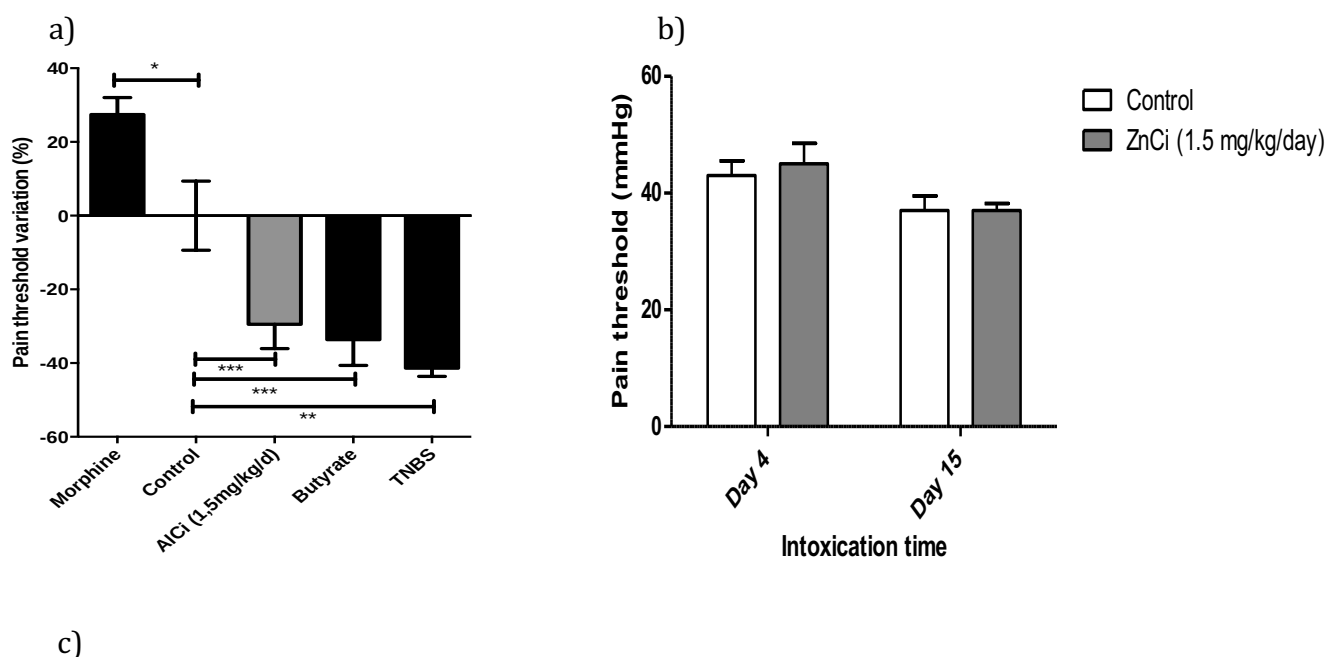
L'effet sur la douleur viscérale est spécifique de l'Al.

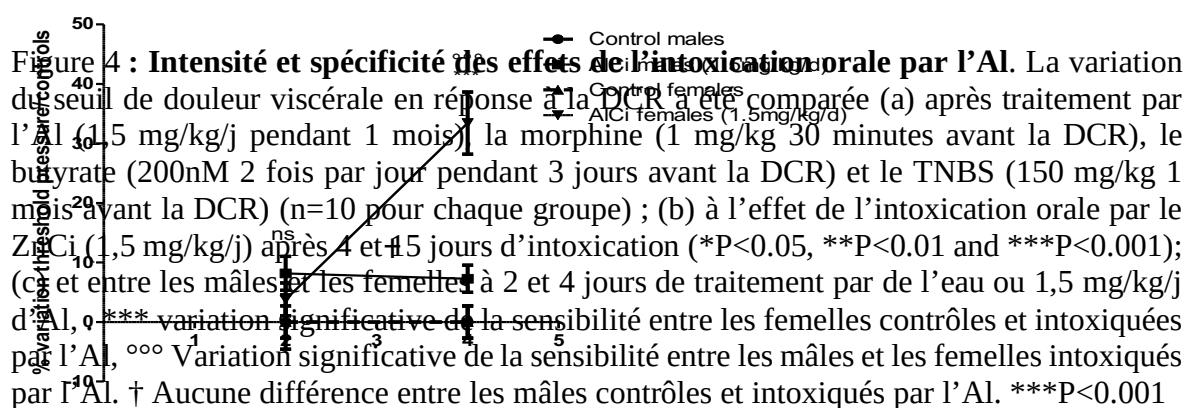
VII. La cinétique d'apparition de l'hypersensibilité viscérale est-elle comparable entre les mâles et les femelles ?

Des rats femelles et mâles ont reçu 1,5 mg/kg/jour d'Al par voie orale dans le but d'étudier si le genre modifie les effets de l'Al sur la sensibilité viscérale.

Alors que la dose de 1,5 mg/kg/j n'induit aucun effet sur la sensibilité viscérale en réponse à la DCR après 2 et 4 jours d'intoxication chez le mâle, une diminution du seuil de douleur de 33,4% a été observée après 4 jours d'intoxication chez les femelles (figure 4c).

Ces observations démontrent une sensibilité plus forte des femelles à l'impact de l'Al sur l'hypersensibilité viscérale.





VIII. L'aluminium peut-il modifier l'activité cérébrale ?

L'injection d'un traceur radioactif tel que le ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) associée à son analyse en microTEP Scan permet d'étudier les variations de l'activation cérébrale dans l'hypersensibilité viscérale en réponse à la DCR. Dans le but de mettre en évidence un lien entre les effets de l'Al sur la sensibilité viscérale et des modifications de l'activité métabolique cérébrale, des souris C57Bl/6 ont été intoxiquées pendant 17 mois par 1,5mg/kg/j d'Al et étudiées par microTEP.

Sur les 11 structures cérébrales étudiées, une augmentation significative de l'activité métabolique du thalamus (figure (a) a pu être mise en évidence en comparaison des souris contrôles (p<0,05) (figure 5b).

L'augmentation de l'activité métabolique du thalamus sans stimulation par DCR montre qu'une exposition à long terme par l'Al peut entraîner, en condition basale, l'activation d'une zone cérébrale impliquée dans la perception de la sensibilité périphérique.

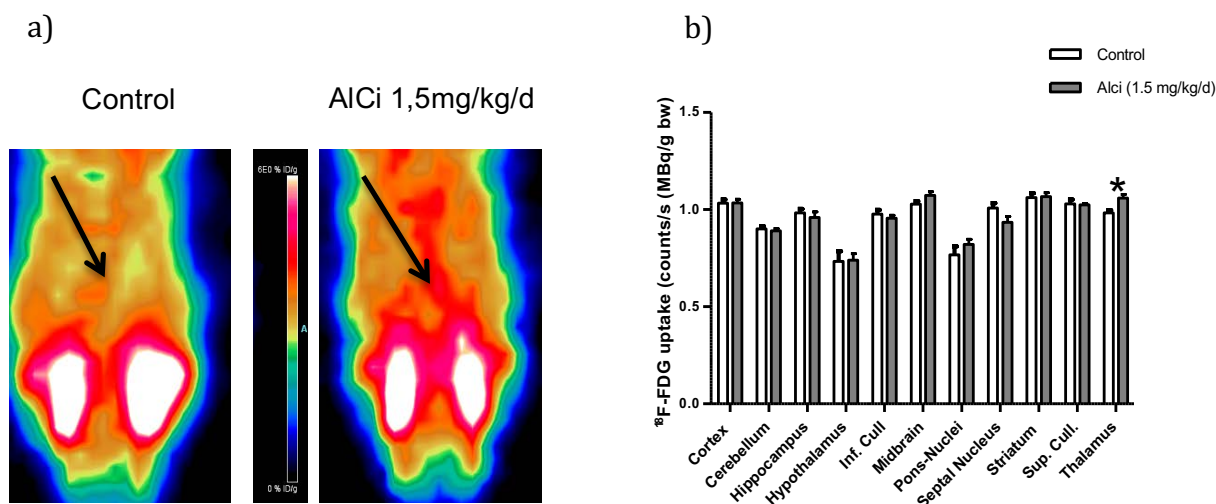


Figure 5 : **Effets de l'Al sur le métabolisme cérébral.** Des souris C57Bl6 ont été intoxiquées pendant 17 mois par 1,5 mg/kg/j et l'activité métabolique du cerveau a été analysée par TEP Scan. Environ 15 MBq de [18F] FDG ont été injectés par voie intrapéritonéale chez la souris et le scanner a été réalisé après que le radiotracer ait été biodistribué à tout l'organisme. En (a) on observe la vue frontale du cerveau d'une souris contrôle (à gauche) et d'une souris traitée par l'Al (à droite) du TEP. La flèche indique le thalamus. (b) L'analyse de l'accumulation du [18F] FDG en TEP exprime l'absorption du radiotracer par la partie étudiée par rapport à l'absorption du cervelet de chaque animal. La moyenne du groupe non traité a ensuite été comparée au groupe de souris traitées par l'Al.

Compréhension des mécanismes impliqués dans l'hypersensibilité viscérale induite par l'aluminium.

I. L'inflammation colique peut-elle être responsable de l'hypersensibilité viscérale ?

Les médiateurs de l'inflammation peuvent favoriser l'hypersensibilité viscérale (Bueno and Fioramonti, 2002). Nous avons donc analysé le profil d'inflammatoire des côlons de rats traités pendant 1 mois par 1,5 et 3 mg/kg/j d'Al afin d'étudier le rôle de ces médiateurs dans l'augmentation de la sensibilité viscérale.

1. Expression colique de cytokines impliquées dans l'inflammation

L'expression des ARNm de cytokines pro-inflammatoires telles que l'Il1b, l'Il8, le TNF α et anti-inflammatoire telle que l'Il10 a été quantifiée dans le côlon par RT qPCR. Aucune différence n'a pu être observée chez les rats traités par l'Al en comparaison des rats contrôles (figure 6a).

2. Etude de l'implication des cellules de l'immunité

Différents marqueurs ont été utilisés pour étudier le rôle des principales cellules impliquées dans l'immunité et l'inflammation coliques sur l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al.

1. Etude de l'infiltrat en polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont impliqués dans l'inflammation intestinale et des lésions de la muqueuse (Fournier and Parkos, 2012). La MPO est une enzyme spécifique des neutrophiles, et sa quantification permet de mesurer l'infiltrat dans l'organe étudié, ici le côlon. Aucune différence significative d'activité MPO dans le côlon n'a été observée entre les rats contrôles, et les rats ayant reçu de l'Al à 1,5 et 3 mg/kg/j (figure 6b). Ainsi, les polynucléaires neutrophiles ne semblent pas être impliqués dans l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al.

2. Etude de l'expression des marqueurs des cellules inflammatoires coliques

La quantification de l'expression de différents marqueurs de cellules inflammatoires a permis d'évaluer l'infiltrat colique des rats traités par rapport aux rats non traités. Ainsi, CD68 a été utilisé pour les macrophages car c'est une glycoprotéine transmembranaire particulièrement exprimée dans ces cellules. CD11c est une protéine transmembranaire particulièrement présente dans les cellules dendritiques matures et la chromogranine A est une protéine neuroendocrine particulièrement exprimée dans les cellules endocrines de l'organisme, et notamment dans les cellules entérochromaffines du côlon.

Aucune variation de l'expression de ces marqueurs dans le côlon n'a été mise en évidence par RT qPCR entre les rats contrôles et traités par l'Al (figure 6c).

3. Quantification des cellules inflammatoires par marquages histologiques

Pour valider les observations précédentes, les différentes cellules ont été étudiées sur coupes histologiques. La coloration des polynucléaires éosinophiles du côlon par MGG et le marquage des macrophages par un anticorps anti CD68 ont permis de compter le nombre de cellules présentes sur les coupes histologiques. Les cellules entérochromaffines ont été marquées par un anticorps dirigé contre la sérotonine et repérées par leur forme pyramidale caractéristique. Aucune différence entre les contrôles et les rats traités par l'Al n'a été observée pour le nombre d'éosinophiles et de macrophages présents dans l'épithélium colique (figure 6d,e). Aucune

différence n'a été observée pour le nombre de cellules entérochromaffines coliques entre les rats contrôles et les rats traités par 1,5mg/kg/jour d'Al. Cependant, une diminution significative (24,3%) du nombre de ces cellules a été observée entre les contrôles et la dose de 3 mg/kg/jour ($p<0,05$) (figure 6f).

Les résultats obtenus par RT qPCR et les analyses histologiques semblent montrer que les cellules inflammatoires coliques telles que les polynucléaires neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques, les éosinophiles et les cellules entérochromaffines ne sont pas impliquées dans l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al chez le rat.

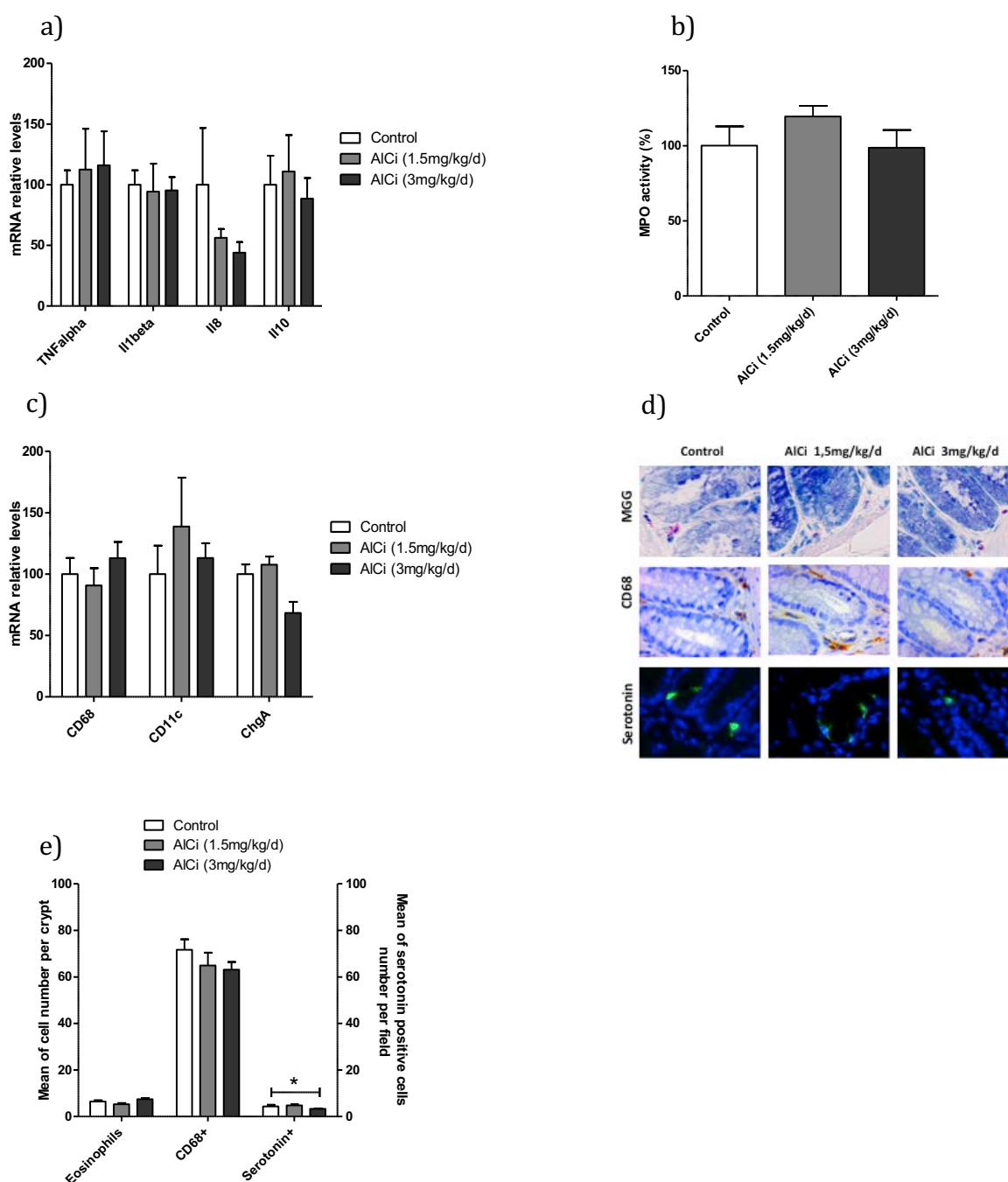


Figure 6 : Evaluation de la réponse inflammatoire colique induite par l'ingestion d'Al. Divers marqueurs et cellules inflammatoires ont été analysés au niveau colique chez des rats intoxiqués par 1,5 (n=10) et 3 mg/kg/j (n=10) d'Al pendant 1 mois et comparés au groupe contrôle (n=10). L'expression colique relative de l'ARNm de (a) *TNF α* , *Il1 β* , *Il8*, *Il10* et de (c) *CD68*, *CD11c* et de *ChrA* a été évaluée par RT-qPCR et *GAPDH* a été utilisé comme gène de référence. (b) L'activité MPO a été dosée dans le côlon des rats et normalisée sur la quantité totale de protéines. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au groupe contrôle. (d) Les cellules inflammatoires ont été visualisées par coloration au May-grünwald Giemsa pour les polynucléaires éosinophiles, par marquage CD68 révélé à la 3-3'diaminobenzidine (DAB) pour les macrophages et par marquage de la sérotonine révélée par immunofluorescence pour les cellules entérochromaffines (grossissement x100). (e) Le comptage est exprimé en moyenne par crypte pour les éosinophiles et le CD68 (5 cryptes sur 1 coupes par animal ont été comptabilisées) et il est exprimé en moyenne par champs de vision pour les cellules marquées positivement pour la sérotonine (8 champs de vue sur 1 coupe par animal ont été comptabilisés). (*p<0,05)

3. L'hypersensibilité pourrait-elle être induite par une inflammation à bas grade causée par les mastocytes ?

Les mastocytes sont des cellules granuleuses contenant essentiellement de la tryptase, de l'histamine et de la sérotonine. Lorsqu'ils sont activés et rejettent leur contenu dans la muqueuse ou tissu conjonctif, on parle de dégranulation.

1. Analyses histologiques des mastocytes.

Dans le côlon, les mastocytes sont le principal réservoir de tryptase. Afin d'étudier leur implication dans l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al, le pourcentage de dégranulation des mastocytes par rapport aux rats contrôles a été analysé sur des coupes de côlon par immunomarquage de la tryptase (figure 7a). Tandis que les mastocytes inactifs présentent une forme ovale régulière et sont densément remplis de granules sécrétoires, les mastocytes activés présentent une exocytose des granules et une altération de leur membrane. La totalité des mastocytes de l'épithélium colique a été comptée ainsi que le nombre de mastocytes dégranulés afin d'établir le pourcentage de dégranulation dans le côlon de chaque animal.

Une augmentation du pourcentage de dégranulation des mastocytes de 10,2% et de 38,8% a été observée, respectivement, entre les rats contrôles et les traités par 1,5 mg/kg/jour (p<0,05) ou 3 mg/kg/jour (p<0,001) (figure 7b).

Les analyses histologiques montrent une augmentation de l'activation des mastocytes dans les groupes ayant développé une hypersensibilité viscérale par ingestion d'Al.

2. Confirmation de l'augmentation d'activité des mastocytes

Afin de confirmer l'augmentation de l'activité des mastocytes en réponse à l'Al dans le côlon des rats, l'expression de l'ARNm de l'histidine décarboxylase (enzyme majeure des mastocytes permettant la synthèse d'histamine) et le dosage de l'histamine dans le côlon des animaux ont été réalisés.

Les rats intoxiqués par 1,5mg/kg/jour d'Al ont une augmentation de l'expression de l'histidine décarboxylase dans leur côlon de 26,08% par rapport aux rats contrôles ($p < 0,05$) (figure 7c). Ce résultat est corroboré par une augmentation de la concentration en histamine dans le côlon des rats traités par l'Al par rapport aux contrôles (figure 7d).

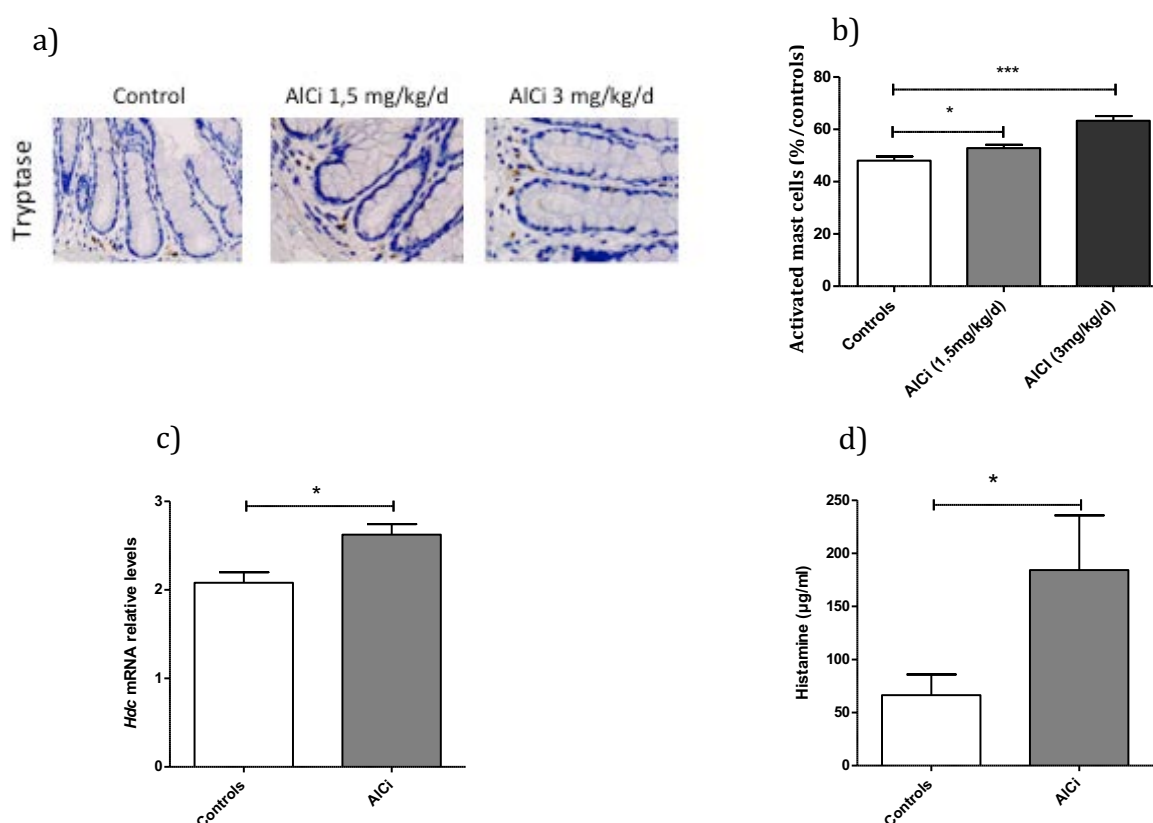


Figure 7 : **Evaluation de l'activation des mastocytes dans le côlon des rats intoxiqués par l'Al.** (a) Photos représentatives des mastocytes observés chez les rats contrôles (n=10), traités par 1,5 mg/kg/j (n=10) ou 3 mg/kg/j (n=10) d'Al après immunomarquage par anticorps anti-tryptase et coloration par la DAB. L'état d'activation des cellules marquées positivement pour la tryptase a été évalué, à l'aveugle, par 2 investigateurs et le nombre de cellules dégranulées a été rapporté au nombre total de mastocytes (Nombre total sur 1 coupe pour 1 animal) pour obtenir la moyenne du pourcentage d'activation par groupe (b). L'expression relative colique de l'histidine décarboxylase (c) a été évaluée par RT qPCR et la concentration en µg/ml de l'histamine du côlon par test ELISA (d). (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

3. Les mastocytes sont-ils impliqués dans l'hypersensibilité viscérale induite par l'aluminium ?

a) Etude du rôle des mastocytes dans l'hypersensibilité viscérale par inhibition de leur dégranulation chez le rat.

Pour tester l'importance des mastocytes dans les effets de l'Al, le cromoglycate de sodium a été administré aux animaux. Il s'agit d'un stabilisateur de la membrane des mastocytes participant à l'inhibition de la dégranulation (Wang et al., 2013).

Les animaux ont été traités par l'Al à la dose de 1,5 mg/kg/j pendant 8 jours et la moitié des animaux ont reçu le cromoglycate de sodium tandis que l'autre moitié a reçu du PBS. Les analyses histologiques montrent que le cromoglycate de sodium prévient l'activation des mastocytes en diminuant de 12,7% le nombre de mastocytes activés au niveau de l'épithélium colique (figure 8a, b) ($p < 0,05$).

Ces résultats sont corrélés avec l'augmentation du seuil de douleur des rats traités par le cromoglycate de sodium par rapport aux rats intoxiqués par l'Al seul (figure 8c) ($p < 0,05$). On remarque ainsi que l'inhibition des mastocytes favorise une diminution de l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al au niveau colique.

Ces résultats semblent indiquer que la douleur induite par l'Al chez le rat est médiée par les mastocytes.

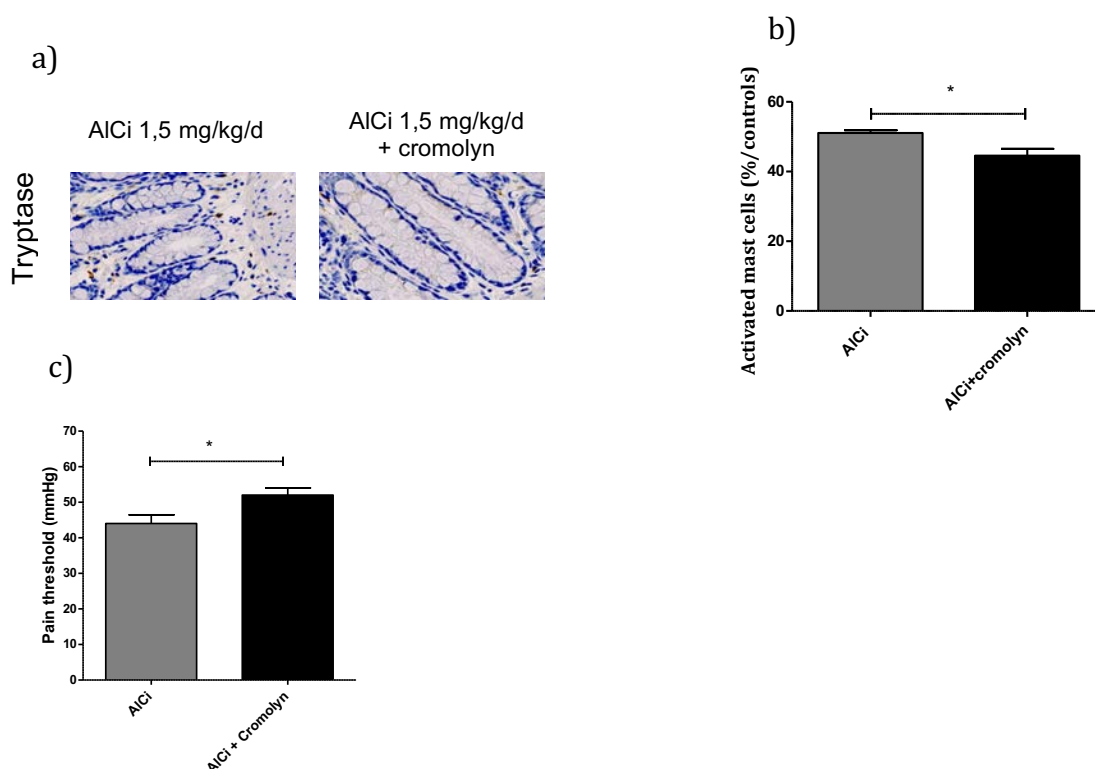


Figure 8 : Mise en évidence de l'implication des mastocytes dans l'hypersensibilité viscérale par inhibition de la dégranulation des mastocytes chez le rat. Pendant 8 jours, des rats mâles ont été traités par 1,5 mg/kg/j d'AlCi. Des injections intrapéritonéales quotidiennes de PBS et de cromoglycate de sodium (50 mg/kg/j) ont été réalisées simultanément à l'intoxication, respectivement, dans le groupe contrôle (n=5) et le groupe traité (n=5). (a) Le pourcentage de mastocytes dégranulés a été évalué par immunomarquage de la tryptase dans le côlon des 2 groupes (grossissement x40). Le pourcentage d'activation des mastocytes (b) a été calculé en rapportant le nombre de mastocytes activés sur le nombre total de mastocytes présents dans l'épithélium colique (quantification d'une coupe par animal). (c) Le seuil de douleur en réponse à la DCR a été évalué dans chaque groupe et la valeur rapportée ici correspond à la pression de distension de la crampe abdominale (en mmHg). *p<0,05

b) Etude du rôle des mastocytes dans l'hypersensibilité viscérale chez la souris transgénique déficiente en mastocytes.

L'utilisation d'un stabilisateur membranaire des mastocytes favorise la diminution de la sensibilité viscérale chez le rat traité par l'Al. Dans le but de confirmer l'implication des mastocytes dans le phénomène d'hypersensibilité viscérale, des souris femelles C57BL/6 (WT) et des souris déficientes en mastocytes (Kit^{W-sh/W-sh}) (Grimbaldeston et al., 2005) ont été intoxiquées par 1,5 mg/kg/j d'Al pendant 1 mois. La réponse viscéromotrice en fonction du traitement et du fond génétique a ensuite été évaluée par DCR.

Une augmentation significative de l'aire sous la courbe (AUC) a été observée chez les souris WT traitées par l'Al par rapport aux souris WT contrôles ($p < 0,01$) (figure 9a). La réponse viscéromotrice des souris Kit^{W-sh/W-sh} contrôles ou intoxiquées par l'Al ne diffère pas (figure 9b).

L'hypersensibilité viscérale induite par l'Al semble être dépendante des mastocytes.

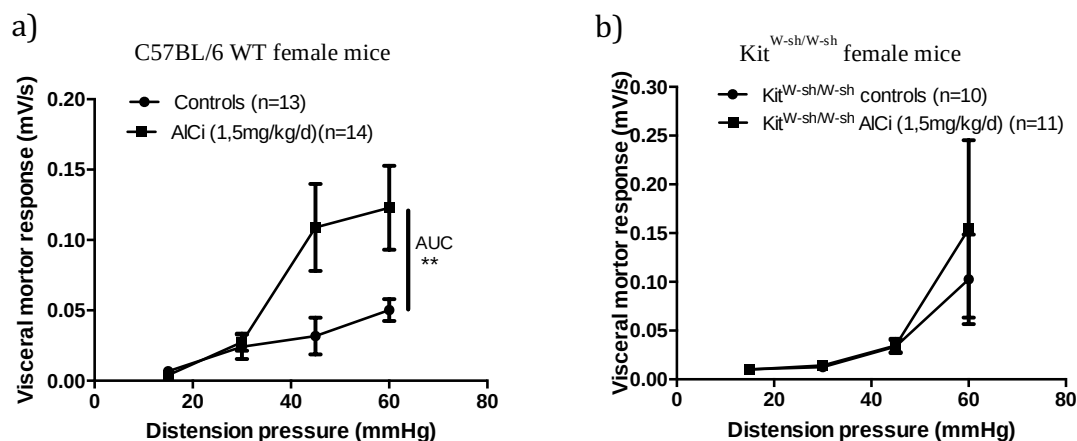


Figure 9 : **Mise en évidence de l'implication des mastocytes dans l'hypersensibilité viscérale chez la souris déficiente en mastocyte.** Des souris femelles (a) C57BL/6 et (b) C57BL/6 Kit^{W-sh/W-sh} ont été traitées par de l'eau ou de l'AlCi à la dose de 1,5 mg/kg/j pendant 1 mois. La réponse viscéromotrice (mV/s) à la DCR a été mesurée à 15, 30, 45 et 60 mmHg. ** $p < 0,01$

II. Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypersensibilité viscérale causée par l'aluminium ?

1. Evaluation de l'expression de 23 gènes impliqués dans la sensibilité viscérale.

Nous avons sélectionné 23 gènes connus pour influencer sur la nociception viscérale. Ces gènes appartiennent aux familles des récepteurs aux opioïdes, aux proliférateurs de peroxysomes, aux cannabinoïdes, aux protéases, sérotoninergiques, canaux à potentiel transitoire, canaux ioniques, Toll, et aux facteurs de croissance. Nous avons quantifié l'expression de ces 23 gènes dans le côlon des rats mâles contrôles et des rats mâles traités par 1,5mg/kg/j d'Al.

Six de ces gènes présentaient une altération significative de leur expression en ARNm. L'expression du récepteur aux cannabinoïdes 1 (Cnr 1) ($p < 0,05$), du récepteur activé par les

protéases 4 (Par-4) ($p<0,05$) et du récepteur canal cationique à potentiel transitoire 1 (Trpa1) ($p<0,05$) était diminuée dans le côlon des rats intoxiqués par l'Al par rapport aux rats contrôles. Au contraire, l'expression du récepteur activé par les protéases 2 (Par-2) ($p<0,01$) et des récepteurs canaux à potentiel transitoire activé par la vanilloïde 1 ($p<0,05$) et 4 ($p<0,05$) (Trpv1 et 4) était augmentée significativement dans le côlon des rats traité par l'Al par rapport aux contrôles (figure 10).

Ces résultats mettent en évidence que l'Al perturbe l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la perception de la sensibilité viscérale.

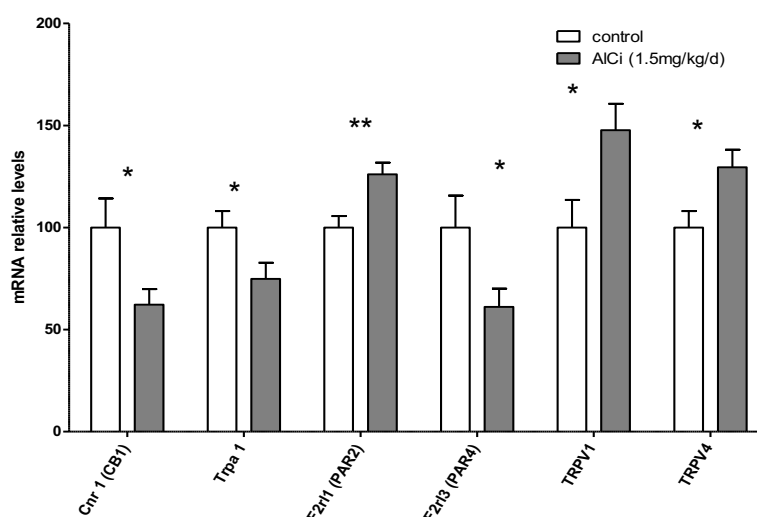


Figure 10 : **Evaluation de l'expression des gènes impliqués dans la nociception viscérale.** L'expression relative de *cnr1*, *trpa1*, *Par2*, *Par4*, *Trpv1* et *Trpv4* a été évaluée dans le côlon des rats contrôles et traités par 1,5mg/kg/j d'AlCi pendant 1 mois. L'expression de la *GAPDH* a été utilisée comme gène de référence. * $p<0,05$ ** $p<0,01$

2. Etude de l'implication de PAR-2 dans l'hypersensibilité induite par l'aluminium.

Parmi les récepteurs dont l'expression est altérée, PAR-2 semble jouer un rôle central dans les mécanismes de la sensibilité viscérale (Cenac et al., 2007). Ainsi l'implication de PAR-2 dans l'abaissement du seuil de douleur des rats traités par l'Al a été étudiée plus particulièrement. Pour cela, des souris femelles sauvages (WT) et des souris déplétées pour l'expression de PAR-2 (KO) ont été intoxiquées par 1,5 mg/kg/j d'Al pendant 1 mois. Des DCR ont ensuite permis d'évaluer la réponse viscéromotrice en fonction du traitement et de l'expression de PAR-2.

Les souris WT intoxiquées par l'Al développent une augmentation significative de la sensibilité viscérale aux différentes pressions de distension ($p<0,01$) (figure 11a). De plus, en corrélation avec les observations chez les rats, l'expression des gènes *Par-2* ($p<0,05$) et *Trpv1* ($p<0,05$) est augmentée significativement dans le côlon des souris WT intoxiquées par l'Al (figure 11c, d). La réponse viscéromotrice des souris PAR-2 KO contrôles ou intoxiquées par l'Al ne diffère pas (figure 11b). De plus, l'expression de *Trpv1* n'est pas modifiée dans le côlon des souris PAR-2 KO (figure 11d).

L'hypersensibilité viscérale induite par l'Al semble être dépendante de l'activation de PAR-2.

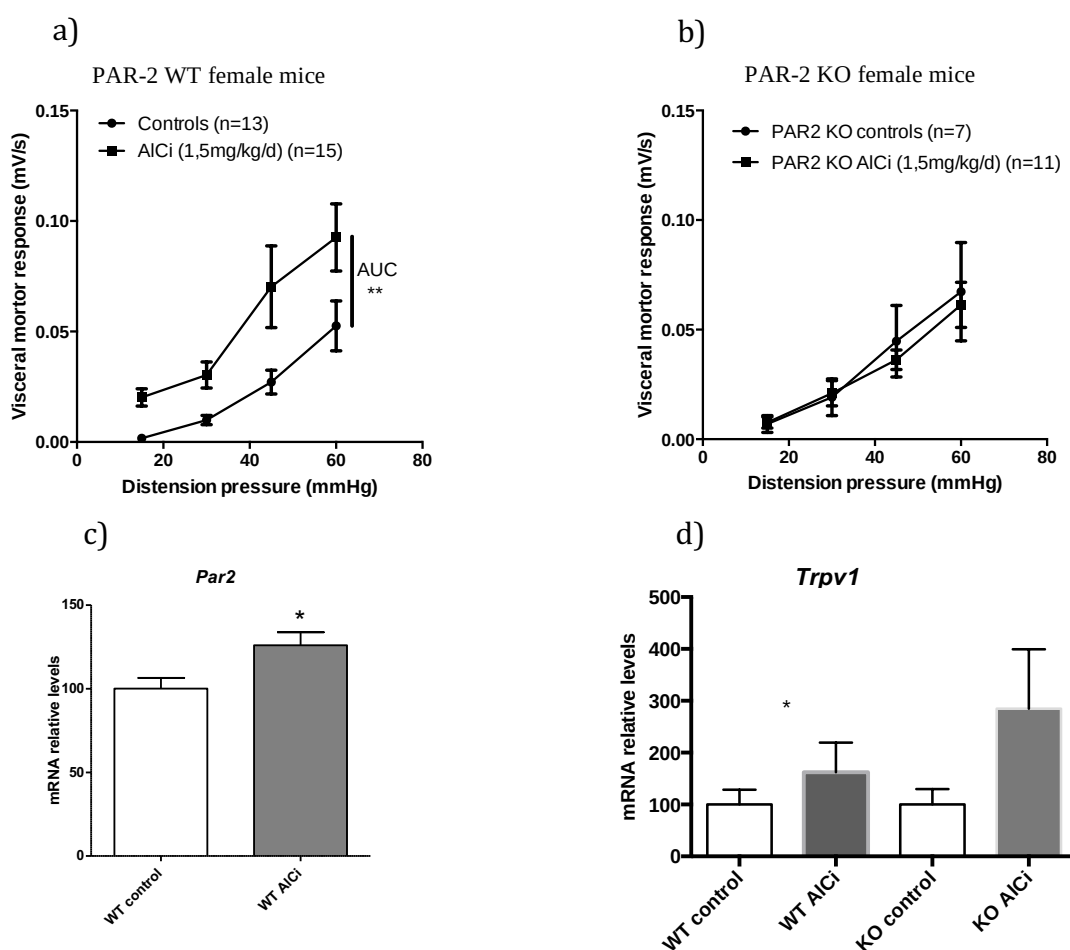


Figure 11 : Importance de PAR-2 dans l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al. Des souris femelles (a) PAR-2 WT et (b) PAR-2 KO ont été traitées par de l'eau ou de l'AlCi à la dose de 1,5 mg/kg/j pendant 1 mois. La réponse viscéromotrice (mV/s) à la DCR a été mesurée à 15, 30, 45 et 60 mmHg. L'expression relative de (c) *Par2* et de (d) *Trpv1* a été évaluée dans le côlon des souris WT et PAR-2 KO pour *TRPV1* par RT-qPCR. L'expression de *PolR2a* a été utilisée comme gène de référence. * $p<0,05$ ** $p<0,01$

3. Etude des effets de l'aluminium et de PAR-2 sur la perméabilité intestinale.

Des perturbations de la barrière intestinale ont été décrites à la suite d'une intoxication orale par l'Al (Pineton de Chambrun et al., 2014) et l'activation de PAR-2 semble favoriser l'augmentation de la perméabilité intestinale (Vergnolle, 2005). Nous avons donc étudié par FITC dextran les effets de l'Al sur la perméabilité intestinale paracellulaire des souris WT et PAR-2 KO contrôles ou intoxiquées par 1,5 mg/kg/j d'Al. Nous avons ensuite évalué l'expression en ARNm de 10 gènes codant les protéines de jonctions serrées intestinales.

Les souris WT intoxiquées par l'Al ont une augmentation significative de la concentration en FITC Dextran dans leur sérum (14,3 mg/ml) par rapport aux souris contrôles (5,34 mg/ml) ($p < 0,05$) (figure 12a). Ces observations ont été confirmées par une diminution significative de l'expression de la protéine de jonctions serrées 1 (Tjp 1) ($p < 0,05$) (figure 12b) et de la claudine 4 (Cldn 4) ($p < 0,05$) (figure 12c) chez les souris traitées par l'Al par rapport aux souris contrôles. Aucune différence de la concentration en FITC Dextran n'a été observée chez les souris PAR-2 KO intoxiquées ou non par l'Al (figure 12a). Ces observations ont été confirmées par l'absence de différence dans l'expression des gènes des protéines de jonctions entre les souris KO traitées ou non par l'Al (figure 12b, c).

Les effets de l'Al sur la perméabilité intestinale décrits chez la souris WT sont abolis chez la souris PAR-2 KO. L'augmentation de la perméabilité intestinale induite par l'Al est donc corrélée avec l'activation de PAR-2.

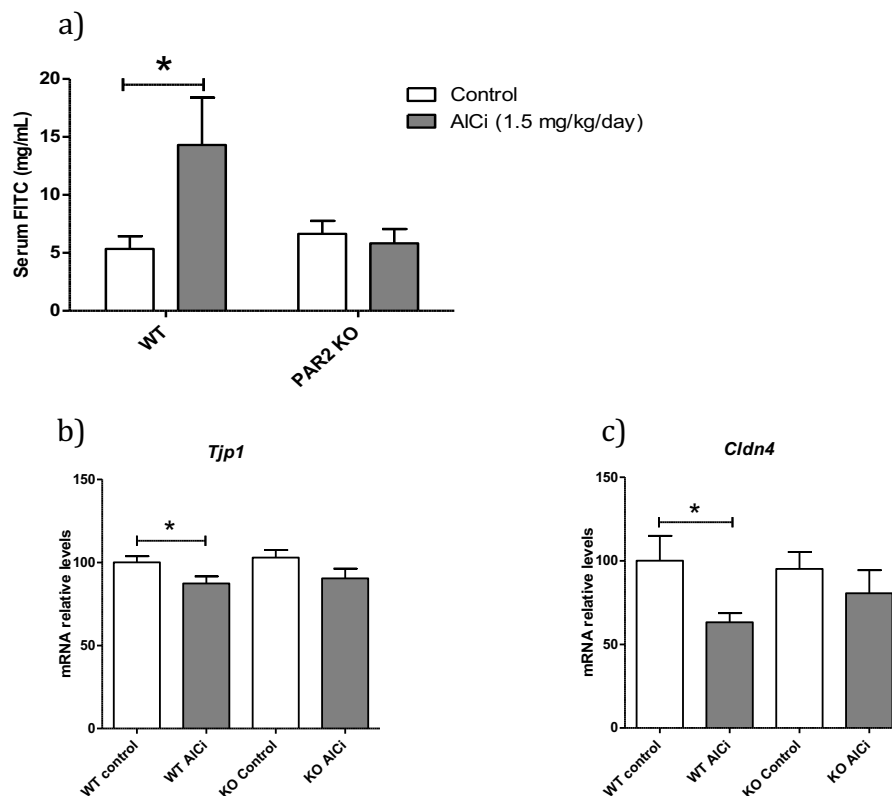


Figure 12 : **Mise en évidence des effets de l'aluminium et de PAR-2 sur la perméabilité intestinale.** Des souris femelles PAR-2 WT et PAR-2 KO ont été traitées par de l'eau ou de l'AlCi à la dose de 1,5 mg/kg/j pendant 1 mois. La perméabilité intestinale paracellulaire (a) a été évaluée dans les différents groupes par gavage de FITC dextran (4kD) puis dosage de la fluorescence dans le serum des souris 3h après administration. L'expression relative de (b) *Tjp1* et de (c) *Cldn4* a été évaluée dans le côlon des souris WT et KO traitées par de l'eau ou de l'AlCi (1,5 mg/kg/j pendant 1 mois) par RT qPCR. L'expression de Polr2a a été utilisée comme gène de référence. * $p < 0,05$

Résultats complémentaires

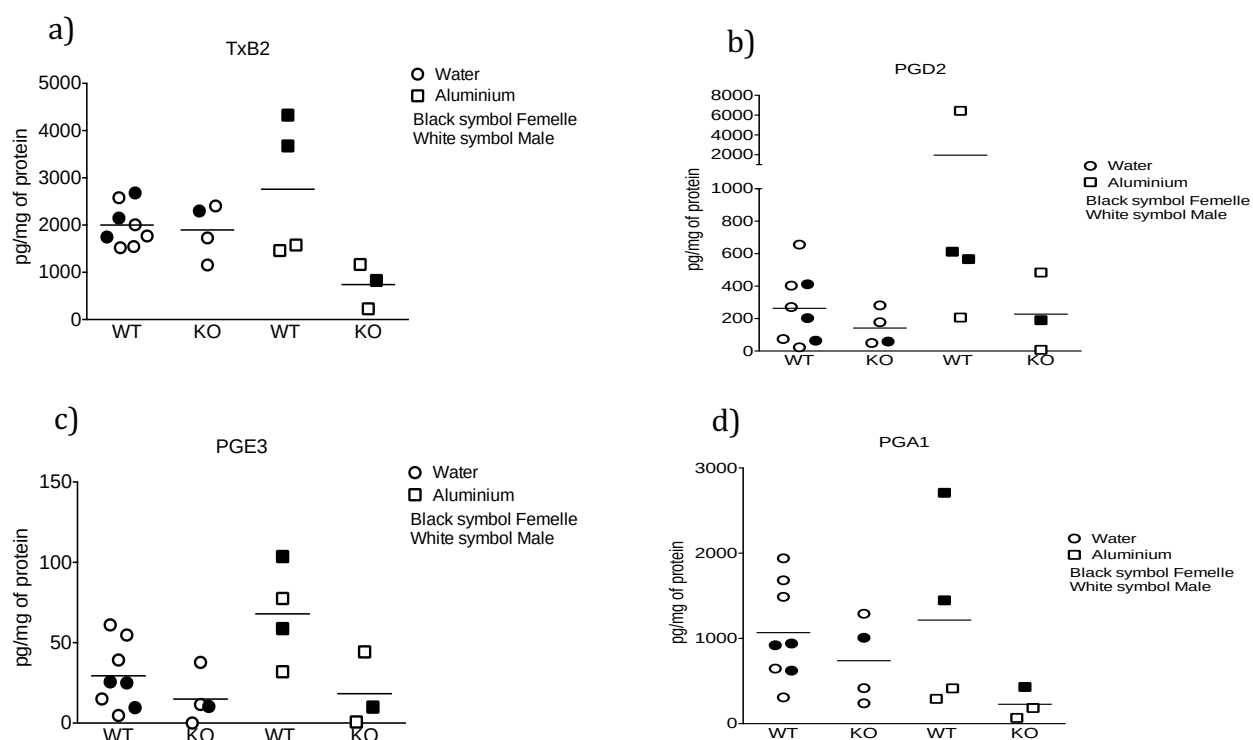
I. Quantification des métabolites des acides gras polyinsaturés dans le côlon

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) peuvent activer les voies de signalisation de TRPV1, TRPV4 et TRPA1 (Bang et al., 2010). Le but de cette expérience préliminaire était d'évaluer si l'Al administré par voie orale (1,5 mg/kg/j) pouvait influencer la concentration de différents

métabolites des AGPI dans le côlon de souris mâles WT (contrôles n=5, Al n=2), femelles WT (CT n=3, Al n=2) et mâles Par-2 KO (CT n=3, Al n=2), femelles PAR-2 KO (CT n=1, Al n=1) par rapport à des souris contrôles.

Dans les voies de dégradation des AGPI par la cyclooxygénase, une tendance à l'augmentation du thromboxane B2, des prostaglandines D2, E2, E3, A1 et de la 8-iso prostaglandine A2 a été observée pour les souris femelles WT intoxiquées par l'Al par rapport aux femelles WT contrôles et aux femelles PAR-2 KO traitées ou non par l'Al (figure 13 a,b,c,d,e,f). Aucune différence n'a été observée chez les mâles. Dans la voie de dégradation des AGPI passant par la lipoxygénase, une tendance à l'augmentation de l'acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque a également été observée pour les souris femelles WT intoxiquées par l'Al par rapport aux femelles WT contrôles et aux femelles PAR-2 KO traitées ou non par l'Al (figure 13 g).

Les effectifs sont faibles et ne permettent pas de conclure, cependant il semblerait que l'Al puisse favoriser l'augmentation de certains métabolites de dégradation des AGPI chez la femelle et de manière dépendante de PAR-2.



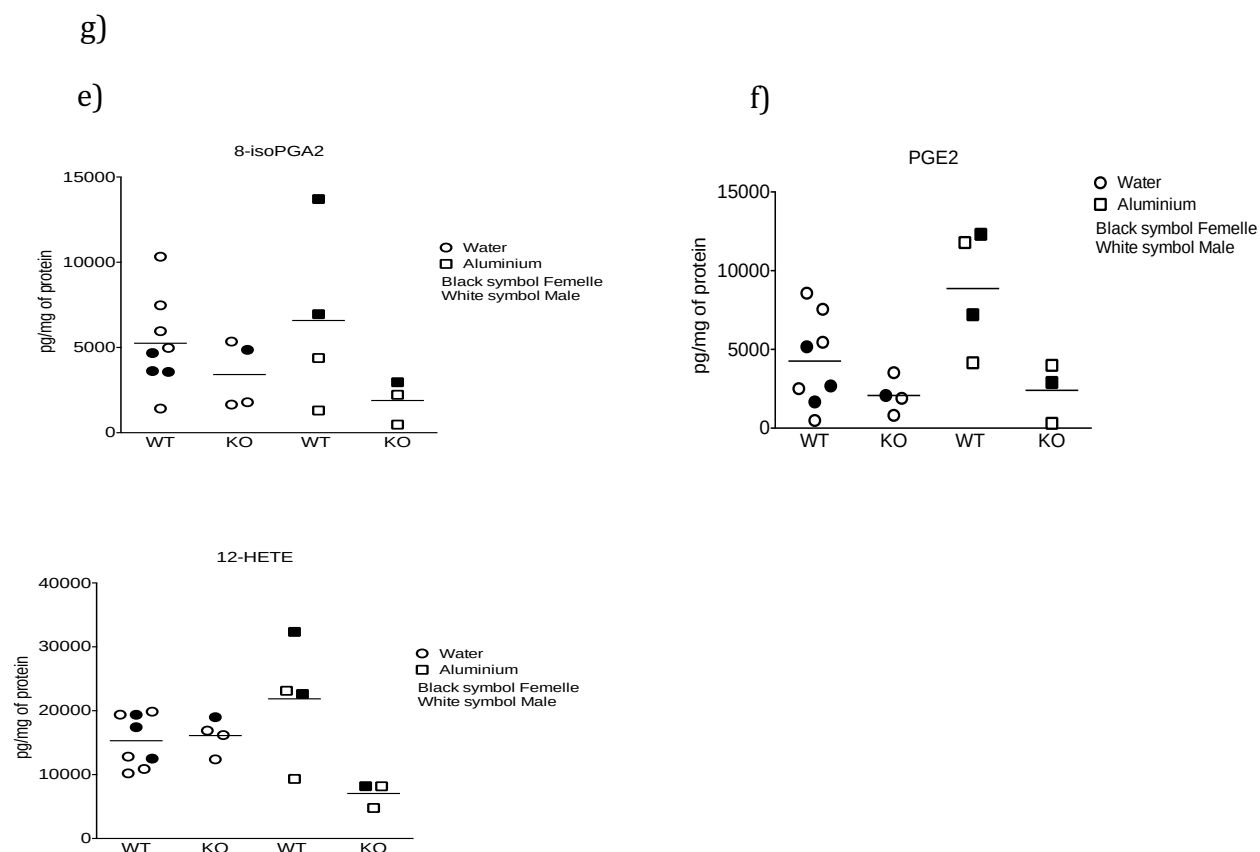


Figure 13 : **Quantification de la concentration en métabolites des AGPI dans le côlon.**

Les souris femelles PAR-2 WT et PAR-2 KO ont été traitées par de l'eau ou de l'AlCi à la dose de 1,5 mg/kg/j pendant 1 mois. Les concentration des métabolites dérivés des AGPI par la cyclooxygénase (a,b,c,d,e,f) et la lipoxygénase ont été quantifiées dans le côlon des différents groupes. WT mâles eau (n=5), WT femelles eau (n=3), KO mâles eau (n=3), KO femelles eau (n=1), WT mâles AlCi (n=2), WT femelles AlCi (n=2), KO mâles AlCi (n=2), KO femelles AlCi (n=1)

Discussion

Le SII est une maladie multifactorielle dont les causes sont inexpliquées à ce jour. Les études cliniques réalisées chez les patients ont permis de mieux caractériser cette maladie et de mettre en évidence des altérations au niveau intestinal de la sensibilité, de la perméabilité, de la motilité, de la réponse immunitaire et du microbiote. Ces dysfonctionnements semblent être impliqués dans la génération des symptômes décrits dans les différents types de SII. Cependant, les relations de cause à effet et les phénomènes impliqués dans la genèse des symptômes restent, à ce jour, inconnus.

Les études épidémiologiques, cliniques, animales et *in vitro*, semblent indiquer que l'environnement joue un rôle majeur dans le développement du SII. Ainsi, l'implication du stress et de la nourriture, notamment avec les FODMAPs (Mansueto et al., 2015), a été largement étudiée dans le SII. Bien que ces études apportent de nouvelles hypothèses concernant notamment les liens entre les effets des facteurs environnementaux et les symptômes décrits dans le SII, aucun de ces facteurs n'a pu être déterminé comme en étant la cause.

Comme décrit dans l'introduction, le SII peut être associé à d'autres maladies appartenant aux intolérances idiopathiques environnementales (IEI) (Kipen and Fiedler, 2002; Wiesmüller et al., 2003). De plus, l'environnement et notamment les polluants semblent fortement associés aux maladies appartenant aux IEI. Alors que l'implication de ces polluants est décrite dans la majeure partie des perturbations observées dans le SII, et notamment au niveau de la sensibilité viscérale, de la perméabilité, de la réponse immunitaire, du microbiote et de la motilité, aucune étude n'a été réalisée pour évaluer l'implication des polluants dans le SII.

Dans la nature, l'Al représente le 3^e élément le plus présent dans la couche terrestre et son utilisation industrielle a considérablement augmenté ces dernières années (Exley, 2013). L'homme y est exposé par diverses voies, cependant, l'ingestion de nourriture et d'eau ainsi que la clairance mucociliaire sont les principales voies d'entrée de l'Al au niveau du tube digestif (Bassioni et al., 2012; Möller et al., 2004; Stahl et al., 2011). Bien que l'absorption intestinale de l'Al est estimée entre 0,1% et 1% en fonction de sa forme chimique (Poirier et al., 2011; Priest et al., 1996; Schönholzer et al., 1997; Taylor et al., 1998), il peut s'accumuler dans de nombreux organes tels que les os, le cerveau, les muscles, la rate, le foie, les reins, le cœur, les poumons et dans la muqueuse intestinale (Cunat et al., 2000; Powell et al., 1994). L'Al semble avoir des effets pro oxydants, excito-toxiques, immunogènes, pro-inflammatoires,

mutagènes, nocifs pour l'organisme et associés à des pathologies telles que l'ostéomalacie, l'encéphalopathie ou suspectés dans la maladie d'Alzheimer, Parkinson, le cancer du sein ou le syndrome de la myofasciite à macrophages. Dans cette dernière, il est associé à la persistance de douleurs chroniques. Dans une étude réalisée au sein du laboratoire, nous avons montré que l'administration chronique d'Al par voie orale favorisait l'augmentation de la translocation bactérienne de l'intestin vers les ganglions mésentériques, suggérant une augmentation de la perméabilité intestinale (Pineton de Chambrun et al., 2014). De plus, les perturbations de l'intégrité de la barrière intestinale semblent jouer un rôle majeur dans l'hypersensibilité viscérale, notamment chez les patients atteints par le SII (Bertiaux-Vandaële et al., 2011).

Le but de mon travail de thèse a été de déterminer si l'Al pouvait être impliqué dans les perturbations de la sensibilité viscérale et d'évaluer s'il pouvait être considéré comme un facteur de risque environnemental dans le SII.

Les effets systémiques, immunologiques, neurologiques de l'intoxication orale par l'Al sont bien décrits. Cependant, très peu d'études ont évalué les potentiels effets toxiques de l'Al sur le système gastro-intestinal. Nous avons montré que l'Al favorisait la formation de granulomes, diminuait la cicatrisation, aggravait l'inflammation et augmentait la perméabilité intestinale, montrant l'éventuelle implication de l'Al dans la pathogénèse des MICI. Au cours de ma thèse, j'ai étudié les effets de l'Al sur la sensibilité viscérale.

Comme décrit dans l'introduction, plusieurs études ont montré que l'Al est associé avec des maladies présentant des symptômes douloureux. Nous avons montré que l'Al ingéré, et éventuellement son accumulation intestinale, favorisait l'hypersensibilité viscérale en réponse à la DCR chez le rat et la souris. L'intensité et la rapidité d'apparition de l'hypersensibilité en réponse à l'intoxication par l'Al étaient dépendantes de la dose ingérée. L'effet était persistant dans le temps, même après arrêt de l'intoxication, et il était amplifié lors d'une nouvelle intoxication. Il n'y a ainsi aucun phénomène de tolérance vis-à-vis des effets de l'Al sur l'hypersensibilité viscérale qui se met en place, tout comme pour les malades atteints de la myofasciite à macrophages qui éprouvent des douleurs 10 ans après l'injection de l'Al vaccinal (Gherardi and Authier, 2012). En corrélation avec les résultats obtenus au sein du laboratoire (Pineton de Chambrun et al., 2014), l'ingestion d'Al à la dose de 1,5mg/kg/j ne perturbait pas l'expression des gènes de l'inflammation et n'altérait pas le recrutement des cellules immunitaires dans le côlon. Ces observations suggèrent que l'ingestion d'Al à une dose cohérente avec l'exposition humaine peut exacerber et non induire la réponse inflammatoire au niveau du côlon.

Dans notre modèle d'hypersensibilité viscérale chez le rat, nous avons montré que l'augmentation de la sensibilité viscérale induite par l'Al n'était pas associée à une inflammation, entraînait une diminution du seuil de douleur d'environ 30% chez les rats mâles après 1 mois d'ingestion par rapport aux contrôles, et était plus rapide et plus intense chez les femelles. Les résultats de notre étude sont en faveur d'une susceptibilité accrue des femelles à l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al, laissant supposer que les hormones sexuelles pourraient altérer la réponse des voies sensibles impliquées dans les effets de l'Al. Cependant, le rôle de la réponse hormonale n'a pas été évalué dans notre étude.

En corrélation avec ce que nous avons observé dans notre modèle d'hypersensibilité viscérale induit par l'Al, les altérations de la sensibilité intestinale des patients atteints par le SII ne semblent pas être causées par le recrutement de cellules immunitaires, ni par l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires. Les malades présentent également des altérations du seuil de sensibilité viscérale. En effet, les tests de DCR sur les patients ont montré une diminution du seuil de douleur d'environ 30% par rapport à des sujets sains, ce qui est proportionnel aux effets de l'Al dans notre modèle. (Bouin et al., 2002; Kuiken et al., 2005). Enfin, nous avons montré que les femelles sont plus sensibles que les mâles à l'Al. En corrélation avec cette observation, les femmes représentent 70% des patients atteints par le SII (Drossmann et al., 1990; Kennedy et al., 1998; Manning et al., 1978). De plus, il n'y a pas de différence de sensibilité intestinale entre les hommes et les femmes en réponse à la DCR chez les patients sains (Benson et al., 2012), tandis que les femmes atteintes par le SII développent une sensibilité accrue en réponse à la DCR par rapport aux hommes (Chang et al., 2006b; Posserud et al., 2004). De nombreuses études ont cherché à comprendre les facteurs impliqués dans cette prévalence. Ainsi, les rôles de l'anxiété, du stress et des hormones sexuelles sur les symptômes gastro-intestinaux durant les différentes phases du cycle menstruel, la ménopause, la grossesse, les traitements hormonaux ou la chirurgie ont été évalués (Cain et al., 2009; Y. Tang et al., 2012). La variation des taux d'hormones sexuelles telles que les œstrogènes et la progestérone, notamment lors du cycle menstruel, peut perturber la sensibilité viscérale en induisant des effets analgésiques, hyperalgésiques, anti ou pro-inflammatoires. De plus, les mastocytes, qui semblent être impliqués dans les douleurs viscérales, peuvent être activés par l'oestradiol et inhibés par la progestérone. Au contraire, les hormones mâles telles que la testostérone et l'androgène favorisent la diminution de la douleur (Mulak et al., 2014). Ces études montrent que les hormones sexuelles peuvent influencer la sévérité des symptômes du SII, en perturbant notamment les symptômes gastro-intestinaux comme les douleurs abdominales, l'inconfort et la sensibilité rectale (Chang et al., 2001; Houghton et al., 2002;

Moore et al., 1998). Les hormones sexuelles semblent ainsi jouer un rôle important dans la physiopathologie du SII. Cependant, de nombreuses variations existent dans les résultats obtenus. Les études sur le stress, l'anxiété ou les hormones sexuelles n'ont pas permis d'identifier avec certitude l'implication de ces facteurs dans le développement du SII (Mulak et al., 2014). Les perturbations de la sensibilité viscérale induites par l'Al dans notre modèle semblent avoir un rationnel important par rapport aux observations réalisées chez les patients atteints par le SII.

La tomographie par émission de positons est une technique d'imagerie médicale fonctionnelle métabolique. C'est une scintigraphie qui permet de fournir une image précise de l'activité cellulaire du tissu ciblé après l'injection par voie intraveineuse (chez l'homme et l'animal) ou intrapéritonéale (chez l'animal) d'un traceur faiblement radioactif. Le [^{18}F] flurodéoxyglucose ([^{18}F]-FDG) est un sucre semblable au glucose qui est métabolisé par les tissus les plus actifs. Après l'injection, le sujet est placé dans un appareil qui enregistre les rayonnements émis par l'organe ciblé et reproduit les images précises du traceur au sein de l'organe en 3 dimensions. La TEP permet ainsi d'obtenir des images de l'activité et du fonctionnement des organes, des tissus et des cellules. Dans notre cas, le [^{18}F]-FDG permet d'étudier l'activité des différentes régions cérébrales. Chez le rat, les études sur l'hypersensibilité viscérale dans un modèle d'anaphylaxie du côlon et dans un modèle de traitement par le TNBS ont montré que l'augmentation de la sensibilité viscérale en réponse à la DCR est associée à l'augmentation de l'activité du thalamus mesurée par la TEP. Dans l'étude de Ohashi et de ses collaborateurs, l'augmentation de l'activité du thalamus en réponse à la DCR avait lieu pendant l'allodynie (Ohashi et al., 2008; Wang et al., 2015). La TEP permet ainsi de détecter l'activation des zones du cerveau en réponse à des stimuli douloureux de faibles intensités. Ces études montrent que la TEP est une méthode non invasive prometteuse pour étudier l'activation cérébrale en réponse à la douleur viscérale. De plus, il semble que le thalamus est activé en réponse à la stimulation douloureuse de l'intestin et que son activité est exacerbée en cas d'hypersensibilité viscérale.

Au cours de ma thèse, nous avons étudié l'impact de l'administration orale d'AlCi à la dose de 1,5 mg/kg/j pendant 1,5 an sur le cerveau de souris. Pour cela, les animaux ont été étudiés par TEP après injection de [^{18}F]-FDG. Nous avons observé que les souris traitées par 1,5 mg/kg/j pendant 1,5 an avaient une augmentation de l'absorption du traceur radioactif au niveau du thalamus par rapport aux souris contrôles. Ainsi, nos résultats sont en corrélation avec les études montrant que le thalamus est activé dans les modèles d'hypersensibilité viscérale chez le rat (Ohashi et al., 2008; Wang et al., 2015). L'intoxication chronique par l'Al

favorise donc le métabolisme du thalamus dans notre modèle d'hypersensibilité viscérale. De plus, le thalamus semble être le relai central de la douleur au niveau cérébral entre les afférences nerveuses et les cortex cingulaire et insulaire (Casey et al., 1994; Derbyshire et al., 1994). Ainsi, le système nerveux central pourrait être impliqué dans les phénomènes d'hypersensibilité viscérale en réponse à l'administration chronique d'Al.

En accord avec les modèles animaux, les études réalisées chez l'Homme ont montré que la stimulation douloureuse du système gastro-intestinal favorise l'activation du thalamus (Chang, 2005). Les méthodes d'imagerie par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et TEP ont permis de montrer que le thalamus est activé au cours de l'hypersensibilité viscérale en réponse à la distension colrectale, notamment chez les patients atteints par le SII (Kwan et al., 2005; Mertz et al., 2000; Ringel et al., 2003; Yuan et al., 2003). Les effets de l'Al sur l'augmentation de l'activité du thalamus et sur la sensibilité viscérale permettent de penser que l'intoxication chronique à une faible dose d'Al pourrait être un phénomène non négligeable dans l'hypersensibilité viscérale des patients atteints par le SII.

Les mécanismes, par lesquels l'administration orale d'Al induit l'hypersensibilité au niveau du côlon distal en réponse à la DCR, sont inconnus, et aucune variation dans l'analyse des marqueurs de l'inflammation n'a été observée. L'implication d'autres mécanismes, notamment ceux susceptibles de favoriser l'hypersensibilité viscérale des patients atteints de SII, a été évaluée. L'étude de la dégranulation des mastocytes a permis de montrer que les rats traités par l'Al avaient une augmentation de l'activation des mastocytes par rapport aux rats contrôles (figure 14). Ceci a été corrélé avec l'augmentation de l'expression de l'histidine décarboxylase et de la concentration en histamine dans le côlon des rats traités par l'Al. Les mastocytes sont connus pour leur rôle dans les réactions allergiques et anaphylactiques. Cependant, ils peuvent également être impliqués dans l'immunité innée. Les mastocytes semblent être des facteurs majeurs de l'inflammation à bas grade décrite dans le SII et notre modèle présente plusieurs similarités avec les observations réalisées chez les patients. En effet, plusieurs études ont évalué le rôle des mastocytes dans le SII et ont décrit une augmentation du nombre de mastocytes, de leur proximité avec les terminaisons nerveuses entériques et de leur dégranulation chez les malades (Giovanni Barbara et al., 2004; Park et al., 2003). En corrélation avec nos observations, les études de Barbara et de ses collaborateurs ont montré qu'il y a une augmentation de la dégranulation des mastocytes dans les biopsies et de la concentration en histamine et en tryptase dans le surnageant des biopsies de patients atteints par le SII. Ces études ont également mis en évidence que l'augmentation des mastocytes à proximité des terminaisons nerveuses était associée à la sévérité des douleurs abdominales observées chez les patients

(Barbara et al., 2007; Giovanni Barbara et al., 2004). Ainsi, il existe un fort rationnel dans l'implication des mastocytes sur les symptômes du SII, notamment par leur localisation dans les couches muqueuses et séreuses de l'intestin et la proximité avec les terminaisons nerveuses et par leur implication dans les symptômes abdominaux (Philpott et al., 2011). Les traitements visant à diminuer l'infiltrat et l'excrétion des médiateurs des mastocytes semblent jouer un rôle non négligeable dans l'amélioration des symptômes des patients atteints de SII. Ainsi, le traitement par le cromoglycate de sodium, un stabilisateur membranaire des mastocytes efficace pour le traitement des allergies et des mastocytoses (Brogden et al., 1974), était capable de diminuer les douleurs abdominales des malades (Ebrahimi Daryani et al., 2009).

Pour évaluer l'importance de la dégranulation des mastocytes dans notre modèle d'hypersensibilité viscérale en réponse à l'intoxication par l'Al, les rats ont été traités par le cromoglycate de sodium afin d'empêcher l'activation des mastocytes simultanément avec l'intoxication par 1,5mg/kg/j d'Al. Les animaux traités par le cromoglycate de sodium ont montré une augmentation de leur seuil de douleur en réponse à la DCR par rapport aux animaux traités par le véhicule (PBS) corrélé à une diminution de l'activation de leurs mastocytes dans le côlon.

L'importance des mastocytes dans l'augmentation de la sensibilité viscérale a également été étudiée à l'aide de souris génétiquement modifiées de type C57BL/6 Kit^{W-sh/W-sh}. Ces souris ont une inversion génique sur le chromosome 5 coupant une partie des éléments de régulation du gène kit, ce qui induit une altération de la voie de signalisation des tyrosines kinases dépendante du récepteur c-Kit. Elles développent des perturbations dans le développement, la survie et la fonction des mastocytes (Grimbaldeston et al., 2005). En rapport avec les observations réalisées chez le rat, l'ingestion de 1,5 mg/kg/j d'AlCi pendant 1 mois favorisait une augmentation significative de la sensibilité viscérale des souris C57Bl/6 par rapport aux souris contrôles. Cependant, aucun effet de l'Al sur la sensibilité intestinale n'a été observé pour les souris de type Kit^{W-sh/W-sh} déficientes en mastocytes.

L'étude de Coelho et de ses collaborateurs avait déjà montré l'importance de l'activation des mastocytes dans la diminution du seuil de sensibilité en réponse à la DCR chez le rat. Ainsi, ces résultats sont en faveur d'un rôle majeur des mastocytes et de leur activation dans l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al et sont particulièrement cohérents avec les observations faites chez les patients atteints de SII (figure 14). Lorsqu'ils sont activés, les mastocytes rejettent des médiateurs biologiques variés tels que la tryptase, l'histamine, la sérotonine et des prostaglandines. Ces médiateurs sont capables d'activer les nocicepteurs situés dans l'intestin. Les études chez l'Homme et le cochon ont montré que les médiateurs

rejetés par les mastocytes sont également capables de stimuler les nerfs entériques et de favoriser l'hyperexcitabilité des neurones (Buhner and Schemann, 2012).

Afin d'étudier le rôle des principaux nocicepteurs de la douleur, nous avons évalué leur expression dans le côlon des rats traités ou non par 1,5mg/kg/j d'Al. Les résultats obtenus montrent une diminution significative de l'expression de Cb1 et Par-4 dans le côlon des rats traités par l'Al par rapport aux rats contrôles. Ces deux gènes ont un effet analgésique au niveau intestinal, notamment en diminuant la réponse viscéromotrice en réponse à la DCR lorsqu'ils sont activés (Annaházi et al., 2012; Augé et al., 2009; Sanson et al., 2006). Au contraire, une augmentation significative de l'expression de Par-2, Trpv1 et Trpv4 a été observée dans les mêmes échantillons. Les études ont montré que ces trois gènes ont un effet hyperalgésique dans le tractus gastro-intestinal (figure 14) (Cenac, 2011; Cenac et al., 2008; van den Wijngaard et al., 2009; Vergnolle, 2009). L'Al modifie l'expression de récepteurs jouant un rôle primordial dans la réponse nociceptive intestinale. En effet, la diminution de l'expression de Cb1 et l'augmentation de l'expression de Trpv1 ont déjà été décrites dans un modèle d'hypersensibilité viscérale induit par le stress (Hong et al., 2009). Ainsi, l'intoxication par l'Al à une dose cohérente avec l'exposition humaine peut induire l'altération de l'expression de deux gènes qui est également modifiée dans un autre modèle d'hypersensibilité viscérale. De plus, Augé et ses collaborateurs ont montré que l'activation de PAR-4 diminue l'hypersensibilité induite par l'activation de PAR-2 et TRPV4 chez la souris (Augé et al., 2009). La diminution de l'expression de Par-4 dans notre étude pourrait donc favoriser l'augmentation de l'expression de Par-2 et de Trpv4 dans le côlon des rats traités par l'Al par rapport aux rats contrôles et être impliquée dans l'hypersensibilité viscérale. En accord avec nos résultats, l'analyse des biopsies coliques de patients atteints de SII montre une diminution de l'expression de Par-4 (Zhao et al., 2012) et une augmentation de l'expression de Trpv1 en association avec la douleur abdominale (Akbar et al., 2008).

L'expression du récepteur PAR-2 est également augmentée dans le côlon des rats traités par l'Al par rapport aux rats contrôles. Ce récepteur est activé par les protéases, et notamment par la tryptase excrétée par les mastocytes. Ainsi, l'augmentation des protéases circulantes dans le côlon pourrait favoriser l'activation de PAR-2 et induire l'hypersensibilité viscérale à long terme (Coelho et al., 2002). De plus, PAR-2 est exprimé sur les afférences nerveuses entériques et primaires. Son activation par la tryptase pourrait ainsi favoriser l'hyperexcitabilité des neurones dans notre modèle comme observé chez le cochon (Reed et al., 2003) (figure 14). En plus d'être excrétées par les mastocytes, les protéases peuvent provenir d'autres sources dont l'épithélium intestinal. Ainsi, nous devons maintenant déterminer avec certitude le type et la

provenance des protéases impliquées dans la diminution du seuil de sensibilité viscérale observée dans notre modèle. Une étude de Cénac et de ses collaborateurs a montré une augmentation de l'activité protéolytique dans le surnageant des biopsies de patients atteints par le SII, avec notamment l'augmentation de la tryptase. L'injection intrarectale de ces surnageants favorisait l'hypersensibilité viscérale chez la souris de façon dépendante de PAR-2 (Cenac et al., 2007). L'étude de Valdez-Moralez et ses collaborateurs a montré que le surnageant des biopsies de patients atteints de SII-D favorisait l'excitation des neurones des ganglions rachidiens postérieurs de la souris de manière dépendante de PAR-2 (Valdez-Morales et al., 2013). Ces études mettent en avant le rôle majeur de PAR-2 dans les douleurs viscérales des patients atteints de SII. Les études réalisées sur TRPV1 et TRPV4 ont montré que ces récepteurs favorisent également l'hypersensibilité viscérale. De plus, PAR-2 est co exprimé avec TRPV1 et TRPV4 et peut être impliqué dans leur activation pour induire l'hypersensibilité (Amadesi et al., 2004; Dai et al., 2004; Grant et al., 2007; Poole et al., 2013). Ainsi, l'augmentation de l'expression de ces récepteurs dans le côlon des rats intoxiqués par l'Al suggère que l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al est médiée par le récepteur PAR-2 en favorisant l'activation des récepteurs TRPV1 et TRPV4 (figure 14). En outre, TRPV1 et TRPV4 peuvent être activés directement par l'histamine excrétée par les mastocytes pour favoriser l'hypersensibilité viscérale (Balemans et al., 2014).

Afin de confirmer l'hypothèse que le récepteur PAR-2 joue un rôle majeur dans l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al, nous avons utilisé des souris KO pour le récepteur PAR-2. Dans un premier temps, nous avons étudié les effets de l'Al sur la sensibilité viscérale de la souris WT afin de confirmer les résultats obtenus chez le rat. Le traitement des souris WT par 1,5mg/kg/j d'Al pendant 1 mois favorisait l'augmentation de la réponse viscéromotrice intestinale en réponse à la DCR par rapport aux souris contrôles. De plus, l'expression de Par-2 et Trpv1 était augmentée pour les souris WT recevant de l'Al par rapport aux contrôles. Ces résultats confirment les résultats obtenus dans notre modèle d'hypersensibilité viscérale chez le rat. Chez les souris PAR-2 KO, le traitement par l'Al n'induisait aucune différence de la sensibilité viscérale par rapport aux souris KO contrôles. De plus, aucune variation de l'expression de Trpv1 n'a été observée entre les souris KO traitées ou non par l'Al. Ces résultats suggèrent que l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al ainsi que l'augmentation de l'expression de Trpv1 sont dépendantes de l'activation de PAR-2.

Les souris WT traitées par l'Al avaient une augmentation de la perméabilité intestinale par rapport aux souris WT contrôles. Ces résultats étaient associés à la diminution de l'expression des protéines de jonction Tjp1 et Cldn4 dans le côlon des souris présentant une

augmentation de la perméabilité intestinale (figure 14). Aucune différence n'a été observée pour les souris PAR-2 KO traitées ou non par l'Al. L'évaluation de la perméabilité des côlons de souris WT, KO, traitées ou non par l'Al en Chambre de Ussing devrait permettre de confirmer ces observations. Les résultats obtenus sont en accord avec les différentes études qui montrent que la perméabilité paracellulaire de l'intestin est favorisée par l'activation de PAR-2, notamment en réponse à la tryptase (Annaházi et al., 2013; Gecse et al., 2008; Jacob et al., 2005; Wilcz-Villega et al., 2013). Les études chez les patients ont également montré que les sérines protéases des surnageants fécaux de patients SII et la tryptase favorisaient l'augmentation de la perméabilité, ainsi que l'altération de l'expression et le réarrangement des protéines de jonctions serrées (Gecse et al., 2008; Lee et al., 2010). PAR-2 et les protéases semblent jouer un rôle important dans l'altération de l'intégrité de la barrière intestinale chez le patient atteint par le SII ainsi que dans notre modèle d'hypersensibilité viscérale.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des lipides dont la chaîne carbonée est composée d'au moins deux doubles liaisons. Les AGPI sont répartis en deux familles : les n-3 (ou oméga-3) dont le précurseur est l'acide α -linoléique et les n-6 (ou oméga 6) dont le précurseur est l'acide linoléique. Les AGPI tels que l'acide eicosapentaénoïque (oméga-3) ou l'acide arachidonique (oméga-6) dérivent de ces deux précurseurs et favorisent la synthèse de nombreux métabolites à l'aide de réactions non enzymatiques et enzymatiques par l'intermédiaire d'enzymes telles que la cyclooxygénase, la lipoxygénase et la cytochrome epoxygenase. Les acides gras ne sont pas synthétisables par l'organisme et sont apportés par l'alimentation. Les AGPI participent à un grand nombre de fonctions physiologiques dans l'organisme, notamment en participant à la constitution des membranes et aux fonctions cellulaires, à la régulation de l'expression de certains gènes, à la fourniture d'énergie pour l'organisme. Les métabolites dérivant des AGPI semblent également être impliqués dans l'activation, l'inhibition ou la potentialisation des TRP tels que TRPV1, TRPV4 et TRPA1 (Bang et al., 2010).

Nous avons réalisé un travail préliminaire afin de déterminer si le traitement des souris par l'Al pouvait perturber la concentration des métabolites dérivés des AGPI dans le côlon. Cette étude semble montrer une tendance à l'augmentation de certains métabolites de dégradation des AGPI chez les souris femelles traitées par l'Al par rapport aux souris contrôles. De plus, il semble qu'il n'y a pas de différence entre les souris PAR-2 KO contrôles et traitées par l'Al. La tendance à l'augmentation des AGPI semble dépendante de PAR-2. De nouvelles expérimentations doivent être réalisées afin d'augmenter les effectifs de cette étude et

déterminer le rôle des AGPI dans les mécanismes d'induction de l'hypersensibilité viscérale par l'Al.

En corrélation avec nos résultats, une étude de Cénac et de ses collaborateurs a montré que la concentration de certains métabolites des AGPI est augmentée dans les biopsies de patients atteints de SII. Les AGPI de ces patients étaient des agonistes de TRPV4, favorisaient les douleurs des patients et leur injection en intrarectale induisait l'hypersensibilité viscérale chez la souris. Enfin, comme dans notre modèle, la synthèse de ces AGPI semblait dépendante de l'activation de PAR-2. Cette étude a également montré une augmentation des agonistes de TRPV1 dérivés des AGPI chez les souris hypersensibles (Cenac et al., 2015). Les tendances observées chez nos souris favoriseraient, comme chez les patients atteints de SII, une augmentation de la synthèse de certains métabolites dérivés des AGPI, dépendante de PAR-2, et favorisant l'activation de TRPV1 et TRPV4.

Les résultats obtenus sur les rongeurs traités par une dose d'Al pertinente avec l'exposition humaine ont permis de mettre en évidence que l'Al induisait une hypersensibilité viscérale chez le rat et la souris en utilisant une méthode de mesure de réponse à la DCR différente. De plus, les effets de l'Al semblaient être dépendants de la voie passant par l'activation de PAR-2. Nos observations chez le rongeur semblent avoir de nombreux points communs avec la physiopathologie du SII, notamment par le développement de l'hypersensibilité viscérale associée à une augmentation de l'activité du thalamus, à l'altération de la perméabilité intestinale, au développement d'une inflammation à bas grade par les mastocytes.

Les études épidémiologiques ont mis en évidence que la prévalence du SII est plus élevée dans les pays développés et les zones urbanisées. L'influence de la génétique semble faible dans le développement de cette maladie et de nombreuses études ont évalué le rôle des facteurs environnementaux dans le développement du SII. Ces études sont principalement focalisées sur l'implication de l'environnement familial, du stress, et de l'alimentation. Cependant, aucune étude n'a permis de mettre en évidence avec certitude l'implication de ces facteurs dans la pathogénèse du SII. L'implication des polluants environnementaux des pays développés n'a pas été évaluée dans le SII alors que ces facteurs sont impliqués dans d'autres maladies appartenant aux intolérances idiopathiques environnementales et présentant des symptômes communs avec le SII. Parmi les polluants retrouvés dans l'environnement, l'Homme est exposé quotidiennement à de faibles doses d'Al dont l'implication a été démontrée dans plusieurs pathologies et notamment dans des symptômes douloureux. Mon travail de thèse a donc cherché à évaluer si l'ingestion d'Al pouvait perturber la sensibilité viscérale. Nos

résultats ont montré que l'ingestion d'une dose d'Al pertinente avec l'exposition humaine favorisait l'hypersensibilité viscérale. De plus, les mécanismes impliqués dans ce phénomène étaient cohérents avec les observations réalisées chez les patients atteints par le SII. L'Al pourrait ainsi être un facteur de risque environnemental à étudier plus précisément pour évaluer son implication dans les perturbations de l'organisme menant à des symptômes similaires au SII.

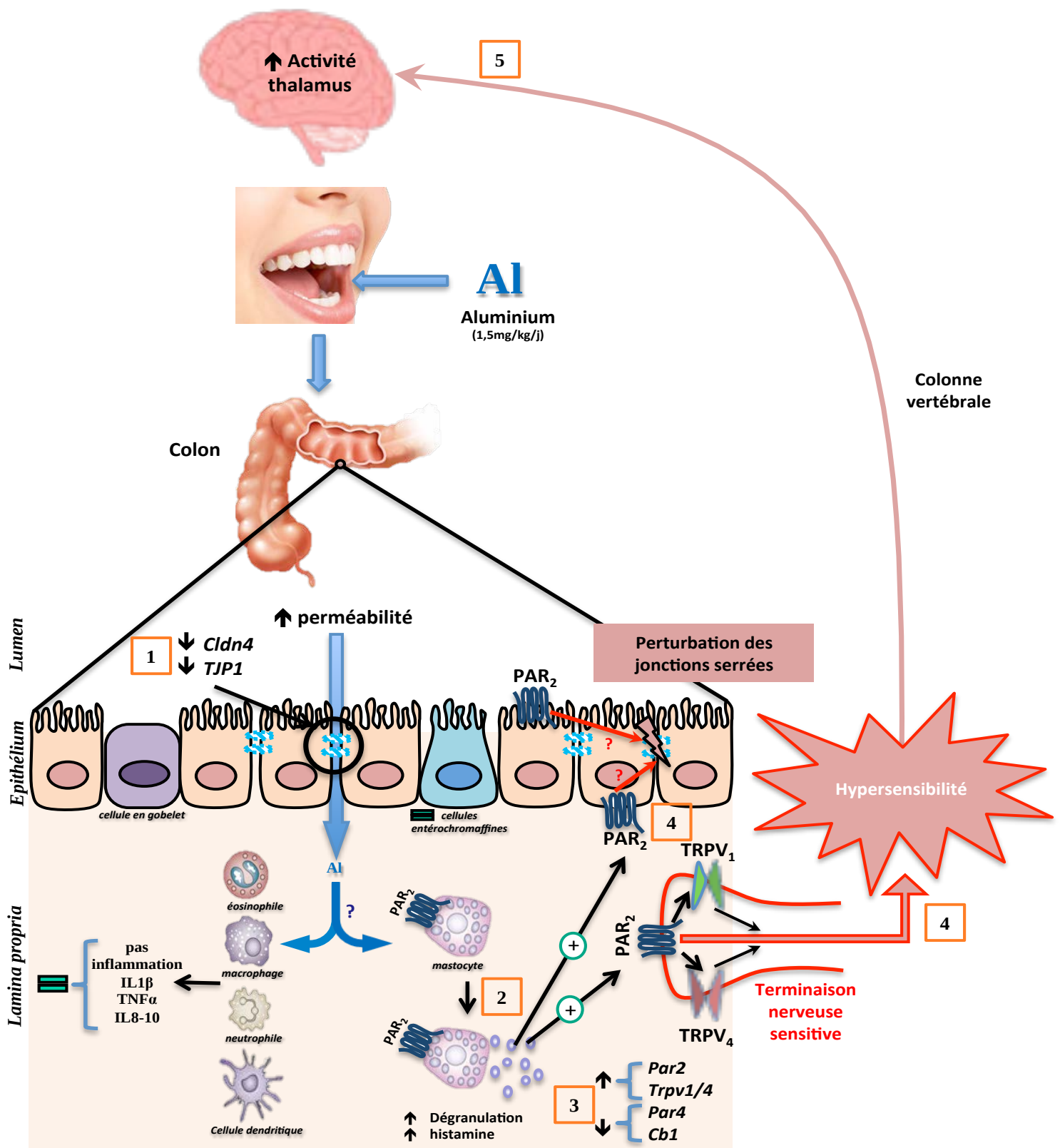


Figure 14 : Hypothèses des effets de l'aluminium sur l'hypersensibilité intestinale. L'ingestion de 1,5mg/kg/j d'Al n'induit pas de réponse inflammatoire (=). Cependant, plusieurs éléments potentiellement impliqués dans l'hypersensibilité viscérale sont dérégulés : (1) un défaut d'expression des protéines de jonction favorise l'augmentation de la perméabilité intestinale, (2) la dégranulation des mastocytes induit l'activation de PAR-2, (3) l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la sensibilité intestinale est altérée, (4) PAR-2 favorise l'augmentation de la perméabilité intestinale et l'hypersensibilité viscérale. L'ensemble de ces perturbations conduit à l'augmentation de la sensibilité viscérale par l'Al. Enfin, les informations douloureuses sont transmises au thalamus et favorisent (5) l'augmentation de son métabolisme.

Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence qu'une dose d'Al ingérée quotidiennement par l'homme favorise l'augmentation de la sensibilité colorectale, chez le rat et la souris, en réponse à la DCR.

Chez le rat, l'intensité, la cinétique d'apparition de l'hypersensibilité viscérale ainsi que la persistance de l'effet, même après arrêt de l'intoxication, varient en fonction de la dose d'Al ingérée. De plus, ces phénomènes sont amplifiés lorsque le traitement est repris, indiquant qu'aucun phénomène de tolérance vis-à-vis de l'Al n'est apparu au cours du temps. En accord avec la prévalence du SII chez la femme, les rats femelles sont plus affectés par l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al que les mâles. De plus, les perturbations du seuil de douleur viscérale et de l'activité du thalamus en réponse à l'Al sont des résultats particulièrement cohérents avec les phénomènes douloureux observés chez les patients atteints de SII.

En conditions basales, l'Al n'induit pas de réponse inflammatoire colique forte caractérisée par le recrutement de cellules ou la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. En accord avec ces résultats, les études histologiques n'ont montré aucune lésion du tissu colique. Cependant, l'analyse des mastocytes sur les coupes histologiques est en faveur d'une inflammation à bas grade de la muqueuse colique caractéristique des observations réalisées chez les patients atteints de SII.

Les études dérivant de ces résultats ont permis de montrer que l'Al induisait l'activation des mastocytes coliques, favorisait le rejet de leur contenu dans le côlon et que l'hypersensibilité viscérale induite par l'Al chez le rat et la souris est dépendante de l'activation des mastocytes.

L'analyse des mécanismes pouvant être impliqués dans les effets de l'Al a permis de montrer que l'expression de plusieurs gènes, codant des récepteurs impliqués dans la nociception viscérale ainsi que les protéines de jonctions serrées de l'intestin, est altérée dans le côlon des animaux traités par l'Al. A partir de ces observations, nous avons montré que l'Al induisait une augmentation de la perméabilité colique et une hypersensibilité viscérale dépendante de PAR-2. Ainsi, la diminution du seuil de douleur viscérale causée par l'Al implique des mécanismes passant par la dégranulation des mastocytes, l'augmentation de la perméabilité viscérale et l'activation de PAR-2.

Enfin, l'implication de ces trois facteurs est fortement suspectée dans la physiopathologie du SII, indiquant ainsi que l'Al pourrait être un facteur environnemental majeur à étudier dans le développement de cette maladie.

Discussion générale

Ces travaux de thèse ont permis d'identifier l'Aluminium (Al) comme un facteur environnemental potentiellement impliqué dans la physiopathologie des maladies intestinales.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'Al a des effets cytotoxiques sur la cellule épithéliale intestinale. En effet, il entraîne une diminution de la viabilité cellulaire de façon dose et temps dépendants, il favorise l'apoptose cellulaire, il perturbe le cycle cellulaire et induit des perturbations dans l'expression des gènes impliqués dans des effets pro carcinogènes et pro inflammatoires. Nous avons également démontré que l'ingestion d'une dose d'Al cohérente avec la dose d'exposition humaine aggrave l'inflammation intestinale dans différents modèles de colite chimiques et spontanées. L'Al favorise également l'augmentation de la perméabilité intestinale et diminue la cicatrisation intestinale ainsi que la prolifération cellulaire (Pineton de Chambrun et al., 2014). Ces résultats permettent de corroborer et de compléter l'hypothèse de Lerner (Lerner, 2007) selon laquelle de nombreux aspects communs, et notamment aux niveaux épidémiologiques, immunologiques et inflammatoires, existent entre les propriétés de l'Al et la maladie de Crohn. Ainsi, l'Al aurait un effet adjuvant sur l'apparition des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets de l'Al sur l'hypersensibilité viscérale qui est l'un des principaux symptômes du syndrome de l'intestin irritable (SII). Cette étude nous a permis de mettre en évidence que l'ingestion d'Al, à des doses cohérentes avec l'exposition humaine, diminue le seuil de sensibilité à la douleur intestinale en réponse à une distension colorectale. L'étude des mécanismes impliqués dans ce phénomène a permis de mettre en évidence que les effets de l'Al sur la douleur intestinale étaient associés à l'augmentation de la perméabilité intestinale et à l'activation des mastocytes de façon dépendante de l'activation du récepteur PAR-2.

Mes travaux de thèse se sont intéressés aux effets de l'aluminium dans la physiopathologie des MICI et du SII. Bien que ces pathologies se caractérisent par des physiopathologies bien distinctes, elles possèdent certaines propriétés communes qui pourraient être induites ou aggravées par l'Al.

En effet, nous avons montré que l'ingestion d'Al aggravait la réponse inflammatoire mais ne l'induisait pas. Il semblerait donc que l'Al participe au maintien et à l'aggravation des

symptômes intestinaux observés dans les MICI. Toutefois, comme nous l'avons montré, l'ingestion d'Al participe à l'apparition d'une inflammation de bas grade, notamment par l'augmentation de la dégranulation des mastocytes. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction bibliographique, les mastocytes semblent jouer un rôle central dans la physiopathologie du SII et l'Al pourrait ainsi être impliqué dans le développement de cette pathologie. Cependant, il semble que les mastocytes puissent également jouer un rôle important dans les MICI. En effet, 35% et 38% des patients atteints de MC et de RCH présentent des symptômes communs avec le SII (Vivinus-Nébot et al., 2014). De plus, comme les patients atteints de SII (Giovanni Barbara et al., 2004), les malades atteints de MICI présentent une augmentation du nombre et de l'activation des mastocytes, notamment dans les segments inflammatoires (De Winter et al., 2012; Hamilton et al., 2014). Enfin, l'activation non contrôlée de ces mastocytes pourrait interférer avec l'homéostasie intestinale, générer des dysfonctionnements tissulaires et favoriser l'inflammation intestinale dans les MICI (Wouters et al., 2016). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'Al pourrait favoriser l'installation d'une inflammation de bas grade chez les patients atteints de MICI et participer à la physiopathologie de ces maladies.

Nous avons également montré que le traitement par un stabilisateur des mastocytes diminuait la douleur intestinale et l'activation des mastocytes induites par l'ingestion d'Al. Ces observations sont en accord avec les effets d'un traitement par stabilisateur des mastocytes chez les patients atteints de SII (Ebrahimi Daryani et al., 2009). Il semble que les traitements couramment utilisés pour les MICI tels que l'acide 5-aminosalicylique, les stéroïdes, le méthotrexate inhibe l'activation des mastocytes. De plus, le traitement par un stabilisateur des mastocytes tel que kétotifène ou un inhibiteur de la tryptase tel que l'APC 2059 a des effets bénéfiques sur les symptômes des MICI (De Winter et al., 2012). Ces observations sont en faveur de l'implication des mastocytes dans les interactions neuroimmunes menant aux perturbations de la sensibilité et de la motilité intestinale dans les MICI. Ainsi, en plus de favoriser l'installation d'une inflammation de bas grade, les effets de l'Al sur les mastocytes pourraient également être impliqués dans l'apparition des symptômes douloureux intestinaux et les perturbations de la motilité intestinale dans les MICI.

Nous avons montré que l'ingestion d'Al induisait la libération d'histamine et de protéases dans le côlon. La libération de ces médiateurs entraîne une hypersensibilité viscérale dépendante du récepteur PAR-2 chez les rongeurs traités par l'Al par rapport aux animaux contrôles. Les patients atteints de SII présentent une augmentation des taux de tryptase et d'histamine dans le côlon ainsi qu'une augmentation de l'expression de PAR-2 (Giovanni

Barbara et al., 2004; Liang et al., 2016). Il semble que les malades atteints de MICI présentent également une augmentation des taux de protéases et d'histamine intestinaux. De plus, les patients atteints de RCH présentent une augmentation de l'expression de PAR-2 dans le côlon (Hamilton et al., 2014; Yoshida et al., 2006). Enfin, dans notre étude, on observe une augmentation de la perméabilité intestinale induite par l'Al, dépendante de PAR-2 et associée à une diminution de l'expression de plusieurs gènes codant des protéines de jonction. Les malades atteints de SII et de MICI présentent également une altération de la perméabilité intestinale, associée à des perturbations des protéines de jonction, qui pourrait être associée à l'activation de ce récepteur (Bertiaux-Vandaële et al., 2011; Hamilton et al., 2014; Lee, 2015). Nos résultats permettent de penser que l'Al favoriserait l'augmentation des taux d'histamine et des protéases à l'origine de l'activation du récepteur PAR-2 pour induire le réarrangement des protéines de jonction serrées à l'origine de l'augmentation de la perméabilité intestinale. L'ingestion chronique d'Al pourrait par ces phénomènes être l'initiatrice de nombreux symptômes abdominaux du SII mais aussi des MICI. En effet, en induisant une augmentation de la perméabilité intestinale, les mastocytes pourraient faciliter l'infiltrat de bactéries, d'antigènes et d'allergènes au niveau de la muqueuse et initier l'inflammation dans les MICI (Hamilton et al., 2014).

Ces travaux de thèse montrent que l'Al perturbe l'homéostasie cellulaire et aggrave l'inflammation intestinale. Les effets de l'ingestion d'Al sur le tube digestif, en condition non inflammatoires, semblent montrer que l'Al favoriserait l'apparition d'une inflammation de bas grade à l'origine de perturbations de la sensibilité et de perméabilité intestinale. Bien que ces résultats soient en faveur d'une implication de l'Al dans le SII, il semble que les patients atteints de MICI développent une physiopathologie commune avec les patients atteints de SII et que l'Al pourrait également être impliqué dans ces effets.

Les études réalisées sur les modèles animaux de colite tels que le DSS et le TNBS montrent que les mastocytes participent à l'aggravation de l'inflammation intestinale (Hamilton et al., 2014). Il faudrait maintenant évaluer si l'exacerbation de l'inflammation intestinale observée dans nos modèles de colites spontanées et induites chimiquement est liée à l'activation des mastocytes par l'Al.

Nos résultats ont montré que l'ingestion d'Al favorisait l'aggravation de l'inflammation intestinale et l'apparition d'une hypersensibilité viscérale chez le rongeur. Nous avons également montré que l'Al a des effets cytotoxiques pour la cellule épithéliale intestinale humaine. Il faudrait maintenant évaluer et corroborer les résultats obtenus, chez le rongeur, chez les patients atteints de SII et de MICI. Les effets de l'Al pourraient ainsi être testés sur des

biopsies intestinales de segments sains ou inflammatoires de patients. Nous pourrions également évaluer les concentrations en tryptase, histamine ainsi que les médiateurs inflammatoires dans les surnageants de biopsies de patients traitées ou non par l'Al. Enfin, la concentration en Al dans la muqueuse intestinale des patients atteints de pathologies digestives pourrait également être comparée avec des sujets contrôles afin d'évaluer le rapport entre une exposition prolongée à l'Al et la gravité des symptômes.

Nous avons vu dans l'introduction bibliographique que l'Al est stocké dans l'organisme et particulièrement dans le tube digestif (Cunat et al., 2000; Powell et al., 1994). L'accumulation des faibles doses d'Al ingérées pourrait favoriser l'apparition des symptômes gastro-intestinaux. Dans le but de diminuer les taux d'Al chez l'homme, diminuer ses effets cytotoxiques et rétablir la sensibilité viscérale, nous pourrions développer des chélateurs de l'Al.

Enfin, les agences sanitaires mondiales réévaluent couramment les doses d'exposition des polluants environnementaux auxquelles les populations peuvent être exposées en fonction des avancées scientifiques. Les résultats que nous avons obtenus montrent que des doses d'Al ingérées cohérentes avec les données d'exposition environnementale induisent des effets délétères sur le tube digestif. Ainsi, ce travail de thèse devrait permettre d'établir de nouvelles recommandations et normes d'utilisation pour l'Al en agroalimentaire.

Conclusion générale

L'homme ingère quotidiennement de multiples doses d'Al, notamment par la nourriture et l'eau de boisson. Les effets nocifs de l'Al ont été étudiés en fonction des voies d'exposition et décrits dans différentes pathologies. Cependant, bien que l'ingestion soit le mode d'exposition majeur à l'Al, les données de ses effets sur le tube digestif restent peu nombreuses.

Nous avons choisi, par ce travail de thèse, de mieux comprendre les effets de l'Al sur l'intestin.

Tout d'abord, en se basant sur les données d'exposition de l'épithélium intestinal à l'Al et sur les résultats obtenus au sein du laboratoire sur les effets pro-inflammatoires de l'Al au niveau intestinal, nous avons évalué les effets cytotoxiques de l'Al sur la cellule épithéliale intestinale.

En outre, en se basant sur les analyses bibliographiques montrant que l'Al est associé à des douleurs locales ou chroniques variables en fonction de la voie d'exposition. Nous avons émis l'hypothèse que l'Al pourrait favoriser l'apparition d'une hypersensibilité viscérale et être impliqué dans la pathogénèse d'une maladie où l'environnement semble jouer un rôle prépondérant : le syndrome de l'intestin irritable.

En conclusion, ce travail de thèse a montré que l'Al exerce un effet complexe sur la cellule épithéliale intestinale, *in vitro*, en perturbant le cycle cellulaire, la prolifération et l'inflammation. Ceci laisse supposer que l'Al a un effet nocif pour l'épithélium intestinal. Lorsqu'il est ingéré, l'Al favorise l'apparition d'une hypersensibilité viscérale *in vivo* chez le rongeur, associée à une augmentation de la dégranulation des mastocytes, à une augmentation de la perméabilité intestinale et à l'activation du récepteur PAR-2.

Ces résultats nous apportent de nouvelles données concernant les effets et les mécanismes par lesquels d'Al perturbe l'homéostasie intestinale. De plus, les nombreux points communs entre les effets de l'Al sur la sensibilité viscérale et les observations cliniques sur la pathogénèse du SII laissent supposer que l'Al pourrait être un nouveau facteur de risque environnemental impliqué dans le développement de cette maladie. Si les études ultérieures confirment ces observations, ces résultats pourraient ouvrir la voie à de nouvelles recommandations thérapeutiques, notamment pour les patients atteints par le SII.

Annexes

Annexe 1. Fiche récapitulative des différents critères diagnostiques du syndrome de l'intestin irritable

Les critères de Manning (au moins 2 ou 3 critères nécessaires pour l'établissement du SII)

Douleurs soulagées par la défécation
Selles plus molles lors de douleurs
Selles plus fréquentes lors de douleurs
Ballonnement abdominal visible
Mucus sur les selles
Sensation d'évacuation incomplète

Les critères de Rome I

Avoir les symptômes suivants de manière récurrente ou continue pendant au moins 3 mois:

1. Gênes ou douleurs abdominales associées à
 - un soulagement par la défécation; et/ou
 - un changement dans la fréquence des selles; et/ou
 - un changement dans la consistance des selles

et

2. Au moins 2 des critères suivants dans un quart des situations ou plus par jour:
 - fréquence des selles anormale
 - forme des selles anormale
 - passage des selles anormal (urgence ou effort, sensation d'évacuation incomplète)
 - mucus dans les selles
 - ballonnement ou sensation de distension abdominale

Les critères de Rome II

La gêne ou les douleurs abdominales doivent être ressenties pendant au moins 12 semaines, pas obligatoirement consécutives, durant les 12 derniers mois. Ces symptômes doivent être associés à au moins 2 des signes suivants:

- soulagement par la défécation; et/ou
- début associé à une modification de la fréquence des selles; et/ou
- début associé à une modification de la forme des selles

Les critères de Rome III

Douleurs ou gênes abdominales au moins 3 jours par mois au cours des 3 derniers mois et ayant débuté au moins 6 mois avant le diagnostique. Ces symptômes doivent être associés à 2 des signes suivants :

- amélioration par la défécation
- début associé à une modification de la fréquence des selles
- début associé à une modification de la forme des selles

OPEN

Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice

G Pineton de Chambrun^{1,2,3,4,12}, M Body-Malapel^{1,2,3,12}, I Frey-Wagner⁵, M Djouina^{1,2,3}, F Deknuydt^{6,7,8}, K Atrott⁵, N Esquerre^{1,2,3}, F Altare^{6,7,8}, C Neut^{1,2,3,9}, MC Arrieta¹⁰, T-D Kanneganti¹¹, G Rogler⁵, J-F Colombel^{1,2,3,4}, A Cortot^{1,2,3,4}, P Desreumaux^{1,2,3,4} and C Vignal^{1,2,3}

The increasing incidence of inflammatory bowel diseases (IBDs) in developing countries has highlighted the critical role of environmental pollutants as causative factors in their pathophysiology. Despite its ubiquity and immune toxicity, the impact of aluminum in the gut is not known. This study aimed to evaluate the effects of environmentally relevant intoxication with aluminum in murine models of colitis and to explore the underlying mechanisms. Oral administration of aluminum worsened intestinal inflammation in mice with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid- and dextran sodium sulfate-induced colitis and chronic colitis in interleukin 10-negative (IL10^{-/-}) mice. Aluminum increased the intensity and duration of macroscopic and histologic inflammation, colonic myeloperoxidase activity, inflammatory cytokines expression, and decreased the epithelial cell renewal compared with control animals. Under basal conditions, aluminum impaired intestinal barrier function. *In vitro*, aluminum induced granuloma formation and synergized with lipopolysaccharide to stimulate inflammatory cytokines expression by epithelial cells. Deleterious effects of aluminum on intestinal inflammation and mucosal repair strongly suggest that aluminum might be an environmental IBD risk factor.

INTRODUCTION

Inflammatory bowel diseases (IBDs), which include Crohn's disease and ulcerative colitis, are chronic diseases characterized by an excessive uncontrolled intestinal inflammation resulting from an abnormal immune response to commensal microbiota in a susceptible host.¹ In the past 10 years, genetic research in IBD has been particularly fruitful. However, among the many susceptibility genes identified (>100 to date) none were demonstrated to be necessary or sufficient for disease onset.^{2,3} The spatial heterogeneity of Crohn's disease and ulcerative colitis, their increasing incidence and prevalence with time and in different regions around the world, the low concordance rate in monozygotic twins and the increased risk among migrants from low-incidence to high-incidence areas are strong arguments implying an important role for environmental factors in the pathogenesis of IBD.^{4,5} However, besides smoking and appendectomy and, more recently, exposure to antibiotics in

childhood, no strong environmental factors have been identified to date.^{6–9}

The increase of IBD in developing countries has focused attention on the potential role of industrialization and environmental pollutants as causative environmental factors in their pathophysiology.^{10,11} Twentieth century industrialization has led to an increased accumulation of heavy metals, and in particular aluminum, in our surrounding ecosystems. Aluminum is ubiquitous and is the most abundant metal element in our environment.^{12,13} In the past 50 years, worldwide production of aluminum has regularly increased, from <5 million tons in 1960 to >25 million tons in 2002, and developed countries have raised their current domestic consumption by 350%.^{14,15} A main route of exposure to aluminum for the general population is through food and water. The decline in the use of unprocessed foods and the increased consumption of cakes, pastries, and sugar-rich foods characterizing 'food

¹Univ Lille Nord de France, Lille, France. ²Inserm U995, Lille, France. ³UDSL, Lille, France. ⁴Hepato-Gastroenterology Department, CHU Lille, Lille, France. ⁵Division of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland. ⁶INSERM, UMR892, Nantes, France. ⁷CNRS, UMR6299, Nantes, France. ⁸Université de Nantes, Nantes, France. ⁹Clinical Bacteriology, College of Pharmacy, Lille, France. ¹⁰Finlay Lab, Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada and ¹¹Department of Immunology, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA. Correspondence: C Vignal (cecile_vignal@hotmail.com)

¹²Shared first authorship.

Received 9 January 2013; revised 12 August 2013; accepted 14 August 2013; published online 16 October 2013. doi:10.1038/mi.2013.78

ARTICLES

westernization⁷ has resulted in an increased ingestion of aluminum, which exceeds the tolerable weekly intake of 7 mg kg^{-1} per week in a significant proportion of the European and North American populations.¹⁶ For many years, exposure to aluminum was suggested to favor an abnormal immune response in different diseases, including autoimmune conditions.¹⁷ However, despite this known toxicity and a potential gut interaction, aluminum and its effect on intestinal homeostasis and inflammation have not been investigated so far, particularly in the physiopathology of IBD.

The aim of our study was to explore the pro-inflammatory role of aluminum in different models of chemically induced and chronic colitis in mice. Particular attention was paid to the interaction between aluminum and epithelial cells and its role in the immune response against bacteria.

RESULTS

Aluminum worsens colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid and dextran sodium sulfate in mice

In a first set of experiments, C57BL/6 mice were fed for 4 weeks with aluminum citrate (AluCi) or aluminum phosphate (AluP) at a concentration of $1.5 \text{ mg Al element kg}^{-1}$ per day. These

four weeks' oral administration of aluminum did not induce any macroscopic, histological, or molecular colonic inflammation (**Supplementary Figure 1** online). In another set of experiments, C57BL/6 mice were treated with AluCi or AluP for 4 weeks before rectal administration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS; **Figure 1a**). Four days after colitis induction, the severity of intestinal inflammation was assessed by macroscopic, histological, and molecular parameters. Macroscopic Wallace score of colonic inflammation was significantly increased in both forms of aluminum-treated mice compared with phosphate buffer saline (PBS)-treated mice (**Figure 1b**). Aluminum-treated mice presented more severe and extended macroscopic inflammation of the colon with large areas of ulceration (data not shown). Consistently, at the microscopic level, the histological Ameho score of colonic inflammation was more severe in both forms of aluminum-treated mice compared with PBS-treated mice, leading to more extensive ulceration and necrosis involving 80% of the whole colon (**Figure 1c,d**). Myeloperoxidase (MPO) activity reflecting neutrophil infiltration was also significantly higher in aluminum-treated mice compared with PBS-treated mice (**Figure 1e**).

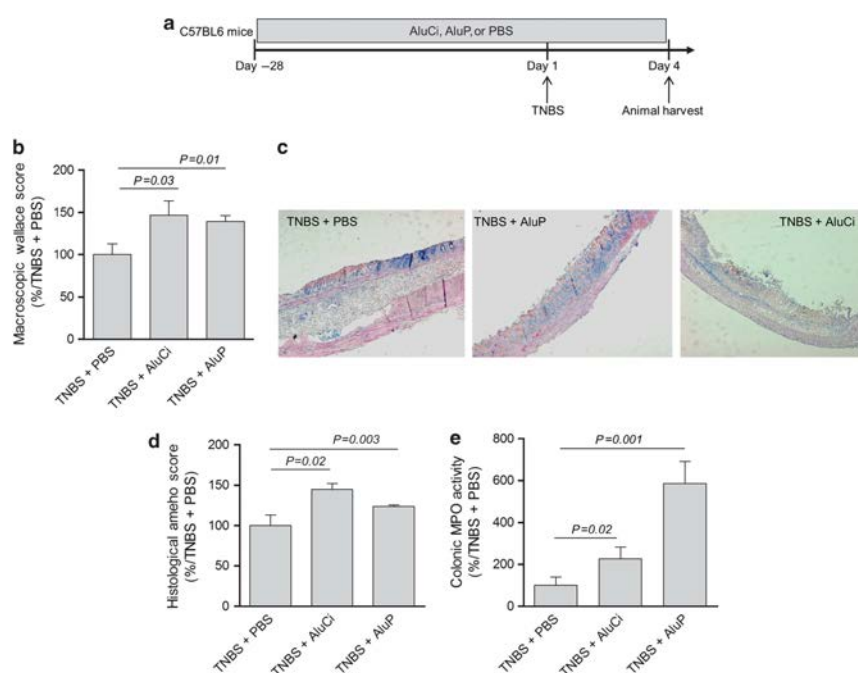


Figure 1 Aluminum worsens 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. (a) C57BL/6 mice ($n = 14$ per group) were fed with aluminum citrate (AluCi) or aluminum phosphate (AluP) ($1.5 \text{ mg of Al element kg}^{-1}$ per day) or with phosphate buffer saline (PBS) for 31 days. At day 28, colitis was induced by intrarectal administration of TNBS. Four days after colitis induction, mice were euthanized and colitis parameters were assessed. (b) The macroscopic Wallace score was determined as described in Methods. (c, d) Histopathological changes in colon tissues were examined by May-Grünwald and Giemsa (MGG) staining and scoring was performed as described in Methods. (e) Myeloperoxidase (MPO) activity was measured in colonic lesions. Results are expressed as the percentage of variation compared with TNBS-treated mice.

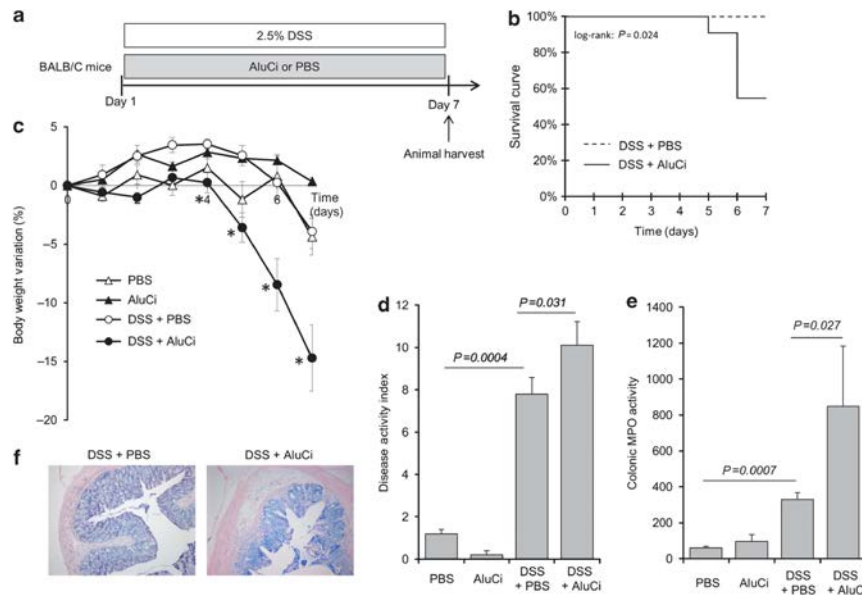


Figure 2 Aluminum citrate (AluCi) worsens dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. (a) BALB/C mice ($n = 10$ per group) were treated with 2.5% DSS and AluCi ($1.5 \text{ mg of Al element kg}^{-1}$ per day) or phosphate buffer saline (PBS) for 7 days. Control mice treated with AluCi or PBS without DSS were followed for the same period ($n = 5$ per group). (b) Survival of mice was monitored until day 7 after the start of DSS. (c) Body weight was scored daily. * means $P < 0.05$ between DSS $\pm$ PBS and DSS $\pm$ AluCi. (d) A disease activity index that included body weight variation, the presence of blood in stools, and stool consistency was calculated at day 7. (e) Myeloperoxidase (MPO) activity was measured on colons harvested at day 7. (f) Histopathological changes of colonic tissues were examined by May-Grünwald and Giemsa (MGG) staining.

To complete our understanding of the detrimental effect of aluminum observed in TNBS-induced colitis, BALB/C mice were concomitantly treated by aluminum gavage and oral administration of dextran sodium sulfate (DSS) 2.5% in drinking water for 7 days (Figures 2a and 3a). A 2-fold increased mortality was observed in AluCi-treated mice with DSS-induced colitis compared with control animals (Figure 2b). Moreover, mice treated with DSS and AluCi or AluP had more than a 3- and 2-fold body weight loss, respectively, compared with DSS and PBS-treated mice (Figures 2c and 3b). The body weight loss occurred at the lowest aluminum concentration of 0.15 mg kg^{-1} per day and was more pronounced with higher doses such as 1.5 and 15 mg kg^{-1} per day (Figure 3b). The disease activity index (DAI), combining weight loss, stool consistency, and the presence of rectal bleeding, was also increased in both forms of aluminum-treated mice compared with PBS-treated mice with colitis (Figures 2d and 3c). Consistently, colonic MPO activity was increased in aluminum-treated mice compared with control animals, with colitis together with a more intense inflammatory infiltrate mainly located in the mucosal and submucosal layers (Figure 2e,f). To demonstrate that our results were specific to aluminum, mice were fed with another metal, namely zinc phosphate (ZnP) together with colitis induction (Figure 3a). Mice treated with ZnP experienced the same body weight loss as DSS- and

PBS-treated mice and no difference in DAI was observed (Figure 3b,c). As a whole, these results demonstrated that two different forms of aluminum worsened lesions severity in two distinct models of colitis in mice.

Aluminum worsens chronic colitis in interleukin 10-negative mice

We then investigated the effects of aluminum in a chronic colitis model. Interleukin 10-negative ($\text{IL10}^{-/-}$) mice received AluCi in their drinking water for 7 weeks with a daily dose of $1.5 \text{ mg Al element per kg body weight}$ (Figure 4a). Macroscopic mucosal damage was assessed by mini-endoscopy score (Figure 4b,c). Mucosa from $\text{IL10}^{-/-}$ mice receiving water showed overt signs of inflammation. $\text{IL10}^{-/-}$ mice treated with AluCi had a mucosa less transparent, a vascular pattern more altered, more fibrin and a significant increase in mucosa granularity compared with $\text{IL10}^{-/-}$ mice receiving water. The histological score for $\text{IL10}^{-/-}$ mice treated with AluCi was significantly increased compared with the water-treated $\text{IL10}^{-/-}$ mice (Figure 4d,e). MPO activity was significantly more elevated in AluCi-treated $\text{IL10}^{-/-}$ mice than in control $\text{IL10}^{-/-}$ mice (Figure 4f). Taken together, these data argued in favor of a worsening effect of oral aluminum on the development of chronic colitis in $\text{IL10}^{-/-}$ mice.

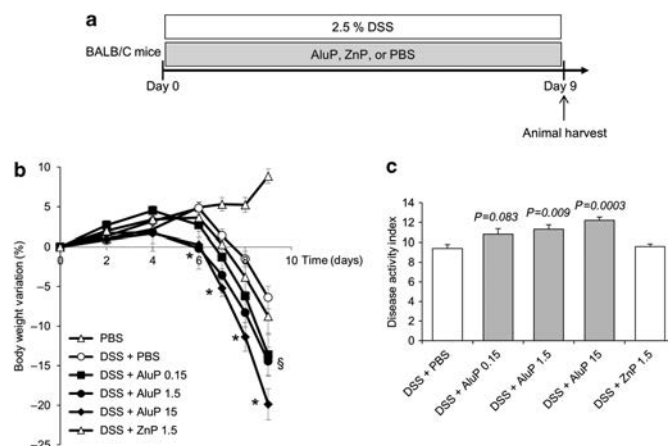


Figure 3 Aluminum phosphate (AluP) but not zinc phosphate (ZnP) worsens dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. (a) BALB/C mice ($n = 10$ per group) were treated with 2.5% DSS and with increasing doses of AluP (0.15, 1.5, and 15 mg of Al element kg^{-1} per day) or ZnP (1.5 mg of Zn element kg^{-1} per day) or phosphate buffer saline (PBS) for 9 days. (b) Body weight was scored daily. * means $P < 0.05$ between DSS $\pm$ PBS and DSS $\pm$ AluP 1.5 and 15, § means $P < 0.05$ between DSS $\pm$ PBS and DSS $\pm$ AluP 0.15. (c) A disease activity index that included body weight variation, the presence of blood in stools, and stool consistency was calculated at day 9.

Aluminum increases the inflammatory cytokine expression in different models of colitis

AluCi significantly increased the expression of *Il1 β* and *Il17a* mRNA in the colon of animals 4 days after TNBS administration (Figure 5a). The modification of this colonic cytokine profile induced by aluminum gavage and TNBS administration was associated with an increased expression of *Nlrp3* mRNA (Figure 5a), a known intracellular innate immune marker of inflammasome response regulated by aluminum.¹⁸ Similar data were obtained in animals with DSS-induced colitis, where AluCi administration also significantly upregulated the colonic expression of inflammatory cytokines and *Nlrp3* mRNA compared with untreated mice with colitis (Figure 5b). Similar results were observed with AluP (data not shown).

In the chronic model of colitis, mucosal levels of *Il1 β* , *Il17 α* , and *Nlrp3* tended to be higher in the *IL10*^{-/-} mice intoxicated with AluCi compared with *IL10*^{-/-} mice receiving water (Figure 5c).

Enhanced inflammatory cytokine expression in aluminum-treated epithelial cells and potentiation by bacterial components

To investigate the potential inflammatory effect of luminal aluminum on the first intestinal layer in contact with luminal antigens and particles, we incubated HT-29 and Caco-2 epithelial cells for 3 h with increased concentrations of aluminum from 10 to 100 μg of Al element/ ml^{-1} . A dose-response effect of aluminum was observed in Caco-2 cells, leading to an increased expression of the inflammatory cytokines *IL8* and *IL1 β* mRNA (Figure 6a). Similar data were obtained with HT-29 epithelial cells (data not shown). Co-incubation of Caco-2 cells with a low concentration of

bacterial lipopolysaccharide (LPS, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and increased concentrations of aluminum led to a synergistic and dose-dependent pro-inflammatory effect with an increased expression of *IL8* and *IL1 β* mRNA (Figure 6b). Similar data were obtained in HT-29 cells (data not shown).

Aluminum extends colitis duration and decreases the mucosal healing

Besides its effects on colitis severity, we investigated the influence of oral administration of AluCi at 1.5 mg Al element kg^{-1} on colitis duration in C57BL/6 mice submitted to one cycle of 2% DSS for 7 days (Figure 7a). Colonic lesions were evaluated during the 19-days experiment to investigate the persistence of lesions during the recovery period. At the end of DSS administration, mice treated with aluminum continued to lose weight and presented a slow recovery compared to mice with colitis receiving the vehicle (Figure 7b). In contrast, body weight changes were paralleled after day 7 in control mice with or without DSS-induced colitis receiving the vehicle and control animals treated with aluminum (Figure 7b). At day 19, animals with DSS-induced colitis receiving aluminum presented persistent intestinal inflammation, as demonstrated by an increase in DAI, colonic MPO activity and histological lesions (Figure 7c–e). To confirm the deleterious effect of aluminum on colitis healing, we designed a subsequent experiment where aluminum was started just after DSS-induced colitis (Figure 8a). In contrast to control animals, which completely recovered their initial body weight 10 days after DSS-induced colitis, administration of AluCi significantly delayed weight gain and led to a sustained increase in colonic weight/size ratio compared with control animals (Figure 8b,c).

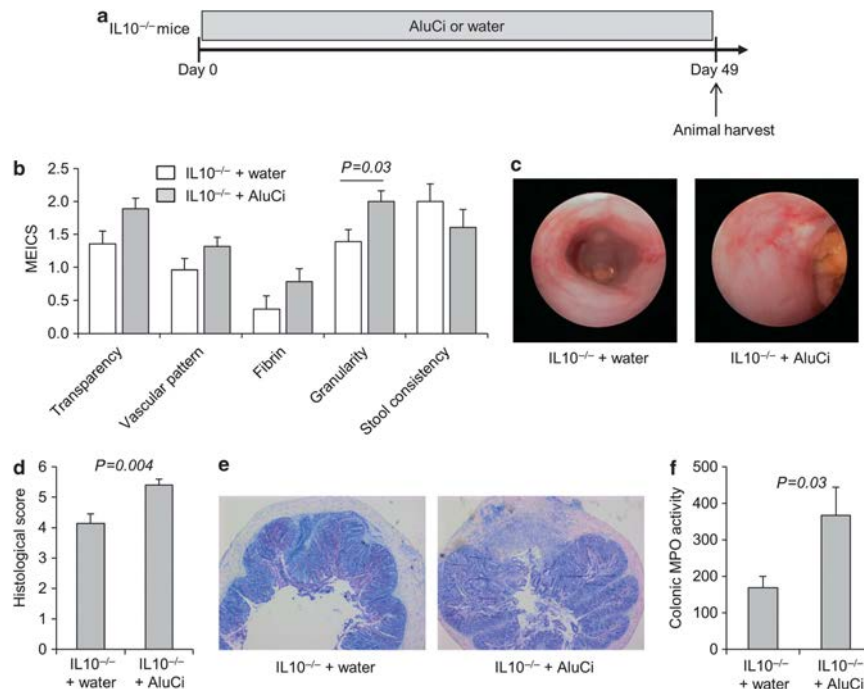


Figure 4 Aluminum citrate (AluCi) aggravates chronic colitis in interleukin 10-negative (IL10^{-/-}) mice. (a) Eight-week-old IL10^{-/-} mice were treated with AluCi (1.5 mg of Al element kg⁻¹ per day) in their drinking water ($n = 15$) or with water only ($n = 14$) for 49 days. (b) The five parameters of the murine endoscopic index of colitis severity (MEICS) were determined. (c) Mini-endoscopic images were done as described in Methods. (d, e) Histopathological changes in colon tissues were examined by May-Grünwald and Giemsa (MGG) staining and scoring was performed as described in Methods. (f) Myeloperoxidase (MPO) activity was measured in colonic lesions.

To better evaluate the effects of aluminum on colonic wound healing, we quantified *ex vivo* epithelial cell proliferation and apoptosis in the colon of C57BL/6 mice receiving or not receiving aluminum 10 days after DSS-induced colitis (Figure 9a). AluCi administration was associated with an inhibition of epithelial cell proliferation, as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, compared with control animals (Figure 9a,b). The mean fluorescence of terminal transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)-stained colon sections was similar in animals with colitis receiving or not receiving aluminum (Figure 9c,d).

To confirm the direct influence of aluminum on epithelial cell proliferation, we performed an explanatory experiment in HT-29 cells. We showed that aluminum inhibited epithelial cell proliferation by >40% without modification of cell death assessed by lactate dehydrogenase release (Figure 9e,f).

Aluminum alters the intestinal barrier and induces granuloma formation

We next assessed the intestinal effects of aluminum given once a day (1.5 mg kg⁻¹) for 4 weeks on epithelial barrier integrity. The rate of bacterial translocation, reflecting the intestinal

barrier, was very low in the mesenteric lymph nodes (MLN) of control C57BL/6 mice receiving PBS (Figure 10a). In contrast, more than a 100-fold increased colonization of MLN was observed in animals receiving AluP (Figure 10a). Tight junctions of epithelial cells involving occludins, claudins, and zonula occludens are critical to maintain intestinal barrier function. A significant decrease in occludin (*Ocln*) mRNA expression was observed in the colon of mice treated with aluminum compared with PBS-treated control animals (Figure 10b). We then evaluated the effect of aluminum on colonic flora bulk and composition. Both remained similar in the colon of mice receiving aluminum or PBS (Figure 10c). Altogether, these data suggest that aluminum enhanced intestinal permeability leading to an increased load of bacteria through the intestinal wall without a concomitant increase in bacterial pressure in the colon.

The number and size of granulomas developed *in vitro* was evaluated after a 4-day incubation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors with increasing concentrations of AluP alone and/or together with *Mycobacterium bovis* strain BCG (BCG), adherent/invasive *Escherichia coli* strain LF82 (AIEC) and a non-pathogenic

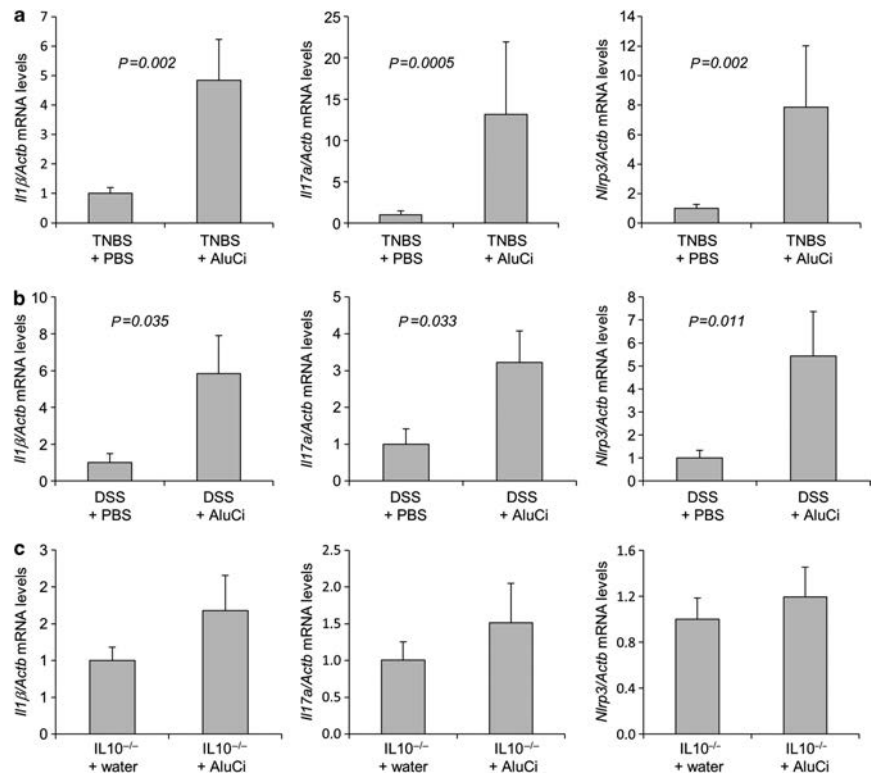


Figure 5 Aluminum citrate (AluCi) increases the expression of pro-inflammatory cytokines in colitis. *Il1β*, *Il17a*, and *Nlrp3* mRNA levels from homogenized colons of (a) mice treated with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) and phosphate buffer saline (PBS) or treated with TNBS and AluCi, (b) mice treated with dextran sodium sulfate (DSS) and PBS or treated with DSS and AluCi, and (c) interleukin 10-negative (IL10^{-/-}) mice treated or not with AluCi.

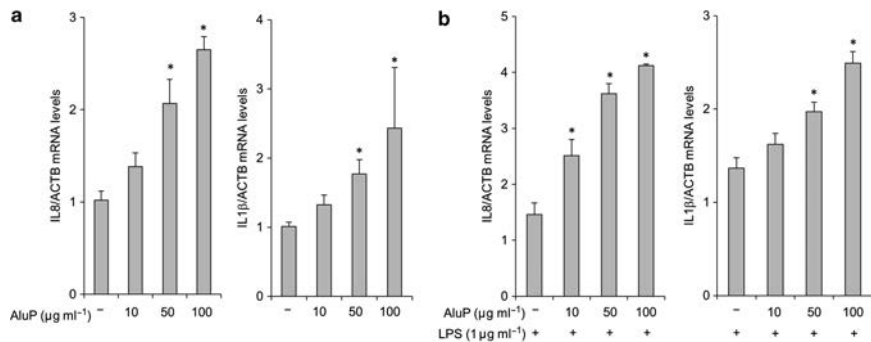


Figure 6 Aluminum phosphate (AluP) stimulates the expression of interleukin 8 (IL8) and IL1β by intestinal epithelial cells and enhances their response to bacterial stimuli. (a) Caco-2 cells were incubated with increasing doses of AluP (from 10 to 100 μg of Al element ml⁻¹). qPCR assay on Caco-2 cell lysates showed a dose-dependent increase in IL8 and IL1β expression in the presence of aluminum. (b) Caco-2 cells were co-stimulated with increasing doses of AluP (from 10 to 100 μg ml⁻¹) and lipopolysaccharide (LPS). qPCR assay on Caco-2 cell lysates showed a dose-dependent increase in IL8 and IL1β expression in the presence of aluminum compared with LPS stimulation alone. *P<0.05 vs. controls.

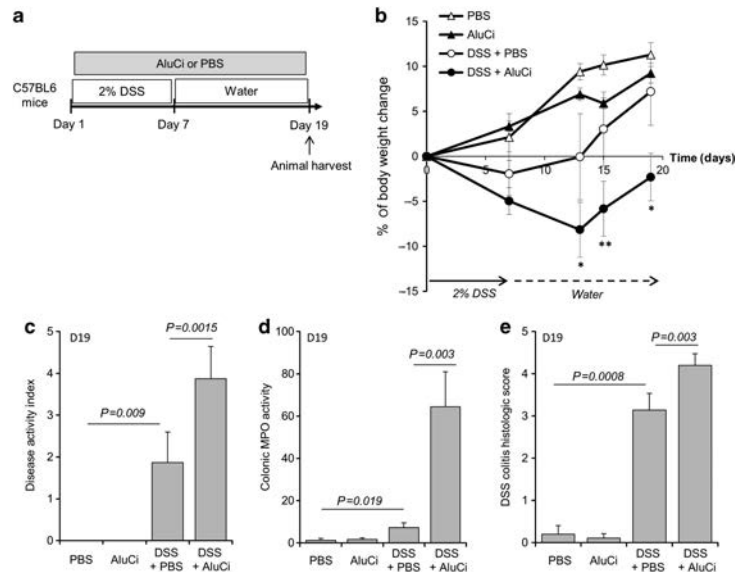


Figure 7 Aluminum citrate (AluCi) extends the duration of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. **(a)** C57BL/6 mice ($n=10-15$ per group) were treated with 2% DSS for 7 days, followed by regular drinking water for 12 days. In parallel, mice were treated with AluCi (1.5 mg of Al element kg^{-1} per day) or phosphate buffer saline (PBS) once a day until the end of the experiment. **(b)** Body weight was scored at baseline, D7, D13, D15, and D19. * means $P<0.05$; ** means $P<0.01$ between DSS + PBS and DSS + AluCi. **(c)** A disease activity index that included body weight variation, the presence of blood in stools, and stool consistency was calculated at day 19. **(d)** Myeloperoxidase (MPO) was measured in colonic samples harvested on day 19. **(e)** Histopathological changes in the colon tissues were examined by May-Grünwald and Giemsa (MGG) staining and scoring of histopathology, as described in Methods.

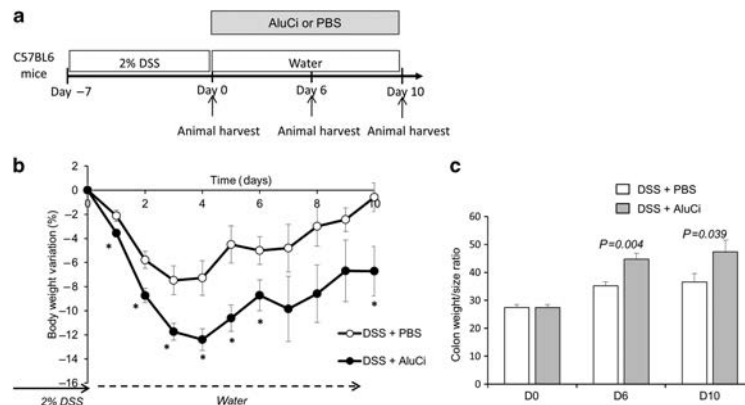


Figure 8 Aluminum citrate (AluCi) decreases the mucosal repair. **(a)** C57BL/6 mice were treated with 2% dextran sodium sulfate (DSS) for 7 days, followed by regular drinking water for 10 days. AluCi (1.5 mg of Al element kg^{-1} per day) and phosphate buffer saline (PBS) treatment were started only after DSS discontinuation on day 7. **(b)** Body weight was scored daily. * means $P<0.05$. **(c)** Colon length and weight were measured from mice euthanized on day 0, day 6, and day 10 after the start of aluminum treatment and the colon weight/size ratio was calculated.

Escherichia coli K-12 strain DH5 α .^{19,20} As expected, no granulomas were observed in control wells without aluminum and bacteria. The granuloma count increased proportionally until

700 granuloma counts per well with the increased dose of aluminum, with a positive effect beginning at a very low concentration of aluminum (5 ng Al element ml^{-1})

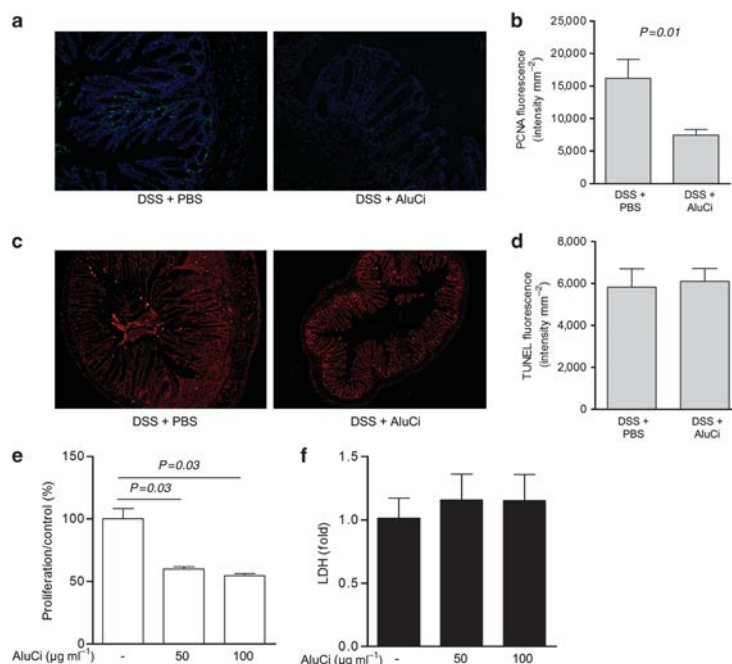


Figure 9 Aluminum citrate (AluCi) inhibits epithelial cell proliferation *in vivo* and *in vitro*. C57BL6 mice were fed with AluCi or phosphate buffer saline (PBS) for 10 days after dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. (**a, b**) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining of colon sections (**a**) and its quantification (**b**) showed a decrease in epithelial cell proliferation in mice having received aluminum as compared with mice administered phosphate buffer saline (PBS). (**c, d**) Terminal transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) immunostaining of the same colons (**c**) and its quantification (**d**) shows no significant difference in epithelial cell apoptosis. Caco-2 cells were incubated with increasing doses of AluCi (50 and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for 5 days. (**e**) MTT assay showed a decrease in epithelial cell proliferation. (**f**) Lactate dehydrogenase (LDH) activity assay in the supernatants did not reveal any significant variation.

(**Figure 10d,e**). Same experiments were performed with Zn and no granuloma formation was observed, showing a specific effect of aluminum (data not shown). We then evaluated the effect of a suboptimal concentration of aluminum (5 ng ml^{-1}) on bacteria-induced granulomas. As previously described, non-pathogenic *E. coli*, AIEC, and mycobacteria induced granulomas formation, with a mean number per well of 101.5 ± 24.5 , 224.5 ± 72.3 , and 278.8 ± 47.3 , respectively.²⁰ Aluminum at the dosage of 5 ng ml^{-1} potentiated the effect of bacterial infection on granulomas formation, resulting in an increased number and a bigger size of granulomas (**Figure 10f**).

Altogether, these data suggest that aluminum administration leads to a leaky gut, enhancing intestinal bacterial translocation and favoring development of granulomas.

DISCUSSION

Our study provides strong evidence that aluminum modulates intestinal inflammation *in vivo* in mice. A daily intake of aluminum at a concentration observed in the environment increased the severity as well as the duration of intestinal

inflammation with impaired mucosal repair in different models of colitis in mice. Aluminum mediated intestinal inflammation through several mechanisms, including inflammatory response against bacteria, epithelial cell renewal and occludin expression, which affected the intestinal barrier and favored granulomas formation.

In humans, the principal route of entry of aluminum is the ingestion of food or water containing aluminum.^{12,13} Oral bioavailability of aluminum is estimated to be $<1\%$.²¹ Aluminum accumulates in the skeletal system and the brain, and a link with diseases such as osteomalacia and encephalopathy, Alzheimer and Parkinson's diseases have been reported.^{16,22,23} The low percentage of oral bioavailability of aluminum is actually misleading. In fact, after oral administration, 40% of the ingested dose accumulates within the intestinal mucosa, which makes the gut the main storage organ for aluminum in the body.^{24,25} Intestinal accumulation of aluminum may be particularly relevant to Crohn's disease since it has been identified within macrophages of Peyer's patches but also around dilated submucosal lymphatics and in MLN.^{26–28}

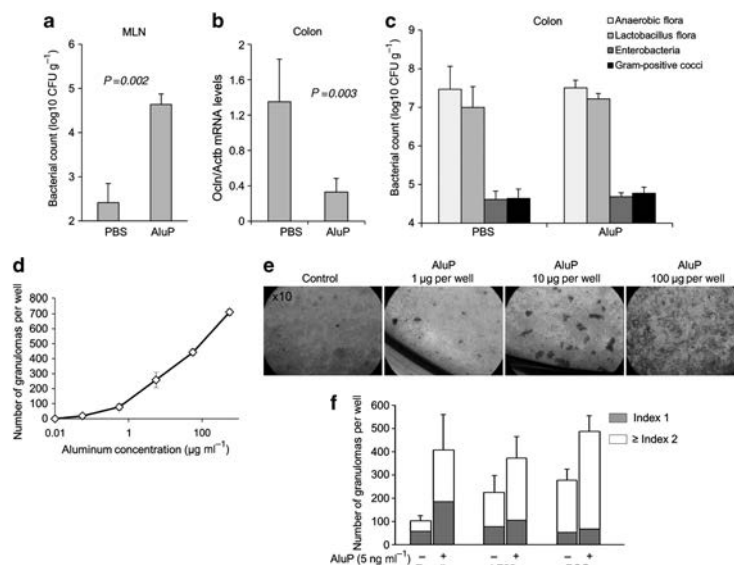


Figure 10 Aluminum alters intestinal barrier integrity and induces granuloma formation. C57BL6 mice were fed with aluminum phosphate (AluP) (1.5 mg of Al element kg⁻¹ per day, $n=9$) or phosphate buffer saline (PBS) ($n=4$) for 4 weeks. Bacterial counts in mesenteric lymph nodes (MLN) and colon were determined after 4 weeks. (a) Bacterial counts in MLN were significantly higher in aluminum-treated mice than in PBS-treated mice. (b) RT-qPCR assay of homogenized colons showed a decrease in *Ocn* mRNA in mice treated with aluminum as compared with PBS-treated mice. (c) Bacterial count of specific strains in the colonic mucosa showed no difference between aluminum-treated and PBS-treated mice. (d) Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were incubated for 4 days with increasing doses of AluP (from 1 to 100 μg of Al element per well; 1.5 ml medium per well). Quantitative analysis of the number of granulomas showed a dose-dependent enhancement of granuloma number in response to aluminum. (e) Representative light microscopy pictures ($\times 10$) of the culture wells after 4 days of reaction revealed large multicellular structures (granulomas) in the presence of aluminum. (f) Human PBMCs were incubated for 5 days with non-pathogenic *E. coli* K-12 strain DH5 α , AIEC strain LF82 or BCG, alone or in the presence of a low dose of aluminum (5 ng of Al element ml⁻¹). The number of granulomas according to their size (Index 1, small size, Index 2, big size) was counted. CFU, colony forming unit.

In spite of this, the potential toxic role of aluminum in the gut has been poorly studied. Interestingly, a fatal outbreak of granulomatous enteritis with many histological similarities with Crohn's disease was reported in a group of horses sharing a common environment. In the evaluation of the cluster, an unexpected finding was the presence of aluminum excess in affected tissues.²⁹ Our results are in agreement with a study reported only in the abstract form, in which oral aluminum increased histological scores in IL10 knockout mice.³⁰ Moreover, using two different experimental models of chemically induced colitis developed in mice with different genetic backgrounds, we here demonstrated that small amounts of two different forms of aluminum enhanced the intensity and duration of intestinal inflammation, leading to an increased mortality, increased body weight loss, more intense macroscopic and histological lesions, and enhancement of colonic MPO activities.

Importantly, the dose (1.5 mg kg⁻¹) and the route of aluminum administration used in this study are relevant to human exposure. Indeed, it was estimated by a US food additives survey that most Americans ingest from 0.01 to

1.4 mg total aluminum per kg body weight per day. In the same study, it was estimated that ~5% of Americans ingested >95 mg aluminum per day (>1.36 mg per kg body weight) as additives in commercially processed foods and beverages.¹⁶ In Europe, it was also estimated that the tolerable intake of aluminum is exceeded in a significant proportion of the population, especially in children, who are more vulnerable to toxic effects of pollutants than adults.^{31,32} Moreover, these estimations did not take into account aluminum ingestion through pharmaceuticals, which is estimated to account for 99% of the aluminum ingested by individuals consuming aluminum-containing medications.³³ Aluminum can be found naturally in different forms, we thus choose to study an organic soluble form (citrate) and a particular form (phosphate). Our results demonstrated that both forms of aluminum worsened colitis and delayed mucosal healing, excluding a form-based effect.

The precise mechanisms involved in the detrimental effects of aluminum on intestinal inflammation are unknown. Aluminum has potential direct cytotoxic effects at high concentrations but most of its biological mechanisms of action

have been described when looking at its adjuvant effect in vaccines.³⁴ In the latter case, aluminum-induced inflammation involves the Nlrp3 inflammasome but also Nlrp3-independent effects mediated through macrophages, B and T cells, resulting in an enhanced antigen-specific T-cell response and an increased production of inflammatory cytokines.³⁵ In the present study, no direct intestinal cytotoxic effect of aluminum was detected in control animals fed for 1 month with small amounts of aluminum, nor when epithelial cells were cultured with high concentrations of aluminum reaching 0.1 mg ml^{-1} . Consistent with previous studies analyzing in the skin or the lung the immunobiology of intradermal or inhaled aluminum, oral exposure to aluminum activated Nlrp3 and potentiated the expression of several inflammatory cytokines.^{36,37} Furthermore, evidence supporting a key role of epithelial cells in aluminum-sustained intestinal inflammation was obtained both *in vitro* and *in vivo* and was in line with a previous study showing that aluminum decreased the transepithelial electrical resistance of Caco-2 cells.³⁴ Using two different HT-29 and Caco-2 epithelial cell lines, aluminum, in a dose-dependent manner and synergistically with bacterial LPS, enhanced the production of inflammatory cytokines and decreased by > 40% their ability to proliferate. The relevance of our *in vitro* data was further highlighted by the demonstration that animals treated with aluminum presented an impaired epithelial wound healing, with sustained inflammation and an increased bacterial translocation to MLNs. Another mechanism of action of aluminum may be through its direct interaction with bacterial flora. In our experiments, aluminum did not modify the bacterial composition of the colonic flora of mice. It has been hypothesized that aluminum, through metal chelating systems, could gain access to microorganisms and then alter their pathogenicity and ability to induce an exuberant granulomatous response.³⁸ We here demonstrated that aluminum was indeed capable of stimulating granulomas formation, either alone or when associated with bacteria.

Translation of experimental evidence to human diseases remains hazardous. Aluminum exposure has already been implicated in a variety of chronic undetermined inflammatory diseases, such as multiple sclerosis, myofasciitis, pulmonary granulomatosis, and rheumatoid arthritis.^{39–42} Since most people living in industrialized and emerging countries are routinely and inevitably exposed to aluminum, future descriptive, genetic, and epidemiological studies will be necessary to clarify the mechanisms leading to aluminum susceptibility in patients. An emerging concept suggests that dysfunction of xenobiotic processing enzymes expression or activity in the intestinal mucosa may be an important event in the initiation and progression of IBD.^{43,44} Indeed, several studies have identified an association between single-nucleotide polymorphism in genes involved in xenobiotics detoxification and susceptibility to IBD.^{45,46} New research activities should now develop standard protocols for measuring aluminum in intestinal tissues of patients with IBD and controls, and analyze these data according to the genetic profile of their detoxification enzymes.

METHODS

Animals. Five- to eight-week-old C57BL/6 and BALB/C male mice were purchased from Janvier Laboratory (Le Genest-St-Isle, France). Animals were maintained under specific pathogen-free conditions in the animal facility at the Institut Pasteur de Lille. B6-IL10tm1Cgn (IL10^{-/-}) mice were bred in the animal facility of the University Hospital of Zurich. Animals had access to standard tap water and chow diet *ad libitum*. All animal experiments were approved by the local animal care program and were in accordance with the European convention on research animal protection.

Aluminum treatment. Aluminum phosphate (AlH₆O₁₂P₃; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or aluminum citrate (AlC₆O₇H₅) was diluted in PBS (Lifetechnologies, Saint Aubin, France) and administered once a day with a gavage needle at a concentration of 1.5 mg Al element per kg body weight, an amount equivalent to the high end of the total aluminum range ingested daily by humans living in contemporary urban society.¹⁶ The duration of aluminum treatment was dependent on the setting of each experiment and was detailed in each figure. A dose-response experiment was performed and AluP was given to mice at a concentration of 0.15, 1.5, and 15 mg Al element per kg body weight per day. Zinc phosphate (Zn₃(PO₄)₂) diluted in PBS was used as a control and was orally administered to mice at a concentration of 1.5 mg Zn element per kg body weight per day. Stock solutions of aluminum salts or ZnP, adjusted to mice weight, were prepared weekly. In all experiments, control mice received PBS by gavage.

For experiments performed with IL10^{-/-} mice, AluCi was diluted in their drinking water at a concentration of 0.015 mg Al element ml⁻¹ to reach a daily exposure of 1.5 mg Al element per kg body weight.

Induction of TNBS and DSS colitis. TNBS colitis was induced in anesthetized C57BL/6 mice by intrarectal administration of TNBS (150 mg kg⁻¹; Sigma-Aldrich) diluted in a 1:1 (v/v) mix of 0.9% NaCl and 100% ethanol, as described previously.⁴⁷ Control animals received an NaCl/ethanol mix using the same technique. Mice were euthanized 4 days after TNBS/ethanol administration.

Acute colitis was induced with 2.5% (w/v) DSS (45 kDa; TdB Consultancy, Uppsala, Sweden) dissolved in water for 7–9 days. For recovery experiments, colitis was induced by feeding mice with 2% (w/v) DSS for 7 days, followed by normal water until the end of the experiments, 10 or 12 days after DSS discontinuation. At the end of each experiment, mice were assessed for clinical score and euthanized.

Determination of clinical scores. For TNBS-induced colitis, animals were euthanized and the colon of each mouse was dissected and cut longitudinally to reveal the colonic mucosa. The intensity of colonic lesions was first evaluated macroscopically according to the Wallace score.⁴⁸ The Wallace score rates macroscopic lesions on a scale from 0 to 10 based on features reflecting inflammation, such as hyperemia, thickening of the bowel, and the extent of ulceration. A colon specimen located within the ulceration was used for histological evaluation. The other parts of the colon were frozen for subsequent analysis of mRNA expression and MPO activity quantification.

For DSS-induced colitis, body weight was determined regularly during DSS and the water administration phase until the end of each experiment. At the end of each experiment, animals were assessed for clinical score by recording body weight variation, stool consistency, and occult blood before being euthanized. A DAI was determined as previously described and is summarized in **Supplementary Table 1** online.⁴⁹ Rectal bleeding was assessed with the ColoScreen III Lab Pack (Elitech, Salon-de-Provence, France). The DAI score ranged from 0 (healthy) to 12 (greatest level of colitis). After euthanasia, the colon was carefully dissected and its weight and size were measured. Circular sections of the colon were prepared for histological analysis. The other parts of the colon were frozen for subsequent analysis of mRNA expression and MPO activity quantification.

In the model of chronic colitis, IL10^{-/-} animals were anesthetized intraperitoneally with a mixture of 100 mg ketamine (Vétoquinol, Bern, Switzerland) and 8 mg of Xylazine (Bayer, Lyssach, Switzerland) per kg body weight and examined as described previously with the Tele Pack Pal 20043020 (Karl Storz Endoskope, Tuttlingen, Germany).⁵⁰ Colonoscopy was scored using the murine endoscopic index of colitis severity scoring system as described previously.⁵¹ After euthanasia, circular sections of the colon were prepared for histological analysis. The other parts of the colon were frozen for subsequent analysis of mRNA expression and MPO activity quantification.

Histology. Colons were fixed in 4% paraformaldehyde, and embedded in paraffin (Labonord, Templemars, France). Tissue sections were stained with May-Grünwald and Giemsa and evaluated blindly by two investigators. Histological lesions of mice with TNBS-induced colitis were quantified using the modification by Ameho of the histopathological grading system of Macpherson and Pfeiffer (ranging from 0 to 6).⁴⁸ Briefly, histological findings identical to those of normal mice were scored as 0, mild mucosal and/or submucosal inflammatory infiltrate and edema, punctate mucosal erosions, and intact muscularis mucosae were scored as 1, the same histological findings involving 50% of the specimen were scored as 2, prominent inflammatory infiltrate and edema, deeper areas of ulceration extending through the muscularis mucosae into the submucosa, and rare inflammatory cells invading the muscularis propria but without muscle necrosis were scored as 3, the same histological findings involving 50% of the specimen were scored as 4, extensive ulceration with coagulative necrosis with deep extension of the necrosis into the muscularis propria were scored as 5, and the same histological findings involving 50% of the specimen were scored as 6.

For DSS-induced colitis and chronic colitis, histological lesions were assessed using a score quantifying the intensity of the inflammatory cell infiltrate (scores 0–3) and the tissue damage (scores 0–3) as previously described.⁴⁹ Briefly, the presence of occasional inflammatory cells in the lamina propria was scored as 0, increased numbers of inflammatory cells in the lamina propria as 1, confluence of inflammatory cells extending into the submucosa as 2, and transmural extension of the infiltrate as 3. For tissue damage, scores were 0, no mucosal damage; 1, lymphoepithelial lesions; 2, surface mucosal erosion or focal ulceration; 3, extensive mucosal damage and extension into deeper structures of the bowel wall. The combined histological score ranged from 0 (no changes) to 6 (extensive infiltration and tissue damage).

MPO activity measurement. MPO activity was measured to monitor the degree of neutrophil infiltration in the colonic lesions during chemically induced and chronic colitis.⁵² Colon specimens were homogenized with an Ultra Turrax T8 (Ika-Werke, Staufen, Germany) in a phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium and subjected to two sonication and freeze-thaw cycles. The suspensions were centrifuged at 14,000 × g for 15 min at 4 °C and the supernatants were reacted with 1 mg ml⁻¹ o-dianisidine hydrochloride and 0.0005% hydrogen peroxide. The optical density of each sample was read at 450 nm with a Versamax microplate reader (MDS Analytical Technologies, Saint-Grégoire, France). One unit of MPO activity was defined as the amount that degraded 1 μmol peroxidase per minute at 25 °C. The results were expressed as absorbance per total quantity of proteins determined by the Bradford method.

PCNA staining and TUNEL. *Ex vivo* cell proliferation was assessed by staining for PCNA. Colonic sections were boiled in 0.1 M sodium citrate buffer pH 6.0 for 6 min for antigen unmasking. After washing, sections were blocked for 30 min with 5% bovine serum albumin in PBS, stained overnight at 4 °C with anti-PCNA antibody (1/50) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), and incubated with Alexa 488 conjugated secondary antibody (1/100) (Invitrogen, Saint-Aubin, France) for 1 h. Sections were counterstained with DAPI (Molecular

Probes, Eugene, OR). To ensure specificity of immunostaining, control sections underwent simultaneous staining with isotype control antibody.

Detection of apoptosis was performed by TUNEL assay using the *in situ* cell death detection kit (Roche, Meylan, France). Sections were permeabilized with 1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate, washed and stained for TUNEL according to the manufacturer's instructions. Sections were counterstained with DAPI.

The quantification of positive TUNEL- or PCNA-stained cells was performed randomly using the ImageJ processing and analysis software (NIH, Bethesda, MD). Images were acquired with a DM5500B microscope equipped with a DFC 310 FX camera (Leica Microsystems, Nanterre, France) and mucosal layers were photographed at a magnification of × 10 to measure specific fluorescence intensity.

Cell line stimulation assay. Caco-2 and HT-29 epithelial cells were cultured in 12-well plates (density of 5 × 10⁵ cells per well) with Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, Courtaboeuf Cedex, France) and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen), at 37 °C in 5% CO₂/95% humidified air. Cells were treated with AluP at different concentrations (10–100 μg Al element ml⁻¹) with or without LPS (1 μg ml⁻¹; Sigma-Aldrich) for 3–6 h. After the incubation period, cells were washed twice with sterile PBS, then lysed with RA1 buffer containing 1% β-mercaptoethanol (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

For the determination of cytotoxicity and proliferation, cells were incubated with aluminum for 5 days. Supernatants were collected for lactate dehydrogenase measurement (Cytotoxicity detection kit; Roche) and cell proliferation was assessed using a colorimetric MTT cell proliferation assay (Interchim, Montluçon Cedex, France). Optical density was read at 500 and 570 nm, respectively, with a Versamax microplate reader (MDS Analytical Technologies).

RNA extraction and real-time qPCR. Total RNA was extracted from colonic samples with the NucleoSpin RNAII commercial kit (Macherey-Nagel), as described by the manufacturer. cDNA was prepared with the High Capacity cDNA Archive kit and RT-qPCR was performed with SyBrGreen (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France). Beta-actin was used as a reference gene and primer sequences are listed in **Supplementary Table 2**.

Microbiologic analysis. Colon samples and MLN were introduced into pre-weighed vials containing 1.5 ml of cysteineated Ringer's solution. After physical disruption of the colon specimens, 10-fold dilutions were performed in the same diluent (decimal dilutions from 10⁻² to 10⁻⁵). Each dilution was spread onto plates of non-selective blood agar (modified Columbia agar) incubated at 37 °C for 1 week under anaerobic conditions, McConkey plates (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) incubated at 37 °C for 48 h under aerobic conditions, and Man, Rogosa, Sharpe plates incubated at 37 °C for 48 h under CO₂-enriched conditions. Total counts were performed, and different types of colonies were subcultured and identified following established morphological and biochemical criteria. Quantitative results are expressed in log colony forming unit (CFU) g⁻¹. The threshold of detection is 10⁴ CFU g⁻¹.

After disruption of MLN in the Ringer's solution, 1 ml was grown in brain-heart enrichment broth and 0.1 ml was spread onto plates of non-selective blood agar and incubated at 37 °C for 1 week under anaerobic conditions. If the brain-heart enrichment broth became turbid, then 0.1 ml was spread onto plate of non-selective blood agar and incubated at 37 °C for 1 week under anaerobic conditions. Subcultured bacteria were identified as above. The threshold of detection was 10² CFU g⁻¹. All samples were analyzed in a blind manner.

In vitro granulomas formation. Fresh human blood from healthy volunteers was obtained from the Etablissement Français du Sang and was diluted 1/1 (v/v) with RPMI (Invitrogen), layered gently onto a

ARTICLES

ficoll-paque solution (Amersham, Courtaboeuf Cedex, France) and then centrifuged for 40 min at 1,800 r.p.m. PBMCs were collected and washed three times in RPMI medium by 10 min centrifugation at 1,800 r.p.m. Cells were counted with a Malassez cell and diluted to a concentration of 1×10^6 cells ml^{-1} in RPMI media supplemented with 7.5% heat-inactivated human AB serum (Sigma-Aldrich). PBMCs were then incubated in 24-well plates with increasing concentrations of AluP or alone for 4–7 days, at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. In each well, the number of granulomas was counted. Granulomas enumeration was performed using an inverted microscope and a $\times 4$ objective (Olympus CK40, Olympus, Rungis, France). Pictures were taken using an inverted microscope with a $\times 4$, $\times 10$, or $\times 40$ objective (Nikon TE300 Eclipse, Champigny-sur-Marne, France). For experiments with bacterial stimulation, PBMCs were incubated with 1×10^5 non-pathogenic *E. coli* K-12 strain DH5 α , AIEC strain LF82 or 1×10^5 BCG, alone or with AluP (5 ng Al element ml^{-1}) for 4 days at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Granulomas enumeration was performed as previously described. Results are represented as the total number of granulomas per well and the percentage of small size (index 1) and big size granulomas (indexes 2–4).

Statistical analysis. Data are presented as the mean $\pm$ s.e.m. Comparison between different treatment groups for quantitative variables was performed using the Wilcoxon–Mann–Whitney test. Two-tailed significance tests were used. Kaplan–Meier analysis with log-rank statistics was performed in survival during DSS-induced colitis. A *P*-value of <0.05 was considered as statistically significant.

SUPPLEMENTARY MATERIAL is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/mi>

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sven Gruber for doing IL10^{−/−} mice colonoscopy. This work was supported by grants from the French association François Aupetit, the European Foundation DIGESTSCIENCE and the Institut de Recherche en Environnement Industriel (IRENI) financed by the Communauté Urbaine de Dunkerque, the Région Nord Pas-de-Calais, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France), the CNRS (France) and the European Regional Development Fund (ERDF).

DISCLOSURE

The authors declared no conflict of interest.

© 2014 Society for Mucosal Immunology

REFERENCES

1. Abraham, C. & Medzhitov, R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **140**, 1729–1737 (2011).
2. Kabi, A., Nickerson, K.P., Homer, C.R. & McDonald, C. Digesting the genetics of inflammatory bowel disease: insights from studies of autophagy risk genes. *Inflamm Bowel Dis* **18**, 782–792 (2012).
3. Kaser, A., Zeissig, S. & Blumberg, R.S. Genes and environment: how will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future? *Dig Dis* **28**, 395–405 (2010).
4. Molodecky, N.A. *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**, 46–54, e42; quiz e30 (2012).
5. Pinski, V., Lemberg, D.A., Grewal, K., Barker, C.C., Schreiber, R.A. & Jacobson, K. Inflammatory bowel disease in the South Asian pediatric population of British Columbia. *Am J Gastroenterol* **102**, 1077–1083 (2007).
6. Cosnes, J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**, 481–496 (2004).

7. Cosnes, J., Carbonnel, F., Beaugerie, L., Blain, A., Reijasse, D. & Gendre, J.P. Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut* **51**, 803–807 (2002).
8. De Vroey, B., De Cassan, C., Gower-Rousseau, C. & Colombel, J.F. Editorial: Antibiotics earlier, IBD later? *Am J Gastroenterol* **105**, 2693–2696 (2010).
9. Hvid, A., Svanstrom, H. & Frisch, M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut* **60**, 49–54 (2011).
10. Kaplan, G.G. *et al.* The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am J Gastroenterol* **105**, 2412–2419 (2010).
11. Ananthakrishnan, A.N., McGinley, E.L., Binion, D.G. & Saeian, K. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflamm Bowel Dis* **17**, 1138–1145 (2011).
12. Becaria, A., Campbell, A. & Bondy, S.C. Aluminum as a toxicant. *Toxicol Ind Health* **18**, 309–320 (2002).
13. Nayak, P. Aluminum: impacts and disease. *Environ Res* **89**, 101–115 (2002).
14. Keith, S. Toxicological profile: aluminum. US department of health and human services. Public health service. *Agency for toxic substances and disease registry* (2008) <http://www.watsdrdcgov/toxprofiles/tp.asp?id=191&tid=34>.
15. Gourier-Frery, C.F.N. *et al.* Aluminium: Quels risques pour la santé? Synthèse des études épidémiologiques. Volet épidémiologiques de l'expertise collective InVS-Afssa-Afssaps. Institut de veille sanitaire (2003) http://www.invsantefr/publications/2003/aluminium_2003/.
16. Greger, J.L. & Sutherland, J.E. Aluminum exposure and metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci* **34**, 439–474 (1997).
17. Lerner, A. Aluminum is a potential environmental factor for Crohn's disease induction: extended hypothesis. *Ann NY Acad Sci* **1107**, 329–345 (2007).
18. Zaki, M.H., Boyd, K.L., Vogel, P., Kastan, M.B., Lamkanfi, M. & Kanneganti, T.D. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* **32**, 379–391 (2010).
19. Puissegur, M.P., Botanch, C., Duteyrat, J.L., Delsol, G., Caratero, C. & Altare, F. An in vitro dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cell Microbiol* **6**, 423–433 (2004).
20. Meconi, S. *et al.* Adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. *Cell Microbiol* **9**, 1252–1261 (2007).
21. Taylor, G.A., Moore, P.B., Ferrier, I.N., Tyrer, S.P. & Edwardson, J.A. Gastrointestinal absorption of aluminium and citrate in man. *J Inorg Biochem* **69**, 165–169 (1998).
22. Meyer-Baron, M., Schaper, M., Knapp, G. & van Thriel, C. Occupational aluminum exposure: evidence in support of its neurobehavioral impact. *Neurotoxicology* **28**, 1068–1078 (2007).
23. Malluche, H.H. Aluminium and bone disease in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **17** (Suppl 2), 21–24 (2002).
24. Cunat, L., Lanthers, M.C., Joyeux, M. & Burnel, D. Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats: effects of aluminum compounds and some dietary constituents. *Biol Trace Elem Res* **76**, 31–55 (2000).
25. Powell, J.J., Ainley, C.C., Evans, R. & Thompson, R.P. Intestinal perfusion of dietary levels of aluminium: association with the mucosa. *Gut* **35**, 1053–1057 (1994).
26. Shepherd, N.A., Crocker, P.R., Smith, A.P. & Levison, D.A. Exogenous pigment in Peyer's patches. *Hum Pathol* **18**, 50–54 (1987).
27. Urbanski, S.J., Arsenault, A.L., Green, F.H. & Haber, G. Pigment resembling atmospheric dust in Peyer's patches. *Mod Pathol* **2**, 222–226 (1989).
28. Powell, J.J. *et al.* Characterisation of inorganic microparticles in pigment cells of human gut associated lymphoid tissue. *Gut* **38**, 390–395 (1996).
29. Fogarty, U., Perl, D., Good, P., Ensley, S., Seawright, A. & Noonan, J. A cluster of equine granulomatous enteritis cases: the link with aluminium. *Vet Hum Toxicol* **40**, 297–305 (1998).
30. Lerner, A.E.S. & Perl, D. *et al.* The role of aluminum in bacterial-induced colitis in IL-10 deficient mice (abstract). *Gastroenterology* **130**, 362–363 (2006).
31. Burrell, S.A. & Exley, C. There is (still) too much aluminium in infant formulas. *BMC Pediatr* **10**, 63 (2010).

32. Sly, P.D. & Flack, F. Susceptibility of children to environmental pollutants. *Ann NY Acad Sci* **1140**, 163–183 (2008).
33. Greger, J.L. Dietary and other sources of aluminium intake. *Ciba Found Symp* **169**, 26–35. discussion-49 (1992).
34. Aspenstrom-Fagerlund, B., Sundstrom, B., Tallkvist, J., Ilback, N.G. & Glynn, A.W. Fatty acids increase paracellular absorption of aluminium across Caco-2 cell monolayers. *Chem Biol Interact* **181**, 272–278 (2009).
35. Exley, C., Siesjo, P. & Eriksson, H. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol* **31**, 103–109 (2010).
36. Vogelbruch, M., Nuss, B., Korner, M., Kapp, A., Kiehl, P. & Bohm, W. Aluminium-induced granulomas after inaccurate intradermal hyposensitization injections of aluminium-adsorbed depot preparations. *Allergy* **55**, 883–887 (2000).
37. Chen, W.J., Monnat, R.J. Jr., Chen, M. & Mottet, N.K. Aluminum induced pulmonary granulomatosis. *Hum Pathol* **9**, 705–711 (1978).
38. Perl, D.P., Fogarty, U., Harpaz, N. & Sachar, D.B. Bacterial-metal interactions: the potential role of aluminum and other trace elements in the etiology of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **10**, 881–883 (2004).
39. Exley, C. *et al.* Elevated urinary excretion of aluminium and iron in multiple sclerosis. *Mult Scler* **12**, 533–540 (2006).
40. Exley, C., Swarbrick, L., Gherardi, R.K. & Authier, F.J. A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. *Med Hypotheses* **72**, 135–139 (2009).
41. Sandstrom, R.E. Aluminum induced pulmonary granulomatosis. *Hum Pathol* **10**, 481 (1979).
42. van der Voet, G.B., Dijkmans, B.A., Frankfort, C. & de Wolff, F.A. Elevation of serum aluminium concentrations in patients with rheumatoid arthritis treated with drugs containing aluminium. *Br J Rheumatol* **28**, 144–146 (1989).
43. Roediger, W.E. & Babidge, W. Human colonocyte detoxification. *Gut* **41**, 731–734 (1997).
44. Kaminsky, L.S. & Zhang, Q.Y. The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. *Drug Metab Dispos* **31**, 1520–1525 (2003).
45. Brant, S.R. *et al.* MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* **73**, 1282–1292 (2003).
46. Langmann, T. *et al.* Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* **127**, 26–40 (2004).
47. Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B. & Neurath, M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* **2**, 541–546 (2007).
48. Ameho, C.K. *et al.* Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* **41**, 487–493 (1997).
49. Yan, Y. *et al.* Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS ONE* **4**, e6073 (2009).
50. Obermeier, F., Kojouharoff, G., Hans, W., Scholmerich, J., Gross, V. & Falk, W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* **116**, 238–245 (1999).
51. Becker, C., Fantini, M.C. & Neurath, M.F. High resolution colonoscopy in live mice. *Nat Protoc* **1**, 2900–2904 (2006).
52. Anton, P.M. *et al.* Corticotropin-releasing hormone (CRH) requirement in Clostridium difficile toxin A-mediated intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 8503–8508 (2004).



This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Bibliographie

- AbdelMageed, M.A., Foltopoulou, P., Betancur-Boissel, M., McNiel, E.A., 2014. Differential effects of aluminum exposure on epithelial and mesenchymal cells. *Cancer Res.* 74, 1157–1157. doi:10.1158/1538-7445.AM2014-1157
- Accarino, A.M., Azpiroz, F., Malagelada, J.R., 2001. Modification of small bowel mechanosensitivity by intestinal fat. *Gut* 48, 690–695.
- AFSSA, InVS, 2003. Evaluation des risques sanitaires liés à l'exposition de la population française à l'aluminium : eaux, aliments, produits de santé [WWW Document]. URL <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/rapports-publics/044000425/index.shtml> (accessed 1.11.16).
- Agarwal, S.K., Ayyash, L., Gourley, C.S., Levy, J., Faber, K., Hughes, C.L., 1996. Evaluation of the developmental neuroendocrine and reproductive toxicology of aluminium. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 34, 49–53.
- Agréus, L., Svärdsudd, K., Nyrén, O., Tibblin, G., 1995. Irritable bowel syndrome and dyspepsia in the general population: overlap and lack of stability over time. *Gastroenterology* 109, 671–680.
- AI-Ashmawy, M.A., 2011. Prevalence and public health significance of aluminum residues in milk and some dairy products. *J. Food Sci.* 76, T73–T76.
- Akatsu, H., Hori, A., Yamamoto, T., Yoshida, M., Mimuro, M., Hashizume, Y., Tooyama, I., Yezdimer, E.M., 2012. Transition metal abnormalities in progressive dementias. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 25, 337–350. doi:10.1007/s10534-011-9504-8
- Akbar, A., Yiangou, Y., Facer, P., Brydon, W.G., Walters, J.R.F., Anand, P., Ghosh, S., 2010. Expression of the TRPV1 receptor differs in quiescent inflammatory bowel disease with or without abdominal pain. *Gut* 59, 767–774. doi:10.1136/gut.2009.194449
- Akbar, A., Yiangou, Y., Facer, P., Walters, J.R.F., Anand, P., Ghosh, S., 2008. Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut* 57, 923–929. doi:10.1136/gut.2007.138982
- Akila, R., Stollery, B.T., Riihimäki, V., 1999. Decrements in cognitive performance in metal inert gas welders exposed to aluminium. *Occup. Environ. Med.* 56, 632–639.
- al-Masalkhi, A., Walton, S.P., 1994. Pulmonary fibrosis and occupational exposure to aluminum. *J. Ky. Med. Assoc.* 92, 59–61.
- Albizzati, A., L, M., D, D.C., M, S., C, L., 2012. Normal concentrations of heavy metals in autistic spectrum disorders. *Minerva Pediatr.* 64, 27–31.
- Alessandri-Haber, N., Joseph, E., Dina, O.A., Liedtke, W., Levine, J.D., 2005. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain* 118, 70–79. doi:10.1016/j.pain.2005.07.016
- Alessandri-Haber, N., Yeh, J.J., Boyd, A.E., Parada, C.A., Chen, X., Reichling, D.B., Levine, J.D., 2003. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* 39, 497–511.
- Alfrey, A.C., 1993. Aluminum toxicity in patients with chronic renal failure. *Ther. Drug Monit.* 15, 593–597.
- Alfrey, A.C., 1980. Aluminum metabolism in uremia. *Neurotoxicology* 1, 43–53.

- Al-Khatib, K., Lin, H.C., 2009. Immune activation and gut microbes in irritable bowel syndrome. *Gut Liver* 3, 14–19. doi:10.5009/gnl.2009.3.1.14
- Amadesi, S., Nie, J., Vergnolle, N., Cottrell, G.S., Grady, E.F., Trevisani, M., Manni, C., Geppetti, P., McRoberts, J.A., Ennes, H., Davis, J.B., Mayer, E.A., Bunnett, N.W., 2004. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4300–4312. doi:10.1523/JNEUROSCI.5679-03.2004
- Anane, R., Bonini, M., Creppy, E.E., 1997. Transplacental passage of aluminum from pregnant mice to fetus organs after maternal transcutaneous exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 16, 501–504.
- Ananthakrishnan, A.N., McGinley, E.L., Binion, D.G., Saeian, K., 2011. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 1138–1145. doi:10.1002/ibd.21455
- Andratsch, M., Mair, N., Constantin, C.E., Scherbakov, N., Benetti, C., Quarta, S., Vogl, C., Sailer, C.A., Uceyler, N., Brockhaus, J., Martini, R., Sommer, C., Zeilhofer, H.U., Müller, W., Kuner, R., Davis, J.B., Rose-John, S., Kress, M., 2009. A key role for gp130 expressed on peripheral sensory nerves in pathological pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 13473–13483. doi:10.1523/JNEUROSCI.1822-09.2009
- Andreoli, S.P., Bergstein, J.M., Sherrard, D.J., 1984. Aluminum intoxication from aluminum-containing phosphate binders in children with azotemia not undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* 310, 1079–1084. doi:10.1056/NEJM198404263101704
- Andresen, V., Montori, V.M., Keller, J., West, C.P., Layer, P., Camilleri, M., 2008. Effects of 5-hydroxytryptamine (serotonin) type 3 antagonists on symptom relief and constipation in nonconstipated irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 6, 545–555. doi:10.1016/j.cgh.2007.12.015
- Annaházi, A., Dabek, M., Gecse, K., Salvador-Cartier, C., Polizzi, A., Rosztóczy, A., Róka, R., Theodorou, V., Wittmann, T., Bueno, L., Eutamene, H., 2012. Proteinase-activated receptor-4 evoked colorectal analgesia in mice: an endogenously activated feed-back loop in visceral inflammatory pain. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 24, 76–85, e13. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01805.x
- Annaházi, A., Ferrier, L., Bézirard, V., Lévêque, M., Eutamène, H., Ait-Belgnaoui, A., Coëffier, M., Ducrotté, P., Róka, R., Inczeffi, O., Gecse, K., Rosztóczy, A., Molnár, T., Ringel-Kulka, T., Ringel, Y., Piche, T., Theodorou, V., Wittmann, T., Bueno, L., 2013. Luminal cysteine-proteases degrade colonic tight junction structure and are responsible for abdominal pain in constipation-predominant IBS. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 1322–1331. doi:10.1038/ajg.2013.152
- Arnich, N., Sirot, V., Rivière, G., Jean, J., Noël, L., Guérin, T., Leblanc, J.-C., 2012. Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd French Total Diet Study. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2432–2449.
- Asfaha, S., Brussee, V., Chapman, K., Zochodne, D.W., Vergnolle, N., 2002. Proteinase-activated receptor-1 agonists attenuate nociception in response to noxious stimuli. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1101–1106. doi:10.1038/sj.bjp.0704568
- Asfaha, S., Cenac, N., Houle, S., Altier, C., Papez, M.D., Nguyen, C., Steinhoff, M., Chapman, K., Zamponi, G.W., Vergnolle, N., 2007. Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. *Br. J. Pharmacol.* 150, 176–185. doi:10.1038/sj.bjp.0706975

- Atkinson, W., Lockhart, S., Whorwell, P.J., Keevil, B., Houghton, L.A., 2006. Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation- and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 130, 34–43. doi:10.1053/j.gastro.2005.09.031
- Augé, C., Balz-Hara, D., Steinhoff, M., Vergnolle, N., Cenac, N., 2009. Protease-activated receptor-4 (PAR 4): a role as inhibitor of visceral pain and hypersensitivity. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 21, 1189–e107. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01310.x
- Aydede, M., 2013. Pain, in: Zalta, E.N. (Ed.), *The Stanford Encyclopedia of Philosophy*.
- Azik, F.M., Ekim, M., Sakallioglu, O., Aydin, A., 2011. A different interaction between parathyroid hormone, calcitriol and serum aluminum in chronic kidney disease; a pilot study. *Int. Urol. Nephrol.* 43, 467–470. doi:10.1007/s11255-010-9784-x
- Azpiroz, F., 2002. Hypersensitivity in functional gastrointestinal disorders. *Gut* 51 Suppl 1, i25–28.
- Azpiroz, F., Bouin, M., Camilleri, M., Mayer, E.A., Poitras, P., Serra, J., Spiller, R.C., 2007. Mechanisms of hypersensitivity in IBS and functional disorders. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 19, 62–88. doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00875.x
- Bakar, C., Karaman, H.I.Ö., Baba, A., Şengünalp, F., 2009. Effect of High Aluminum Concentration in Water Resources on Human Health, Case Study: Biga Peninsula, Northwest Part of Turkey. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 935–944. doi:10.1007/s00244-009-9435-3
- Balemans, D., Alpizar, Y.A., Nasser, Y., Valdez-Morales, E.E., Moonen, A., Cirillo, C., Vanner, S.J., Talavera, K., Berghe, P.V., Wouters, M.M., Boeckxstaens, G.E., 2014. Evidence for Histamine-Mediated Sensitization of TRPV1 Signaling in Sensory Neurons in Mice and IBS Patients. *Gastroenterology* 146, S-220–S-221. doi:10.1016/S0016-5085(14)60782-4
- Balsari, A., Ceccarelli, A., Dubini, F., Fesce, E., Poli, G., 1982. The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome. *Microbiologica* 5, 185–194.
- Banasik, A., Lankoff, A., Piskulak, A., Adamowska, K., Lisowska, H., Wojcik, A., 2005. Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. *Environ. Toxicol.* 20, 402–406. doi:10.1002/tox.20125
- Bang, S., Yoo, S., Oh, U., Hwang, S.W., 2010. Endogenous lipid-derived ligands for sensory TRP ion channels and their pain modulation. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1509–1520. doi:10.1007/s12272-010-1004-9
- Bär, F., Von Koschitzky, H., Roblick, U., Bruch, H.P., Schulze, L., Sonnenborn, U., Böttner, M., Wedel, T., 2009. Cell-free supernatants of *Escherichia coli* Nissle 1917 modulate human colonic motility: evidence from an in vitro organ bath study. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 21, 559–566, e16–17. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01258.x
- Barabas, M.E., Kossyrev, E.A., Stucky, C.L., 2012. TRPA1 is functionally expressed primarily by IB4-binding, non-peptidergic mouse and rat sensory neurons. *PloS One* 7, e47988. doi:10.1371/journal.pone.0047988
- Barau, E., Dupont, C., 1990. Modifications of intestinal permeability during food provocation procedures in pediatric irritable bowel syndrome. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 11, 72–77.
- Barbara, G., 2006. Mucosal barrier defects in irritable bowel syndrome. Who left the door open? *Am. J. Gastroenterol.* 101, 1295–1298. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00667.x
- Barbara, G., De Giorgio, R., Stanghellini, V., Cremon, C., Salvioli, B., Corinaldesi, R., 2004.

New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20 Suppl 2, 1–9. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02036.x

Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G.S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A.M., Grady, E.F., Bunnett, N.W., Collins, S.M., Corinaldesi, R., 2004. 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, N.W., Grundy, D., Corinaldesi, R., 2007. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 132, 26–37. doi:10.1053/j.gastro.2006.11.039

Barrett, J.S., Gearry, R.B., Muir, J.G., Irving, P.M., Rose, R., Rosella, O., Haines, M.L., Shepherd, S.J., Gibson, P.R., 2010. Dietary poorly absorbed, short-chain carbohydrates increase delivery of water and fermentable substrates to the proximal colon. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 31, 874–882. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04237.x

Barrett, J.S., Irving, P.M., Shepherd, S.J., Muir, J.G., Gibson, P.R., 2009. Comparison of the prevalence of fructose and lactose malabsorption across chronic intestinal disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 30, 165–174. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.04018.x

Bassioni, G., Mohammed, F.S., Al Zubaidy, E., Kobrsi, I., 2012. Risk assessment of using aluminum foil in food preparation. *Int J Electrochem Sci* 7, 4498–4509.

Bassotti, G., Chistolini, F., Marinozzi, G., Morelli, A., 2003. Abnormal colonic propagated activity in patients with slow transit constipation and constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Digestion* 68, 178–183. doi:75554

Bazzocchi, G., Ellis, J., Villanueva-Meyer, J., Jing, J., Reddy, S.N., Mena, I., Snape, W.J., 1990. Postprandial colonic transit and motor activity in chronic constipation. *Gastroenterology* 98, 686–693.

Bearcroft, C.P., Perrett, D., Farthing, M.J., 1998. Postprandial plasma 5-hydroxytryptamine in diarrhoea predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. *Gut* 42, 42–46.

Bell, I.R., Baldwin, C.M., Schwartz, G.E., 2001. Sensitization studies in chemically intolerant individuals: implications for individual difference research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 933, 38–47.

Bengtson, M.-B., Rønning, T., Vatn, M.H., Harris, J.R., 2006. Irritable bowel syndrome in twins: genes and environment. *Gut* 55, 1754–1759. doi:10.1136/gut.2006.097287

Benson, S., Kotsis, V., Rosenberger, C., Bingel, U., Forsting, M., Schedlowski, M., Gizewski, E.R., Elsenbruch, S., 2012. Behavioural and neural correlates of visceral pain sensitivity in healthy men and women: does sex matter? *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 16, 349–358. doi:10.1002/j.1532-2149.2011.00027.x

Bernuzzi, V., Desor, D., Lehr, P.R., 1989. Developmental alternations in offspring of female rats orally intoxicated by aluminum chloride or lactate during gestation. *Teratology* 40, 21–27. doi:10.1002/tera.1420400104

Bernuzzi, V., Desor, D., Lehr, P.R., 1986. Effects of prenatal aluminum exposure on neuromotor maturation in the rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*

Berthoud, H.R., Powley, T.L., 1992. Vagal afferent innervation of the rat fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor. *J. Comp. Neurol.* 319, 261–276. doi:10.1002/cne.903190206

Bertiaux-Vandaële, N., Youmba, S.B., Belmonte, L., Lecleire, S., Antonietti, M., Gourcerol,

- G., Leroi, A.-M., Déchelotte, P., Ménard, J.-F., Ducrotté, P., Coëffier, M., 2011. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 2165–2173. doi:10.1038/ajg.2011.257
- Bhat, K., Harper, A., Gorard, D.A., 2002. Perceived food and drug allergies in functional and organic gastrointestinal disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 969–973.
- Bia, M.J., Cooper, K., Schnall, S., Duffy, T., Hendler, E., Malluche, H., Solomon, L., 1989. Aluminum induced anemia: pathogenesis and treatment in patients on chronic hemodialysis. *Kidney Int.* 36, 852–858.
- Biedermann, L., Rogler, G., 2015. The intestinal microbiota: its role in health and disease. *Eur. J. Pediatr.* 174, 151–167. doi:10.1007/s00431-014-2476-2
- Biesiekierski, J.R., Rosella, O., Rose, R., Liels, K., Barrett, J.S., Shepherd, S.J., Gibson, P.R., Muir, J.G., 2011. Quantification of fructans, galacto-oligosaccharides and other short-chain carbohydrates in processed grains and cereals. *J. Hum. Nutr. Diet. Off. J. Br. Diet. Assoc.* 24, 154–176. doi:10.1111/j.1365-277X.2010.01139.x
- Binshtok, A.M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., Brenner, G.J., Ji, R.-R., Bean, B.P., Woolf, C.J., Samad, T.A., 2008. Nociceptors Are Interleukin-1 β Sensors. *J. Neurosci.* 28, 14062–14073. doi:10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008
- Bischoff, S., Crowe, S.E., 2005. Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. *Gastroenterology* 128, 1089–1113.
- Bischoff, S.C., Herrmann, A., Manns, M.P., 1996. Prevalence of adverse reactions to food in patients with gastrointestinal disease. *Allergy* 51, 811–818.
- Bischoff, S.C., Mayer, J., Wedemeyer, J., Meier, P.N., Zeck-Kapp, G., Wedi, B., Kapp, A., Cetin, Y., Gebel, M., Manns, M.P., 1997. Colonoscopic allergen provocation (COLAP): a new diagnostic approach for gastrointestinal food allergy. *Gut* 40, 745–753.
- Blackshaw, L.A., Brierley, S.M., Hughes, P.A., 2010. TRP channels: new targets for visceral pain. *Gut* 59, 126–135. doi:10.1136/gut.2009.179523
- Böhn, L., Störsrud, S., Simrén, M., 2013. Nutrient intake in patients with irritable bowel syndrome compared with the general population. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 25, 23–30.e1. doi:10.1111/nmo.12001
- Bohrer, D., do Nascimento, P.C., Binotto, R., Becker, E., 2003. Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminium. Part III: Interaction container-chemicals during the heating for sterilisation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 17, 107–115.
- Bohrer, D., do Nascimento, P.C., Binotto, R., Carlesso, R., 2001. Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminium. Part II: Amino acids for parenteral nutrition. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15, 103–108.
- Bolle, F., Brian, W., Petit, D., Boutakhrit, K., Feraille, G., Van Loco, J., 2011. Tea brewed in traditional metallic teapots as a significant source of lead, nickel and other chemical elements. *Food Addit. Contam. Part A* 28, 1287–1293.
- Bonavita, V., De Simone, R., 2008. Towards a definition of comorbidity in the light of clinical complexity. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 29 Suppl 1, S99–102. doi:10.1007/s10072-008-0898-1
- Bouin, M., Plourde, V., Boivin, M., Riberdy, M., Lupien, F., Laganière, M., Verrier, P., Poitras, P., 2002. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity,

specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 122, 1771–1777.

Boullemant, A., 2011. PM2.5 emissions from aluminum smelters: coefficients and environmental impact. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 1995 61, 311–318.

Bourinet, E., Altier, C., Hildebrand, M.E., Trang, T., Salter, M.W., Zamponi, G.W., 2014. Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol. Rev.* 94, 81–140. doi:10.1152/physrev.00023.2013

Bovee-Oudenhoven, I.M.J., ten Bruggencate, S.J.M., Lettink-Wissink, M.L.G., van der Meer, R., 2003. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonisation but stimulate translocation of salmonella in rats. *Gut* 52, 1572–1578.

Bowler, R.M., Gysens, S., Diamond, E., Booty, A., Hartney, C., Roels, H.A., 2003. Neuropsychological sequelae of exposure to welding fumes in a group of occupationally exposed men. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206, 517–529. doi:10.1078/1438-4639-00249

Bradley, L.A., 2008. Pathophysiologic mechanisms of fibromyalgia and its related disorders. *J. Clin. Psychiatry* 69 Suppl 2, 6–13.

Brady, R.C., Treanor, J.J., Atmar, R.L., Keitel, W.A., Edelman, R., Chen, W.H., Winokur, P., Belshe, R., Graham, I.L., Noah, D.L., Guo, K., Hill, H., 2009. Safety and immunogenicity of a subvirion inactivated influenza A/H5N1 vaccine with or without aluminum hydroxide among healthy elderly adults. *Vaccine* 27, 5091–5095. doi:10.1016/j.vaccine.2009.06.057

Brandt, L.J., Prather, C.M., Quigley, E.M.M., Schiller, L.R., Schoenfeld, P., Talley, N.J., 2005. Systematic Review on the Management of Chronic Constipation in North America. *Am. J. Gastroenterol.* 100, S5–S21. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.50613_2.x

Brandtzaeg, P., 2010. Food allergy: separating the science from the mythology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 380–400. doi:10.1038/nrgastro.2010.80

Braniste, V., Jouault, A., Gaultier, E., Polizzi, A., Buisson-Brenac, C., Leveque, M., Martin, P.G., 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. doi:10.1073/pnas.0907697107

Brenner, D.M., Moeller, M.J., Chey, W.D., Schoenfeld, P.S., 2009. The utility of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 1033–1049; quiz 1050. doi:10.1038/ajg.2009.25

Brierley, S.M., Castro, J., Harrington, A.M., Hughes, P.A., Page, A.J., Rychkov, G.Y., Blackshaw, L.A., 2011. TRPA1 contributes to specific mechanically activated currents and sensory neuron mechanical hypersensitivity. *J. Physiol.* 589, 3575–3593. doi:10.1113/jphysiol.2011.206789

Brierley, S.M., Hughes, P.A., Page, A.J., Kwan, K.Y., Martin, C.M., O'Donnell, T.A., Cooper, N.J., Harrington, A.M., Adam, B., Liebrechts, T., Holtmann, G., Corey, D.P., Rychkov, G.Y., Blackshaw, L.A., 2009. The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algescic stimuli. *Gastroenterology* 137, 2084–2095.e3. doi:10.1053/j.gastro.2009.07.048

Brierley, S.M., Jones, R.C.W., Gebhart, G.F., Blackshaw, L.A., 2004. Splanchnic and pelvic mechanosensory afferents signal different qualities of colonic stimuli in mice. *Gastroenterology* 127, 166–178.

Brierley, S.M., Page, A.J., Hughes, P.A., Adam, B., Liebrechts, T., Cooper, N.J., Holtmann, G., Liedtke, W., Blackshaw, L.A., 2008. Selective role for TRPV4 ion channels in visceral sensory

pathways. *Gastroenterology* 134, 2059–2069. doi:10.1053/j.gastro.2008.01.074

Brint, E.K., MacSharry, J., Fanning, A., Shanahan, F., Quigley, E.M.M., 2011. Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 329–336. doi:10.1038/ajg.2010.438

Brogden, R.N., Speight, T.M., Avery, G.S., 1974. Sodium cromoglycate (cromolyn sodium): a review of its mode of action, pharmacology, therapeutic efficacy and use. *Drugs* 7, 164–282.

Brookes, S.J.H., Spencer, N.J., Costa, M., Zagorodnyuk, V.P., 2013. Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 286–296. doi:10.1038/nrgastro.2013.29

Brusberg, M., Arvidsson, S., Kang, D., Larsson, H., Lindström, E., Martinez, V., 2009. CB1 receptors mediate the analgesic effects of cannabinoids on colorectal distension-induced visceral pain in rodents. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 1554–1564. doi:10.1523/JNEUROSCI.5166-08.2009

Buchwald, D., Garritty, D., 1994. Comparison of patients with chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and multiple chemical sensitivities. *Arch. Intern. Med.* 154, 2049–2053.

Buckley, M.M., O'Mahony, S.M., O'Malley, D., 2014. Convergence of neuro-endocrine-immune pathways in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 8846–8858. doi:10.3748/wjg.v20.i27.8846

Bueno, L., Fioramonti, J., 2002. Visceral perception: inflammatory and non-inflammatory mediators. *Gut* 51 Suppl 1, i19-23.

Bueno, L., Fioramonti, J., Delvaux, M., Frexinos, J., 1997. Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. *Gastroenterology* 112, 1714–1743.

Buhner, S., Schemann, M., 2012. Mast cell–nerve axis with a focus on the human gut. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis., Mast Cells in inflammation* 1822, 85–92. doi:10.1016/j.bbadis.2011.06.004

Burge, P.S., Scott, J.A., McCoach, J., 2000. Occupational asthma caused by aluminum. *Allergy* 55, 779–780.

Burrell, S.-A.M., Exley, C., 2010. There is (still) too much aluminium in infant formulas. *BMC Pediatr.* 10, 63.

Cai, H., Cao, M., Meng, F., Wei, J., 2007. Pulmonary sarcoid-like granulomatosis induced by aluminum dust: report of a case and literature review. *Chin. Med. J. (Engl.)* 120, 1556–1560.

Cain, K.C., Jarrett, M.E., Burr, R.L., Rosen, S., Hertig, V.L., Heitkemper, M.M., 2009. Gender differences in gastrointestinal, psychological, and somatic symptoms in irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* 54, 1542–1549. doi:10.1007/s10620-008-0516-3

Camilleri, M., 2013. Genetics of human gastrointestinal sensation. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 25, 458–466. doi:10.1111/nmo.12132

Camilleri, M., 2009. Serotonin in the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 16, 53–59.

Camilleri, M., Lasch, K., Zhou, W., 2012. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G775-785. doi:10.1152/ajpgi.00155.2012

Campbell, F.A., Tramèr, M.R., Carroll, D., Reynolds, D.J., Moore, R.A., McQuay, H.J., 2001.

Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *BMJ* 323, 13–16.

Cann, P.A., Read, N.W., Brown, C., Hobson, N., Holdsworth, C.D., 1983. Irritable bowel syndrome: relationship of disorders in the transit of a single solid meal to symptom patterns. *Gut* 24, 405–411.

Cao, H., Qiao, L., Zhang, H., Chen, J., 2010. Exposure and risk assessment for aluminium and heavy metals in Puerh tea. *Sci. Total Environ.* 408, 2777–2784.

Capasso, R., Matias, I., Lutz, B., Borrelli, F., Capasso, F., Marsicano, G., Mascolo, N., Petrosino, S., Monory, K., Valenti, M., Di Marzo, V., Izzo, A.A., 2005. Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* 129, 941–951. doi:10.1053/j.gastro.2005.06.018

Carmichael, K.A., Fallon, M.D., Dalinka, M., Kaplan, F.S., Axel, L., Haddad, J.G., 1984. Osteomalacia and osteitis fibrosa in a man ingesting aluminum hydroxide antacid. *Am. J. Med.* 76, 1137–1143.

Casey, K.L., Minoshima, S., Berger, K.L., Koeppe, R.A., Morrow, T.J., Frey, K.A., 1994. Positron emission tomographic analysis of cerebral structures activated specifically by repetitive noxious heat stimuli. *J. Neurophysiol.* 71, 802–807.

Castro, J., Harrington, A.M., Hughes, P.A., Martin, C.M., Ge, P., Shea, C.M., Jin, H., Jacobson, S., Hannig, G., Mann, E., Cohen, M.B., MacDougall, J.E., Lavins, B.J., Kurtz, C.B., Silos-Santiago, I., Johnston, J.M., Currie, M.G., Blackshaw, L.A., Brierley, S.M., 2013. Linaclotide inhibits colonic nociceptors and relieves abdominal pain via guanylate cyclase-C and extracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Gastroenterology* 145, 1334–1346–11. doi:10.1053/j.gastro.2013.08.017

Cattaruzza, F., Spreadbury, I., Miranda-Morales, M., Grady, E.F., Vanner, S., Bunnett, N.W., 2010. Transient receptor potential ankyrin-1 has a major role in mediating visceral pain in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G81–91. doi:10.1152/ajpgi.00221.2009

Cenac, N., 2011. Proteases and Inflammatory Pain, in: Vergnolle, N., Chignard, M. (Eds.), *Proteases and Their Receptors in Inflammation, Progress in Inflammation Research*. Springer Basel, pp. 253–274.

Cenac, N., Altier, C., Chapman, K., Liedtke, W., Zamponi, G., Vergnolle, N., 2008. Transient receptor potential vanilloid-4 has a major role in visceral hypersensitivity symptoms. *Gastroenterology* 135, 937–946, 946–2. doi:10.1053/j.gastro.2008.05.024

Cenac, N., Altier, C., Motta, J.-P., d'Aldebert, E., Galeano, S., Zamponi, G.W., Vergnolle, N., 2010. Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. *Gut* 59, 481–488. doi:10.1136/gut.2009.192567

Cenac, N., Andrews, C.N., Holzhausen, M., Chapman, K., Cottrell, G., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Barbara, G., Beck, P., Bunnett, N.W., Sharkey, K.A., Ferraz, J.G.P., Shaffer, E., Vergnolle, N., 2007. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Invest.* 117, 636–647. doi:10.1172/JCI29255

Cenac, N., Bautzova, T., Le Faouder, P., Veldhuis, N.A., Poole, D.P., Rolland, C., Bertrand, J., Liedtke, W., Dubourdeau, M., Bertrand-Michel, J., Zecchi, L., Stanghellini, V., Bunnett, N.W., Barbara, G., Vergnolle, N., 2015. Quantification and Potential Functions of Endogenous Agonists of Transient Receptor Potential Channels in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 149, 433–444.e7. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.011

Cervero, F., 1994. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol.*

Rev. 74, 95–138.

Chadwick, V.S., 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.

Chaitanya, T.V.B., Mallipeddi, K., Bondili, J.S., Nayak, P., 2012. Effect of aluminum exposure on superoxide and peroxide handling capacities by liver, kidney, testis and temporal cortex in rat. *Indian J. Biochem. Biophys.* 49, 395–398.

Chang, L., 2005. Brain responses to visceral and somatic stimuli in irritable bowel syndrome: a central nervous system disorder? *Gastroenterol. Clin. North Am.* 34, 271–279. doi:10.1016/j.gtc.2005.02.003

Chang, L., Chey, W.D., Harris, L., Olden, K., Surawicz, C., Schoenfeld, P., 2006a. Incidence of ischemic colitis and serious complications of constipation among patients using alosetron: systematic review of clinical trials and post-marketing surveillance data. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 1069–1079. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00459.x

Chang, L., Lee, O.Y., Naliboff, B., Schmulson, M., Mayer, E.A., 2001. Sensation of bloating and visible abdominal distension in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 3341–3347. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.05336.x

Chang, L., Mayer, E.A., Labus, J.S., Schmulson, M., Lee, O.Y., Olivas, T.I., Stains, J., Naliboff, B.D., 2006b. Effect of sex on perception of rectosigmoid stimuli in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R277–284. doi:10.1152/ajpregu.00729.2005

Chapman, R.W., Stanghellini, V., Geraint, M., Halphen, M., 2013. Randomized clinical trial: macrogol/PEG 3350 plus electrolytes for treatment of patients with constipation associated with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 1508–1515. doi:10.1038/ajg.2013.197

Chaudhary, N.A., Truelove, S.C., 1962. The irritable colon syndrome. A study of the clinical features, predisposing causes, and prognosis in 130 cases. *Q. J. Med.* 31, 307–322.

Chen, B., Zeng, Y., Hu, B., 2010. Study on speciation of aluminum in human serum using zwitterionic bile acid derivative dynamically coated C18 column HPLC separation with UV and on-line ICP-MS detection. *Talanta* 81, 180–186. doi:10.1016/j.talanta.2009.11.057

Chen, C.L., Liu, T.T., Yi, C.H., Orr, W.C., 2010. Effects of capsaicin-containing red pepper sauce suspension on esophageal secondary peristalsis in humans. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 1177–e313. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01561.x

Cheng, S.-P., Lee, J.-J., Liu, T.-P., Chen, H.-H., Wu, C.-J., Liu, C.-L., 2014. Aluminum overload hampers symptom improvement following parathyroidectomy for secondary hyperparathyroidism. *World J. Surg.* 38, 2838–2844. doi:10.1007/s00268-014-2695-8

Chey, W.D., Lembo, A.J., Lavins, B.J., Shiff, S.J., Kurtz, C.B., Currie, M.G., MacDougall, J.E., Jia, X.D., Shao, J.Z., Fitch, D.A., Baird, M.J., Schneier, H.A., Johnston, J.M., 2012. Linaclotide for irritable bowel syndrome with constipation: a 26-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate efficacy and safety. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 1702–1712. doi:10.1038/ajg.2012.254

Chey, W.Y., Jin, H.O., Lee, M.H., Sun, S.W., Lee, K.Y., 2001. Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1499–1506. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03804.x

Childs, C.W., Parfitt, R.L., Newman, R.H., 1990. Structural studies of Silica Springs allophane. *Clay Miner.* 25, 329–341.

- Chines, A., Pacifici, R., 1990. Antacid and sucralfate-induced hypophosphatemic osteomalacia: a case report and review of the literature. *Calcif. Tissue Int.* 47, 291–295.
- Chitkara, D.K., van Tilburg, M.A.L., Blois-Martin, N., Whitehead, W.E., 2008. Early life risk factors that contribute to irritable bowel syndrome in adults: a systematic review. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 765–774; quiz 775. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01722.x
- Chopra, J.S., Kalra, O.P., Malik, V.S., Sharma, R., Chandna, A., 1986. Aluminium phosphide poisoning: a prospective study of 16 cases in one year. *Postgrad. Med. J.* 62, 1113–1115.
- Choudhury, B.K., Shi, X.-Z., Sarna, S.K., 2009. Gene plasticity in colonic circular smooth muscle cells underlies motility dysfunction in a model of postinfective IBS. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G632–G642. doi:10.1152/ajpgi.90673.2008
- Christianson, J.A., Bielefeldt, K., Malin, S.A., Davis, B.M., 2010. Neonatal colon insult alters growth factor expression and TRPA1 responses in adult mice. *Pain* 151, 540–549. doi:10.1016/j.pain.2010.08.029
- Clapham, D.E., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–524. doi:10.1038/nature02196
- Clarke, G.D., Davison, J.S., 1978. Mucosal receptors in the gastric antrum and small intestine of the rat with afferent fibres in the cervical vagus. *J. Physiol.* 284, 55–67.
- Coburn, J.W., Norris, K.C., 1986. Diagnosis of aluminum-related bone disease and treatment of aluminum toxicity with deferoxamine. *Semin. Nephrol.* 6, 12–21.
- Cocks, T.M., Sozzi, V., Moffatt, J.D., Selemidis, S., 1999. Protease-activated receptors mediate apamin-sensitive relaxation of mouse and guinea pig gastrointestinal smooth muscle. *Gastroenterology* 116, 586–592.
- Coelho, A.-M., 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.
- Collins, S.M., 1996. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 111, 1683–1699.
- Collins, S.M., Piche, T., Rampal, P., 2001. The putative role of inflammation in the irritable bowel syndrome. *Gut* 49, 743–745.
- Corsetti, M., Caenepeel, P., Fischler, B., Janssens, J., Tack, J., 2004. Impact of coexisting irritable bowel syndrome on symptoms and pathophysiological mechanisms in functional dyspepsia. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 1152–1159. doi:10.1111/j.1572-0241.2004.30040.x
- Costa, M., Brookes, S.J., Hennig, G.W., 2000. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 Suppl 4, iv15–19; discussion iv26.
- Coughlin, S.R., 1999. How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11023–11027.
- Coutinho, S.V., Plotsky, P.M., Sablad, M., Miller, J.C., Zhou, H., Bayati, A.I., McRoberts, J.A., Mayer, E.A., 2002. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282, G307–G316. doi:10.1152/ajpgi.00240.2001
- Coutts, A.A., Irving, A.J., Mackie, K., Pertwee, R.G., Anavi-Goffer, S., 2002. Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J. Comp. Neurol.* 448, 410–422. doi:10.1002/cne.10270

- Coutts, A.A., Pertwee, R.G., 1997. Inhibition by cannabinoid receptor agonists of acetylcholine release from the guinea-pig myenteric plexus. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1557–1566. doi:10.1038/sj.bjp.0701301
- Cranmer, J.M., Wilkins, J.D., Cannon, D.J., Smith, L., 1986. Fetal-placental-maternal uptake of aluminum in mice following gestational exposure: effect of dose and route of administration. *Neurotoxicology* 7, 601–608.
- Crawley, J.N., Corwin, R.L., 1994. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15, 731–755.
- Creed, F., Craig, T., Farmer, R., 1988. Functional abdominal pain, psychiatric illness, and life events. *Gut* 29, 235–242.
- Cremon, C., Carini, G., Wang, B., Vasina, V., Cogliandro, R.F., De Giorgio, R., Stanghellini, V., Grundy, D., Tonini, M., De Ponti, F., Corinaldesi, R., Barbara, G., 2011. Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 1290–1298. doi:10.1038/ajg.2011.86
- Cremon, C., Gargano, L., Morselli-Labate, A.M., Santini, D., Cogliandro, R.F., De Giorgio, R., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., Barbara, G., 2009. Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 392–400. doi:10.1038/ajg.2008.94
- Cremonini, F., Talley, N.J., 2005. Irritable bowel syndrome: epidemiology, natural history, health care seeking and emerging risk factors. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 34, 189–204. doi:10.1016/j.gtc.2005.02.008
- Crisponi, G., Nurchi, V.M., Bertolasi, V., Remelli, M., Faa, G., 2012. Chelating agents for human diseases related to aluminium overload. *Coord. Chem. Rev.* 256, 89–104.
- Cummings, J.H., Stephen, A.M., 2007. Carbohydrate terminology and classification. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61 Suppl 1, S5-18. doi:10.1038/sj.ejcn.1602936
- Cunat, L., Lanhers, M.C., Joyeux, M., Burnel, D., 2000. Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats: effects of aluminum compounds and some dietary constituents. *Biol. Trace Elem. Res.* 76, 31–55. doi:10.1385/BTER:76:1:31
- Dabeka, R., Fouquet, A., Belisle, S., Turcotte, S., 2011. Lead, cadmium and aluminum in Canadian infant formulae, oral electrolytes and glucose solutions. *Food Addit. Contam.* 28, 744–753.
- Dabeka, R.W., McKenzie, A.D., 1990. Aluminium levels in Canadian infant formulae and estimation of aluminium intakes from formulae by infants 0–3 months old. *Food Addit. Contam.* 7, 275–282.
- Dai, C., Guandalini, S., Zhao, D.-H., Jiang, M., 2012. Antinociceptive effect of VSL#3 on visceral hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome: a possible action through nitric oxide pathway and enhance barrier function. *Mol. Cell. Biochem.* 362, 43–53. doi:10.1007/s11010-011-1126-5
- Dai, Y., Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Tominaga, M., Noguchi, K., 2004. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4293–4299. doi:10.1523/JNEUROSCI.0454-04.2004
- Dale, C., Vergnolle, N., 2008. Protease signaling to G protein-coupled receptors: implications

for inflammation and pain. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 28, 29–37. doi:10.1080/10799890801941913

D'Amato, M., 2013. Genes and functional GI disorders: from casual to causal relationship. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 25, 638–649. doi:10.1111/nmo.12173

D'Amato, M., Whorwell, P.J., Thompson, D.G., Spiller, R.C., Giacobelli, G., Rovati, L.C., 1999. The efficacy and safety of the CCKA-receptor antagonist dexloxiglumide in IBS. *Gut* 45, A258.

Danivat, D., Tankeyoon, M., Sriratanaban, A., 1988. Prevalence of irritable bowel syndrome in a non-Western population. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed* 296, 1710.

Darbre, P.D., 2006. Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *J. Appl. Toxicol. JAT* 26, 191–197. doi:10.1002/jat.1135

Darbre, P.D., 2001. Underarm cosmetics are a cause of breast cancer. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* 10, 389–393.

Davidson, M., Wasserman, R., 1966. The irritable colon of childhood (chronic nonspecific diarrhea syndrome). *J. Pediatr.* 69, 1027–1038.

Davison, A.M., Walker, G.S., Oli, H., Lewins, A.M., 1982. Water supply aluminium concentration, dialysis dementia, and effect of reverse-osmosis water treatment. *Lancet Lond. Engl.* 2, 785–787.

De Ponti, F., Tonini, M., 2001. Irritable bowel syndrome: new agents targeting serotonin receptor subtypes. *Drugs* 61, 317–332.

De Winter, B.Y., van den Wijngaard, R.M., de Jonge, W.J., 2012. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis., Mast Cells in inflammation* 1822, 66–73. doi:10.1016/j.bbadis.2011.03.016

Deiteren, A., van der Linden, L., de Wit, A., Ceuleers, H., Buckinx, R., Timmermans, J.-P., Moreels, T.G., Pelckmans, P.A., De Man, J.G., De Winter, B.Y., 2015. P2X3 Receptors Mediate Visceral Hypersensitivity during Acute Chemically-Induced Colitis and in the Post-Inflammatory Phase via Different Mechanisms of Sensitization. *PLoS ONE* 10. doi:10.1371/journal.pone.0123810

Delvaux, M., Louvel, D., Mamet, J.P., Campos-Oriola, R., Frexinos, J., 1998. Effect of alosetron on responses to colonic distension in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12, 849–855.

Demont, M., Boutakhrit, K., Fekete, V., Bolle, F., Van Loco, J., 2012. Migration of 18 trace elements from ceramic food contact material: Influence of pigment, pH, nature of acid and temperature. *Food Chem. Toxicol.* 50, 734–743.

Denny-Brown, D., Robertson, E.G., 2004. “An investigation of the nervous control of defecation” by Denny-Brown and Robertson: a classic paper revisited. 1935. *Colorectal Dis. Off. J. Assoc. Coloproctology G. B. Irel.* 6, 376–383. doi:10.1111/j.1463-1318.2004.00636.x

Derbyshire, S.W., Jones, A.K., Devani, P., Friston, K.J., Feinmann, C., Harris, M., Pearce, S., Watson, J.D., Frackowiak, R.S., 1994. Cerebral responses to pain in patients with atypical facial pain measured by positron emission tomography. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57, 1166–1172.

Déry, O., Corvera, C.U., Steinhoff, M., Bunnett, N.W., 1998. Proteinase-activated receptors:

- novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.* 274, C1429-1452.
- Després, J.-P., Golay, A., Sjöström, L., Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group, 2005. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N. Engl. J. Med.* 353, 2121–2134. doi:10.1056/NEJMoa044537
- Dhaka, A., Earley, T.J., Watson, J., Patapoutian, A., 2008. Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 566–575. doi:10.1523/JNEUROSCI.3976-07.2008
- Dickhaus, B., Mayer, E.A., Firooz, N., Stains, J., Conde, F., Olivas, T.I., Fass, R., Chang, L., Mayer, M., Naliboff, B.D., 2003. Irritable bowel syndrome patients show enhanced modulation of visceral perception by auditory stress. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 135–143. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.07156.x
- Dinan, T.G., O’Keane, V., O’Boyle, C., Chua, A., Keeling, P.W., 1991. A comparison of the mental status, personality profiles and life events of patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Acta Psychiatr. Scand.* 84, 26–28.
- Dinan, T.G., Quigley, E.M.M., Ahmed, S.M.M., Scully, P., O’Brien, S., O’Mahony, L., O’Mahony, S., Shanahan, F., Keeling, P.W.N., 2006. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* 130, 304–311. doi:10.1053/j.gastro.2005.11.033
- DOI, 1970. Trace metals in waters of the United States. A five year summary of trace metals in rivers and lakes of the United States (Oct. 1, 1962- Sept. 30, 1967). Cincinnati, OH.
- Domingo, J.L., Paternain, J.L., Llobet, J.M., Corbella, J., 1987. The effects of aluminium ingestion on reproduction and postnatal survival in rats. *Life Sci.* 41, 1127–1131.
- Dong, L., Dingguo, L., Xiaoxing, X., Hanming, L., 2005. An epidemiologic study of irritable bowel syndrome in adolescents and children in China: a school-based study. *Pediatrics* 116, e393-396. doi:10.1542/peds.2004-2764
- Drossman, D.A., 1998. Presidential address: Gastrointestinal illness and the biopsychosocial model. *Psychosom. Med.* 60, 258–267.
- Drossman, D.A., Chey, W.D., Johanson, J.F., Fass, R., Scott, C., Panas, R., Ueno, R., 2009. Clinical trial: lubiprostone in patients with constipation-associated irritable bowel syndrome--results of two randomized, placebo-controlled studies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 29, 329–341. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03881.x
- Drossman, D.A., Li, Z., Andruzzi, E., Temple, R.D., Talley, N.J., Thompson, W.G., Whitehead, W.E., Janssens, J., Funch-Jensen, P., Corazziari, E., 1993. U.S. householder survey of functional gastrointestinal disorders. Prevalence, sociodemography, and health impact. *Dig. Dis. Sci.* 38, 1569–1580.
- Drossman, D.A., Li, Z., Leserman, J., Toomey, T.C., Hu, Y.J., 1996. Health status by gastrointestinal diagnosis and abuse history. *Gastroenterology* 110, 999–1007.
- Drossman, D.A., Wood, J.D., Alpers, D.H., Andrews, P.L.R., Kellow, J.E., Delvaux, M., Azpiroz, F., Camilleri, M., Quigley, E.M.M., Thompson, D.G., others, n.d. Rome II: A Multinational Consensus Document on Functional Gastrointestinal Disorders.
- Drossmann, D.A., Grant Thompson, W., Talley, N.J., Funch-Jensen, P., Janssens, J., Whitehead, W.E., 1990. Identification of subgroups of functional gastrointestinal disorder. *Gastroenterol. Int.* 3, 159–172.
- Du Val, G., Grubb, B.R., Bentley, P.J., 1986. Tissue distribution of subcutaneously

administered aluminum chloride in weanling rabbits. *J. Toxicol. Environ. Health* 19, 97–104. doi:10.1080/15287398609530910

Duncan, M., Mouihate, A., Mackie, K., Keenan, C.M., Buckley, N.E., Davison, J.S., Patel, K.D., Pittman, Q.J., Sharkey, K.A., 2008. Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G78–G87. doi:10.1152/ajpgi.90285.2008

Dunlop, S.P., Hebden, J., Campbell, E., Naesdal, J., Olbe, L., Perkins, A.C., Spiller, R.C., 2006. Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 1288–1294. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00672.x

Dunlop, S.P., Jenkins, D., Neal, K.R., Spiller, R.C., 2003a. Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety, and depression in postinfectious IBS. *Gastroenterology* 125, 1651–1659.

Dunlop, S.P., Jenkins, D., Spiller, R.C., 2003b. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 1578–1583. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.07542.x

Dunn, S., Datta, A., Kallis, S., Law, E., Myers, C.E., Whelan, K., 2011. Validation of a food frequency questionnaire to measure intakes of inulin and oligofructose. *Eur. J. Clin. Nutr.* 65, 402–408. doi:10.1038/ejcn.2010.272

Dütsch, M., Eichhorn, U., Wörl, J., Wank, M., Berthoud, H.R., Neuhuber, W.L., 1998. Vagal and spinal afferent innervation of the rat esophagus: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study with special emphasis on calcium-binding proteins. *J. Comp. Neurol.* 398, 289–307.

Dyrssen, D., Haraldsson, C., Nyberg, E., Wedborg, M., 1987. Complexation of aluminum with DNA. *J. Inorg. Biochem.* 29, 67–75.

Ebrahimi Daryani, N., Hashemian, M., Afkham, P., Bashashati, 2009. Mast cell stabilizers as a potential treatment for Irritable bowel syndrome: A randomized placebo-controlled clinical trial. *DARU* 72.

EFSA, 2013. Dietary exposure to aluminium-containing food additives | Autorité européenne de sécurité des aliments [WWW Document]. URL <http://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/pub/411e> (accessed 9.10.15).

EFSA, 2011. Use of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database in Exposure Assessment. *EFSA J.*

EFSA, 2008. Safety of aluminium from dietary intake[1] - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC) | Autorité européenne de sécurité des aliments [WWW Document]. URL <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/754> (accessed 9.10.15).

Efskind, P.S., Bernklev, T., Vatn, M.H., 1996. A double-blind placebo-controlled trial with loperamide in irritable bowel syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.* 31, 463–468. doi:10.3109/00365529609006766

Ek, W.E., Reznichenko, A., Ripke, S., Niesler, B., Zucchelli, M., Rivera, N.V., Schmidt, P.T., Pedersen, N.L., Magnusson, P., Talley, N.J., Holliday, E.G., Houghton, L., Gazouli, M., Karamanolis, G., Rappold, G., Burwinkel, B., Surowy, H., Rafter, J., Assadi, G., Li, L., Papadaki, E., Gambaccini, D., Marchi, S., Colucci, R., Blandizzi, C., Barbaro, R., Karling, P., Walter, S., Ohlsson, B., Tornblom, H., Bresso, F., Andreasson, A., Dlugosz, A., Simren, M., Agreus, L., Lindberg, G., Boeckxstaens, G., Bellini, M., Stanghellini, V., Barbara, G., Daly,

- M.J., Camilleri, M., Wouters, M.M., D'Amato, M., 2014. Exploring the genetics of irritable bowel syndrome: a GWA study in the general population and replication in multinational case-control cohorts. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2014-307997
- Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., 2002. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 966, 290–303.
- Ellis, H., Scurr, J.H., 1979. Axillary hyperhidrosis - topical treatment with aluminium chloride hexahydrate. *Postgrad. Med. J.* 55, 868–869.
- El-Salhy, M., Gundersen, D., Hatlebakk, J.G., Hausken, T., 2013. Low-grade inflammation in the rectum of patients with sporadic irritable bowel syndrome. *Mol. Med. Rep.* 7, 1081–1085. doi:10.3892/mmr.2013.1320
- Esfandyari, T., Camilleri, M., Busciglio, I., Burton, D., Baxter, K., Zinsmeister, A.R., 2007. Effects of a cannabinoid receptor agonist on colonic motor and sensory functions in humans: a randomized, placebo-controlled study. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G137–G145. doi:10.1152/ajpgi.00565.2006
- Exley, C., 2013. Human exposure to aluminium. *Environ. Sci. Process. Impacts* 15, 1807–1816. doi:10.1039/c3em00374d
- Exley, C., 2004. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 380–387. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.017
- Exley, C., 2001. Aluminium and Alzheimer's Disease: The science that describes the link. Elsevier.
- Exley, C., 1998. Does antiperspirant use increase the risk of aluminium-related disease, including Alzheimer's disease? *Mol. Med. Today* 4, 107–109. doi:10.1016/S1357-4310(98)01209-X
- Exley, C., Begum, A., Woolley, M.P., Bloor, R.N., 2006. Aluminum in tobacco and cannabis and smoking-related disease. *Am. J. Med.* 119, 276–e9.
- Exley, C., Charles, L.M., Barr, L., Martin, C., Polwart, A., Darbre, P.D., 2007. Aluminium in human breast tissue. *J. Inorg. Biochem.* 101, 1344–1346. doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.06.005
- Fakri, S., Al-Azzawi, A., Al-Tawil, N., 2006. Antiperspirant use as a risk factor for breast cancer in Iraq. *East. Mediterr. Health J. Rev. Santé Méditerranée Orient. Al-Majallah Al-Şihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit* 12, 478–482.
- Farina, M., Rotta, L.N., Soares, F. a. A., Jardim, F., Jacques, R., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2005. Hematological changes in rats chronically exposed to oral aluminum. *Toxicology* 209, 29–37. doi:10.1016/j.tox.2004.12.005
- FDA, U.F. and drug A., 2007. Code of Federal Regulations 21, vol. 7: Sec. 610.15 (Constituent Materials). Revised 1 April 2003. US Government Publication - Recherche Google [WWW Document]. URL [https://www.google.fr/search?q=Code+of+Federal+Regulations+21,+vol.+7:+Sec.+610.15+\(Constituent+Materials\).+Revised+1+April+2003.+US+Government+Publication&ie=utf-8&oe=utf-8&gws_rd=cr&ei=J1xvVsifPIu5aZ2Wi6gI](https://www.google.fr/search?q=Code+of+Federal+Regulations+21,+vol.+7:+Sec.+610.15+(Constituent+Materials).+Revised+1+April+2003.+US+Government+Publication&ie=utf-8&oe=utf-8&gws_rd=cr&ei=J1xvVsifPIu5aZ2Wi6gI) (accessed 12.15.15).
- Fekete, V., Deconinck, E., Bolle, F., Van Loco, J., 2012. Modelling aluminium leaching into food from different foodware materials with multi-level factorial design of experiments. *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 29, 1322–1333. doi:10.1080/19440049.2012.688068
- Flarend, R., Bin, T., Elmore, D., Hem, S.L., 2001. A preliminary study of the dermal absorption

of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 39, 163–168.

Flarend, R.E., Hem, S.L., White, J.L., Elmore, D., Suckow, M.A., Rudy, A.C., Dandashli, E.A., 1997. In vivo absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using ²⁶Al. *Vaccine* 15, 1314–1318.

Flaten, T.P., 2001. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res. Bull.* 55, 187–196.

Flaten, T.P., 1990. Geographical associations between aluminium in drinking water and death rates with dementia (including Alzheimer's disease), Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis in Norway. *Environ. Geochem. Health* 12, 152–167. doi:10.1007/BF01734064

Flendrig, J.A., Kruis, H., Das, H.A., 1976. ALUMINUM INTOXICATION-CAUSE OF DIALYSIS DEMENTIA, in: *KIDNEY INTERNATIONAL. BLACKWELL SCIENCE INC* 350 MAIN ST, MALDEN, MA 02148, pp. 194–194.

Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P., Forano, E., 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 3, 289–306. doi:10.4161/gmic.19897

Floody, M.C., Theng, B.K.G., Reyes, P., Mora, M.L., 2009. Natural nanoclays: applications and future trends – a Chilean perspective. *Clay Miner.* 44, 161–176. doi:10.1180/claymin.2009.044.2.161

Floyd, K., Morrison, J.F., 1974. Splanchnic mechanoreceptors in the dog. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* 59, 361–366.

Fogarty, U., Perl, D., Good, P., Ensley, S., Seawright, A., Noonan, J., 1998. A cluster of equine granulomatous enteritis cases: the link with aluminium. *Vet. Hum. Toxicol.* 40, 297–305.

Ford, A.C., Brandt, L.J., Young, C., Chey, W.D., Foxx-Orenstein, A.E., Moayyedi, P., 2009. Efficacy of 5-HT₃ antagonists and 5-HT₄ agonists in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 1831–1843; quiz 1844. doi:10.1038/ajg.2009.223

Ford, A.C., Moayyedi, P., Lacy, B.E., Lembo, A.J., Saito, Y.A., Schiller, L.R., Soffer, E.E., Spiegel, B.M.R., Quigley, E.M.M., Task Force on the Management of Functional Bowel Disorders, 2014a. American College of Gastroenterology monograph on the management of irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation. *Am. J. Gastroenterol.* 109 Suppl 1, S2–26; quiz S27. doi:10.1038/ajg.2014.187

Ford, A.C., Quigley, E.M.M., Lacy, B.E., Lembo, A.J., Saito, Y.A., Schiller, L.R., Soffer, E.E., Spiegel, B.M.R., Moayyedi, P., 2014b. Effect of antidepressants and psychological therapies, including hypnotherapy, in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 109, 1350–1365; quiz 1366. doi:10.1038/ajg.2014.148

Ford, A.C., Talley, N.J., 2012. Irritable bowel syndrome. *BMJ* 345, e5836.

Ford, M.J., Miller, P.M., Eastwood, J., Eastwood, M.A., 1987. Life events, psychiatric illness and the irritable bowel syndrome. *Gut* 28, 160–165.

Fordtran, J.S., Rector, F.C., Ewton, M.F., Soter, N., Kinney, J., 1965. Permeability characteristics of the human small intestine. *J. Clin. Invest.* 44, 1935–1944. doi:10.1172/JCI105299

Fordtran, J.S., Rector, F.C., Locklear, T.W., Ewton, M.F., 1967. Water and solute movement in the small intestine of patients with sprue. *J. Clin. Invest.* 46, 287–298. doi:10.1172/JCI105531

- Forster, D.P., Newens, A.J., Kay, D.W., Edwardson, J.A., 1995. Risk factors in clinically diagnosed presenile dementia of the Alzheimer type: a case-control study in northern England. *J. Epidemiol. Community Health* 49, 253–258. doi:10.1136/jech.49.3.253
- Fournier, B.M., Parkos, C.A., 2012. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 5, 354–366. doi:10.1038/mi.2012.24
- Fukudo, S., Nomura, T., Hongo, M., 1998. Impact of corticotropin-releasing hormone on gastrointestinal motility and adrenocorticotrophic hormone in normal controls and patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 42, 845–849.
- Fukumoto, S., Tatewaki, M., Yamada, T., Fujimiya, M., Mantyh, C., Voss, M., Eubanks, S., Harris, M., Pappas, T.N., Takahashi, T., 2003. Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R1269–1276. doi:10.1152/ajpregu.00442.2002
- Gallego, H., Lewis, E.J., Crutchfield, C.E., 1999. Crystal deodorant dermatitis: irritant dermatitis to alum-containing deodorant. *Cutis* 64, 65–66.
- Ganrot, P.O., 1986. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ. Health Perspect.* 65, 363–441.
- Garbossa, G., Gálvez, G., Castro, M.E., Nesse, A., 1998. Oral aluminum administration to rats with normal renal function. 1. Impairment of erythropoiesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 17, 312–317.
- Garsed, K., Chernova, J., Hastings, M., Lam, C., Marciani, L., Singh, G., Henry, A., Hall, I., Whorwell, P., Spiller, R., 2014. A randomised trial of ondansetron for the treatment of irritable bowel syndrome with diarrhoea. *Gut* 63, 1617–1625. doi:10.1136/gutjnl-2013-305989
- Gauthier, E., Fortier, I., Courchesne, F., Pepin, P., Mortimer, J., Gauvreau, D., 2000. Aluminum forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Environ. Res.* 84, 234–246. doi:10.1006/enrs.2000.4101
- Gecse, K., Róka, R., Ferrier, L., Leveque, M., Eutamene, H., Cartier, C., Ait-Belgnaoui, A., Rosztóczy, A., Izbéki, 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. doi:10.1136/gut.2007.140210
- Gershon, M.D., 1999. The enteric nervous system: a second brain. *Hosp. Pract.* 1995 34, 31–32, 35–38, 41–42 passim.
- Gherardi, R., Coquet, M., Chérin, P., Authier, F.-J., Laforêt, P., Bélec, L., Figarella-Branger, D., Mussini, J.-M., Pellissier, J.-F., Fardeau, M., 1998. Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. *The Lancet* 352, 347–352. doi:10.1016/S0140-6736(98)02326-5
- Gherardi, R.K., Authier, F.J., 2012. Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology. *Lupus* 21, 184–189. doi:10.1177/0961203311429557
- Gherardi, R.K., Coquet, M., Cherin, P., Belec, L., Moretto, P., Dreyfus, P.A., Pellissier, J.F., Chariot, P., Authier, F.J., 2001. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain J. Neurol.* 124, 1821–1831.
- Gibbins, I.L., Furness, J.B., Costa, M., MacIntyre, I., Hillyard, C.J., Girgis, S., 1985. Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci. Lett.* 57, 125–130.
- Gibson, P.R., 2011. Food intolerance in functional bowel disorders. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26 Suppl 3, 128–131. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06650.x

- Gibson, P.R., Vogel, V.M., 2009. Sickness-related dysfunction in persons with self-reported multiple chemical sensitivity at four levels of severity. *J. Clin. Nurs.* 18, 72–81. doi:10.1111/j.1365-2702.2008.02439.x
- Goh, C.L., 1990. Aluminum Chloride Hexahydrate Versus Palmar Hyperhidrosis. *Int. J. Dermatol.* 29, 368–370. doi:10.1111/j.1365-4362.1990.tb04766.x
- Golub, M.S., Germann, S.L., Han, B., Keen, C.L., 2000. Lifelong feeding of a high aluminum diet to mice. *Toxicology* 150, 107–117.
- Golub, M.S., Han, B., Keen, C.L., Gershwin, M.E., 1992. Effects of dietary aluminum excess and manganese deficiency on neurobehavioral endpoints in adult mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112, 154–160.
- Golub, M.S., Han, B., Keen, C.L., Gershwin, M.E., Tarara, R.P., 1995. Behavioral performance of Swiss Webster mice exposed to excess dietary aluminum during development or during development and as adults. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133, 64–72. doi:10.1006/taap.1995.1127
- Golub, M.S., Takeuchi, P.T., Gershwin, M.E., Yoshida, S.H., 1993. Influence of dietary aluminum on cytokine production by mitogen-stimulated spleen cells from Swiss Webster mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 15, 605–619. doi:10.3109/08923979309019733
- Gomez, M., Domingo, J.L., Llobet, J.M., 1991. Developmental toxicity evaluation of oral aluminum in rats: influence of citrate. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 323–328.
- Gonlachanvit, S., Mahayosnond, A., Kullavanijaya, P., 2009. Effects of chili on postprandial gastrointestinal symptoms in diarrhoea predominant irritable bowel syndrome: evidence for capsaicin-sensitive visceral nociception hypersensitivity. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 21, 23–32. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01167.x
- González-Weller, D., Gutiérrez, A.J., Rubio, C., Revert, C., Hardisson, A., 2010. Dietary intake of aluminum in a Spanish population (Canary Islands). *J. Agric. Food Chem.* 58, 10452–10457. doi:10.1021/jf102779t
- Goodwin, L., White, P.D., Hotopf, M., Stansfeld, S.A., Clark, C., 2013. Life course study of the etiology of self-reported irritable bowel syndrome in the 1958 British birth cohort. *Psychosom. Med.* 75, 202–210. doi:10.1097/PSY.0b013e31827c351b
- Gorsky, J.E., Dietz, A.A., Spencer, H., Osis, D., 1979. Metabolic balance of aluminum studied in six men. *Clin. Chem.* 25, 1739–1743.
- Grant, A.D., Cottrell, G.S., Amadesi, S., Trevisani, M., Nicoletti, P., Materazzi, S., Altier, C., Cenac, N., Zamponi, G.W., Bautista-Cruz, F., Lopez, C.B., Joseph, E.K., Levine, J.D., Liedtke, W., Vanner, S., Vergnolle, N., Geppetti, P., Bunnett, N.W., 2007. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J. Physiol.* 578, 715–733. doi:10.1113/jphysiol.2006.121111
- Graves, A.B., Rosner, D., Echeverria, D., Mortimer, J.A., Larson, E.B., 1998. Occupational exposures to solvents and aluminium and estimated risk of Alzheimer's disease. *Occup. Environ. Med.* 55, 627–633.
- Greger, J.L., Baier, M.J., 1983. Excretion and retention of low or moderate levels of aluminium by human subjects. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 21, 473–477.
- Greger, J.L., Donnaubauer, S.E., 1986. Retention of aluminium in the tissues of rats after the discontinuation of oral exposure to aluminium. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 24, 1331–1334.
- Greger, J.L., Goetz, W., Sullivan, D., 1985. Aluminum levels in foods cooked and stored in

aluminum pans, trays and foil. *J. Food Prot.* 48, 772–777.

Greger, J.L., Sutherland, J.E., 1997. Aluminum exposure and metabolism. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 34, 439–474. doi:10.3109/10408369709006422

Grichnik, K.P., Ferrante, F.M., 1991. The difference between acute and chronic pain. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 58, 217–220.

Grimbaldeston, M.A., Chen, C.-C., Piliponsky, A.M., Tsai, M., Tam, S.-Y., Galli, S.J., 2005. Mast Cell-Deficient W-shash c-kit Mutant KitW-sh/W-sh Mice as a Model for Investigating Mast Cell Biology in Vivo. *Am. J. Pathol.* 167, 835–848.

Griswold, W.R., Reznik, V., Mendoza, S.A., Trauner, D., Alfrey, A.C., 1983. Accumulation of aluminum in a nondialyzed uremic child receiving aluminum hydroxide. *Pediatrics* 71, 56–58.

Grodzinsky, E., Hallert, C., Faresjö, T., Bergfors, E., Faresjö, A.O., 2012. Could gastrointestinal disorders differ in two close but divergent social environments? *Int. J. Health Geogr.* 11, 5. doi:10.1186/1476-072X-11-5

Grover, M., Camilleri, M., 2013. Effects on gastrointestinal functions and symptoms of serotonergic psychoactive agents used in functional gastrointestinal diseases. *J. Gastroenterol.* 48, 177–181. doi:10.1007/s00535-012-0726-5

Grundmann, O., Yoon, S.L., 2010. Irritable bowel syndrome: epidemiology, diagnosis and treatment: an update for health-care practitioners. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 691–699. doi:10.1111/j.1440-1746.2009.06120.x

Gschossmann, J.M., Liebrechts, T., Adam, B., Buenger, L., Ruwe, M., Gerken, G., Holtmann, G., 2004. Long-term effects of transient chemically induced colitis on the visceromotor response to mechanical colorectal distension. *Dig. Dis. Sci.* 49, 96–101.

Guillard, O., Fauconneau, B., Olichon, D., Dedieu, G., Deloncle, R., 2004. Hyperaluminemia in a woman using an aluminum-containing antiperspirant for 4 years. *Am. J. Med.* 117, 956–959. doi:10.1016/j.amjmed.2004.07.047

Gwee, K.-A., 2005. Irritable bowel syndrome in developing countries--a disorder of civilization or colonization? *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 17, 317–324. doi:10.1111/j.1365-2982.2005.00627.x

Gwee, K.A., Leong, Y.L., Graham, C., McKendrick, M.W., Collins, S.M., Walters, S.J., Underwood, J.E., Read, N.W., 1999. The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. *Gut* 44, 400–406.

Gwee, K.-A., Wee, S., Wong, M.-L., Png, D.J.C., 2004. The prevalence, symptom characteristics, and impact of irritable bowel syndrome in an asian urban community. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 924–931. doi:10.1111/j.1572-0241.2004.04161.x

H, C., 2007. Canadian Total Diet Study. Dietary Intakes of Contaminants & Other Chemicals for Different Age-Sex Groups of Canadians.

Haas, J.S., Phillips, K.A., Sonneborn, D., McCulloch, C.E., Baker, L.C., Kaplan, C.P., Pérez-Stable, E.J., Liang, S.-Y., 2004. Variation in access to health care for different racial/ethnic groups by the racial/ethnic composition of an individual's county of residence. *Med. Care* 42, 707–714.

Halatek, T., Sinczuk-Walczak, H., Rydzynski, K., 2005. Prognostic significance of low serum levels of Clara cell phospholipid-binding protein in occupational aluminium neurotoxicity. *J. Inorg. Biochem.* 99, 1904–1911. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.06.027

- Halmos, E.P., Power, V.A., Shepherd, S.J., Gibson, P.R., Muir, J.G., 2014. A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 146, 67–75.e5. doi:10.1053/j.gastro.2013.09.046
- Hamilton, M.J., Frei, S.M., Stevens, R.L., 2014. The Multifaceted Mast Cell in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 2364–2378. doi:10.1097/MIB.0000000000000142
- Hammer, H.F., Phillips, S.F., Camilleri, M., Hanson, R.B., 1998. Rectal tone, distensibility, and perception: reproducibility and response to different distensions. *Am. J. Physiol.* 274, G584-590.
- Hammer, J., Führer, M., Pipal, L., Matiassek, J., 2008. Hypersensitivity for capsaicin in patients with functional dyspepsia. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 20, 125–133. doi:10.1111/j.1365-2982.2007.00997.x
- Hammer, J., Vogelsang, H., 2007. Characterization of sensations induced by capsaicin in the upper gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 19, 279–287. doi:10.1111/j.1365-2982.2007.00900.x
- Hanauer, S.B., 2008. The role of loperamide in gastrointestinal disorders. *Rev. Gastroenterol. Disord.* 8, 15–20.
- Harrington, A.M., Hughes, P.A., Martin, C.M., Yang, J., Castro, J., Isaacs, N.J., Blackshaw, L.A., Brierley, S.M., 2011. A novel role for TRPM8 in visceral afferent function. *Pain* 152, 1459–1468. doi:10.1016/j.pain.2011.01.027
- Hartemink, R., Schoustra, S.E., Rombouts, F.M., 1999. Degradation of Guar Gum by Intestinal Bacteria. *Biosci. Microflora* 18, 17–25. doi:10.12938/bifidus1996.18.17
- Harvey, R.F., Read, A.E., 1973. Effect of cholecystokinin on colonic motility and symptoms in patients with the irritable-bowel syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1–3.
- Haupt, P., Jänig, W., Kohler, W., 1983. Response pattern of visceral afferent fibres, supplying the colon, upon chemical and mechanical stimuli. *Pflüg. Arch.* 398, 41–47. doi:10.1007/BF00584711
- Hawkins, N.M., Coffey, S., Lawson, M.S., Delves, H.T., 1994. Potential aluminium toxicity in infants fed special infant formula. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 19, 377–381.
- Hayes, P.A., Fraher, M.H., Quigley, E.M.M., 2014. Irritable bowel syndrome: the role of food in pathogenesis and management. *Gastroenterol. Hepatol.* 10, 164–174.
- He, S.C., Qiao, N., Sheng, W., 2003. Neurobehavioral, autonomic nervous function and lymphocyte subsets among aluminum electrolytic workers. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 16, 139–144.
- Heaton, K.W., O'Donnell, L.J., Braddon, F.E., Mountford, R.A., Hughes, A.O., Cripps, P.J., 1992. Symptoms of irritable bowel syndrome in a British urban community: consultants and nonconsulters. *Gastroenterology* 102, 1962–1967.
- Herbert, A., Sterling, G., Abraham, J., Corrin, B., 1982. Desquamative interstitial pneumonia in an aluminum welder. *Hum. Pathol.* 13, 694–699.
- Hernot, D.C., Boileau, T.W., Bauer, L.L., Middelbos, I.S., Murphy, M.R., Swanson, K.S., Fahey, G.C., 2009. In vitro fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligosaccharides, and polydextrose. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1354–1361. doi:10.1021/jf802484j
- Hershfield, N.B., 2005. Nongastrointestinal symptoms of irritable bowel syndrome: an office-

- based clinical survey. *Can. J. Gastroenterol.* 19, 231–234.
- Hiatt, R.B., Katz, L., 1962. Mast cells in inflammatory conditions of the gastrointestinal tract. *Am. J. Gastroenterol.* 37, 541–545.
- Hicks, G.A., Coldwell, J.R., Schindler, M., Ward, P.A.B., Jenkins, D., Lynn, P.A., Humphrey, P.P.A., Blackshaw, L.A., 2002. Excitation of rat colonic afferent fibres by 5-HT(3) receptors. *J. Physiol.* 544, 861–869.
- Hislop, I.G., 1979. Childhood deprivation: an antecedent of the irritable bowel syndrome. *Med. J. Aust.* 1, 372–374.
- Ho, K.Y., Kang, J.Y., Seow, A., 1998. Prevalence of gastrointestinal symptoms in a multiracial Asian population, with particular reference to reflux-type symptoms. *Am. J. Gastroenterol.* 93, 1816–1822. doi:10.1111/j.1572-0241.1998.00526.x
- Ho, T.C., Horn, N.A., Huynh, T., Kelava, L., Lansman, J.B., 2012. Evidence TRPV4 contributes to mechanosensitive ion channels in mouse skeletal muscle fibers. *Channels Austin Tex* 6, 246–254. doi:10.4161/chan.20719
- Hollenberg, M.D., Compton, S.J., 2002. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 203–217.
- Holtmann, G., 2004. IBS: a syndrome or many diseases? *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18 Suppl, 91–97. doi:10.1016/j.bpg.2004.06.017
- Holzer, P., 2015. Acid-Sensing Ion Channels in Gastrointestinal Function. *Neuropharmacology* 94, 72–79. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.12.009
- Holzer, P., 2011. TRP channels in the digestive system. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 24–34.
- Holzer, P., 1998. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen. Pharmacol.* 30, 5–11.
- Hong, S., Fan, J., Kemmerer, E.S., Evans, S., Li, Y., Wiley, J.W., 2009. Reciprocal changes in vanilloid (TRPV1) and endocannabinoid (CB1) receptors contribute to visceral hyperalgesia in the water avoidance stressed rat. *Gut* 58, 202–210. doi:10.1136/gut.2008.157594
- Hosovski, E., Mastelica, Z., Sunderić, D., Radulović, D., 1990. Mental abilities of workers exposed to aluminium. *Med. Lav.* 81, 119–123.
- Hosoya, T., Matsumoto, K., Tashima, K., Nakamura, H., Fujino, H., Murayama, T., Horie, S., 2014. TRPM8 has a key role in experimental colitis-induced visceral hyperalgesia in mice. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 26, 1112–1121. doi:10.1111/nmo.12368
- Houghton, L.A., Atkinson, W., Whitaker, R.P., Whorwell, P.J., Rimmer, M.J., 2003. Increased platelet depleted plasma 5-hydroxytryptamine concentration following meal ingestion in symptomatic female subjects with diarrhoea predominant irritable bowel syndrome. *Gut* 52, 663–670.
- Houghton, L.A., Lea, R., Jackson, N., Whorwell, P.J., 2002. The menstrual cycle affects rectal sensitivity in patients with irritable bowel syndrome but not healthy volunteers. *Gut* 50, 471–474.
- Howell, S., Talley, N.J., Quine, S., Poulton, R., 2004. The irritable bowel syndrome has origins in the childhood socioeconomic environment. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 1572–1578. doi:10.1111/j.1572-0241.2004.40188.x
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C.,

- Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161–202.
- Hughes, P.A., Brierley, S.M., Blackshaw, L.A., 2009. Post-inflammatory modification of colonic afferent mechanosensitivity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 1034–1040. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05248.x
- Hull, M.J., Abraham, J.L., 2002. Aluminum welding fume-induced pneumoconiosis. *Hum. Pathol.* 33, 819–825.
- Hulshof, K.F. a. M., Brussaard, J.H., Kruizinga, A.G., Telman, J., Löwik, M.R.H., 2003. Socio-economic status, dietary intake and 10 y trends: the Dutch National Food Consumption Survey. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 128–137. doi:10.1038/sj.ejcn.1601503
- Hungin, A.P.S., Chang, L., Locke, G.R., Dennis, E.H., Barghout, V., 2005. Irritable bowel syndrome in the United States: prevalence, symptom patterns and impact. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 21, 1365–1375. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02463.x
- Hungin, A.P.S., Whorwell, P.J., Tack, J., Mearin, F., 2003. The prevalence, patterns and impact of irritable bowel syndrome: an international survey of 40,000 subjects. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17, 643–650.
- Husain, N., Chaudhry, I.B., Jafri, F., Niaz, S.K., Tomenson, B., Creed, F., 2008. A population-based study of irritable bowel syndrome in a non-Western population. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 20, 1022–1029. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01143.x
- Hussain, Z., Quigley, E.M.M., 2006. Systematic review: Complementary and alternative medicine in the irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 23, 465–471. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02776.x
- Hyams, J.S., 1983. Sorbitol intolerance: an unappreciated cause of functional gastrointestinal complaints. *Gastroenterology* 84, 30–33.
- Iggo, A., 1955. Tension receptors in the stomach and the urinary bladder. *J. Physiol.* 128, 593–607.
- IP CS/WHO, I.P. on C.S.H.O., 1996. Conclusions and recommendations of a workshop on multiple chemical sensitivities (MCS). *Regul. Toxicol.*
- Izzo, A.A., Mascolo, N., Capasso, F., 2001. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 597–603.
- Izzo, A.A., Mascolo, N., Pinto, L., Capasso, R., Capasso, F., 1999. The role of cannabinoid receptors in intestinal motility, defaecation and diarrhoea in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 384, 37–42.
- Jack, R., Rabin, P.L., McKinney, T.D., 1983. Dialysis encephalopathy: a review. *Int. J. Psychiatry Med.* 13, 309–326.
- Jacob, C., Yang, P.-C., Darmoul, D., Amadesi, S., Saito, T., Cottrell, G.S., Coelho, A.-M., Singh, P., Grady, E.F., Perdue, M., Bunnett, N.W., 2005. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* 280, 31936–31948. doi:10.1074/jbc.M506338200
- Jamal, G.A., 1998. Gulf War syndrome--a model for the complexity of biological and environmental interaction with human health. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 17, 1–17.

- Jarrett, M.E., Kohen, R., Cain, K.C., Burr, R.L., Poppe, A., Navaja, G.P., Heitkemper, M.M., 2007. Relationship of SERT polymorphisms to depressive and anxiety symptoms in irritable bowel syndrome. *Biol. Res. Nurs.* 9, 161–169. doi:10.1177/1099800407307822
- JECFA, 2011. Seventy-fourth meeting Rome, 14–23 June 2011.
- Jiang, X., Locke, G.R., Choung, R.S., Zinsmeister, A.R., Schleck, C.D., Talley, N.J., 2008. Prevalence and risk factors for abdominal bloating and visible distention: a population-based study. *Gut* 57, 756–763. doi:10.1136/gut.2007.142810
- Jing, Y., Wang, Z., Song, Y., 2004. Quantitative study of aluminum-induced changes in synaptic ultrastructure in rats. *Synap. N. Y. N* 52, 292–298. doi:10.1002/syn.20025
- Johannesson, E., Simrén, M., Strid, H., Bajor, A., Sadik, R., 2011. Physical activity improves symptoms in irritable bowel syndrome: a randomized controlled trial. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 915–922. doi:10.1038/ajg.2010.480
- Johansson, P.A., Farup, P.G., Bracco, A., Vandvik, P.O., 2010. How does comorbidity affect cost of health care in patients with irritable bowel syndrome? A cohort study in general practice. *BMC Gastroenterol.* 10, 31. doi:10.1186/1471-230X-10-31
- Jones, H.F., Butler, R.N., Brooks, D.A., 2011. Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G202–206. doi:10.1152/ajpgi.00457.2010
- Jones, R., Lydeard, S., 1992. Irritable bowel syndrome in the general population. *BMJ* 304, 87–90.
- Kaehny, W.D., Hegg, A.P., Alfrey, A.C., 1977. Gastrointestinal absorption of aluminum from aluminum-containing antacids. *N. Engl. J. Med.* 296, 1389–1390. doi:10.1056/NEJM197706162962407
- Kalantar, J.S., Locke, G.R., Zinsmeister, A.R., Beighley, C.M., Talley, N.J., 2003. Familial aggregation of irritable bowel syndrome: a prospective study. *Gut* 52, 1703–1707.
- Kamiya, T., Wang, L., Forsythe, P., Goettsche, G., Mao, Y., Wang, Y., Tougas, G., Bienenstock, J., 2006. Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. *Gut* 55, 191–196. doi:10.1136/gut.2005.070987
- Kanazawa, M., Endo, Y., Whitehead, W.E., Kano, M., Hongo, M., Fukudo, S., 2004. Patients and nonconsulters with irritable bowel syndrome reporting a parental history of bowel problems have more impaired psychological distress. *Dig. Dis. Sci.* 49, 1046–1053.
- Kanematsu, N., Hara, M., Kada, T., 1980. Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutat. Res.* 77, 109–116.
- Kang, J.Y., Ho, K.Y., Yeoh, K.G., Guan, R., 1996. Chronic upper abdominal pain due to duodenal ulcer and other structural and functional causes: its localization and nocturnal occurrence. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 515–519.
- Kang, J.Y., Tay, H.H., Guan, R., 1992. Chronic upper abdominal pain: site and radiation in various structural and functional disorders and the effect of various foods. *Gut* 33, 743–748.
- Kaplan, G.G., Dixon, E., Panaccione, R., Fong, A., Chen, L., Szyszkowicz, M., Wheeler, A., MacLean, A., Buie, W.D., Leung, T., Heitman, S.J., Villeneuve, P.J., 2009. Effect of ambient air pollution on the incidence of appendicitis. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicales Can.* 181, 591–597. doi:10.1503/cmaj.082068
- Kaplan, G.G., Hubbard, J., Korzenik, J., Sands, B.E., Panaccione, R., Ghosh, S., Wheeler, A.J.,

- Villeneuve, P.J., 2010. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2412–2419. doi:10.1038/ajg.2010.252
- Kaplan, G.G., Szyszkowicz, M., Fichna, J., Rowe, B.H., Porada, E., Vincent, R., Madsen, K., Ghosh, S., Storr, M., 2012. Non-specific abdominal pain and air pollution: a novel association. *PloS One* 7, e47669. doi:10.1371/journal.pone.0047669
- Kapraali, M., Johansson, O., Uribe, A., 1999. Endogenous prostaglandins are physiological regulators of endocrine cells in the gastroduodenal mucosa of the rat. *Regul. Pept.* 83, 105–116.
- Karlik, S.J., Eichhorn, G.L., Lewis, P.N., Crapper, D.R., 1980. Interaction of aluminum species with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry (Mosc.)* 19, 5991–5998.
- Karube, J., Nakaishi, K., Sugimoto, H., Fujihira, M., 1996. Size and shape of allophane particles in dispersed aqueous systems. *Clays Clay Miner.* 44, 485–491.
- Kashyap, P.C., Marcobal, A., Ursell, L.K., Larauche, M., Duboc, H., Earle, K.A., Sonnenburg, E.D., Ferreyra, J.A., Higginbottom, S.K., Million, M., Tache, Y., Pasricha, P.J., Knight, R., Farrugia, G., Sonnenburg, J.L., 2013. Complex interactions among diet, gastrointestinal transit, and gut microbiota in humanized mice. *Gastroenterology* 144, 967–977. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.047
- Kawabata, A., Kuroda, R., Kuroki, N., Nishikawa, H., Kawai, K., Araki, H., 2000. Characterization of the protease-activated receptor-1-mediated contraction and relaxation in the rat duodenal smooth muscle. *Life Sci.* 67, 2521–2530.
- Kawabata, A., Kuroda, R., Nishikawa, H., Kawai, K., 1999. Modulation by protease-activated receptors of the rat duodenal motility in vitro: possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation. *Br. J. Pharmacol.* 128, 865–872. doi:10.1038/sj.bjp.0702755
- Keating, C., Pelegrin, P., Martínez, C.M., Grundy, D., 2011. P2X7 receptor-dependent intestinal afferent hypersensitivity in a mouse model of postinfectious irritable bowel syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 1467–1474. doi:10.4049/jimmunol.1100423
- Kennedy, T.M., Jones, R.H., Hungin, A.P., O’flanagan, H., Kelly, P., 1998. Irritable bowel syndrome, gastro-oesophageal reflux, and bronchial hyper-responsiveness in the general population. *Gut* 43, 770–774.
- Keszthelyi, D., Troost, F.J., Simrén, M., Ludidi, S., Kruimel, J.W., Conchillo, J.M., Masclee, A.A., 2012. Revisiting concepts of visceral nociception in irritable bowel syndrome. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 16, 1444–1454. doi:10.1002/j.1532-2149.2012.00147.x
- Khan, Z., Combadière, C., Authier, F.-J., Itier, V., Lux, F., Exley, C., Mahrouf-Yorgov, M., Decrouy, X., Moretto, P., Tillement, O., Gherardi, R.K., Cadusseau, J., 2013. Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. *BMC Med.* 11, 99. doi:10.1186/1741-7015-11-99
- Khanna, R., MacDonald, J.K., Levesque, B.G., 2014. Peppermint oil for the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Gastroenterol.* 48, 505–512. doi:10.1097/MCG.0b013e3182a88357
- Khosla, S.N., Nand, N., Khosla, P., 1988. Aluminium phosphide poisoning. *J. Trop. Med. Hyg.* 91, 196–198.
- Kikuchi, A., Ohashi, K., Sugie, Y., Sugimoto, H., Omura, H., 2008. Pharmacological Evaluation of a Novel Cannabinoid 2 (CB₂) Ligand, PF-03550096, In Vitro and In Vivo by Using a Rat Model of Visceral Hypersensitivity. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 219–224. doi:10.1254/jphs.FP0071599

- Kindt, S., Vos, R., Blondeau, K., Tack, J., 2009. Influence of intra-oesophageal capsaicin instillation on heartburn induction and oesophageal sensitivity in man. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 21, 1032-e82. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01332.x
- Kipen, H.M., Fiedler, N., 2002. Environmental factors in medically unexplained symptoms and related syndromes: the evidence and the challenge. *Environ. Health Perspect.* 110 Suppl 4, 597–599.
- Kirsch, R.H., Riddell, R., 2006. Histopathological alterations in irritable bowel syndrome. *Mod. Pathol.* 19, 1638–1645. doi:10.1038/modpathol.3800704
- Kish, L., Hotte, N., Kaplan, G.G., Vincent, R., Tso, R., Gänzle, M., Rioux, K.P., Thiesen, A., Barkema, H.W., Wine, E., Madsen, K.L., 2013. Environmental particulate matter induces murine intestinal inflammatory responses and alters the gut microbiome. *PloS One* 8, e62220. doi:10.1371/journal.pone.0062220
- Klein, J.P., Mold, M., Mery, L., Cottier, M., Exley, C., 2014. Aluminum content of human semen: implications for semen quality. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 50, 43–48. doi:10.1016/j.reprotox.2014.10.001
- Klooker, T.K., Braak, B., Painter, R.C., de Rooij, S.R., van Elburg, R.M., van den Wijngaard, R.M., Roseboom, T.J., Boeckxstaens, G.E., 2009. Exposure to severe wartime conditions in early life is associated with an increased risk of irritable bowel syndrome: a population-based cohort study. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 2250–2256. doi:10.1038/ajg.2009.282
- Klooker, T.K., Leliefeld, K.E.M., Van Den Wijngaard, R.M., Boeckxstaens, G.E.E., 2011. The cannabinoid receptor agonist delta-9-tetrahydrocannabinol does not affect visceral sensitivity to rectal distension in healthy volunteers and IBS patients. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 23, 30–35, e2. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01587.x
- Kohen, R., Jarrett, M.E., Cain, K.C., Jun, S.-E., Navaja, G.P., Symonds, S., Heitkemper, M.M., 2009. The serotonin transporter polymorphism rs25531 is associated with irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* 54, 2663–2670. doi:10.1007/s10620-008-0666-3
- Koloski, N.A., Jones, M., Weltman, M., Kalantar, J., Bone, C., Gowryshankar, A., Walker, M.M., Talley, N.J., 2015. Identification of early environmental risk factors for irritable bowel syndrome and dyspepsia. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 27, 1317–1325. doi:10.1111/nmo.12626
- Koo, W.W., Kaplan, L.A., Krug-Wispe, S.K., 1988. Aluminum contamination of infant formulas. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 12, 170–173.
- Krasovskiĭ, G.N., Vasukovich, L.Y., Chariev, O.G., 1979. Experimental study of biological effects of leads and aluminum following oral administration. *Environ. Health Perspect.* 30, 47–51.
- Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M., Rondeau, V., 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 10 Suppl 1, 1–269. doi:10.1080/10937400701597766
- Kuiken, S.D., Lindeboom, R., Tytgat, G.N., Boeckxstaens, G.E., 2005. Relationship between symptoms and hypersensitivity to rectal distension in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22, 157–164. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02524.x
- Kwan, C.L., Diamant, N.E., Pope, G., Mikula, K., Mikulis, D.J., Davis, K.D., 2005. Abnormal forebrain activity in functional bowel disorder patients with chronic pain. *Neurology* 65, 1268–

1277. doi:10.1212/01.wnl.0000180971.95473.cc

Lansdown, A.B., 1973. Production of epidermal damage in mammalian skins by some simple aluminium compounds. *Br. J. Dermatol.* 89, 67–76.

Lauricella, A.M., Garbossa, G., Nesse, A., 2001. Dissimilar behavior of lymph cells in response to the action of aluminium. *In vitro and in vivo studies. Int. Immunopharmacol.* 1, 1725–1732.

Le Faouder, P., Baillif, V., Spreadbury, I., Motta, J.-P., Rousset, P., Chêne, G., Guigné, C., Tercé, F., Vanner, S., Vergnolle, N., Bertrand-Michel, J., Dubourdeau, M., Cenac, N., 2013. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 932, 123–133. doi:10.1016/j.jchromb.2013.06.014

Leblondel, G., Allain, P., 1980. Blood and brain aluminium concentrations in mice after intraperitoneal injection of different aluminium compounds. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 27, 579–586.

Lee, H., Park, J.H., Park, D.I., Kim, H.J., Cho, Y.K., Sohn, C.I., Jeon, W.K., Kim, B.I., Chae, S.W., 2013. Mucosal mast cell count is associated with intestinal permeability in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 19, 244–250. doi:10.5056/jnm.2013.19.2.244

Lee, J.W., Park, J.H., Park, D.I.L., Park, J.-H., Kim, H.J., Cho, Y.K., Sohn, C.I.L., Jeon, W.K., Kim, B.I., 2010. Subjects with diarrhea-predominant IBS have increased rectal permeability responsive to tryptase. *Dig. Dis. Sci.* 55, 2922–2928. doi:10.1007/s10620-009-1094-8

Lee, K.J., Kim, Y.B., Kim, J.H., Kwon, H.C., Kim, D.K., Cho, S.W., 2008. The alteration of enterochromaffin cell, mast cell, and lamina propria T lymphocyte numbers in irritable bowel syndrome and its relationship with psychological factors. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1689–1694. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05574.x

Lee, K.-J., Vos, R., Tack, J., 2004. Effects of capsaicin on the sensorimotor function of the proximal stomach in humans. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19, 415–425.

Lee, S.H., 2015. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest. Res.* 13, 11–18. doi:10.5217/ir.2015.13.1.11

Lerner, A., 2007. Aluminum is a potential environmental factor for Crohn's disease induction: extended hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1107, 329–345. doi:10.1196/annals.1381.035

Letterman, R.D., Driscoll, C.T., 1988. Survey of residual aluminum in filtered water. *J. Am. Water Works Assoc.* 154–158.

Levy, R.L., Jones, K.R., Whitehead, W.E., Feld, S.I., Talley, N.J., Corey, L.A., 2001. Irritable bowel syndrome in twins: heredity and social learning both contribute to etiology. *Gastroenterology* 121, 799–804.

Li, W., He, Y., Wu, J., Xu, J., 2012. Extraction and characterization of natural soil nanoparticles from Chinese soils. *Eur. J. Soil Sci.* 63, 754–761. doi:10.1111/j.1365-2389.2012.01480.x

Li, Y., Ji, A., Weihe, E., Schäfer, M.K.-H., 2004. Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 9623–9631. doi:10.1523/JNEUROSCI.2392-04.2004

Liang, W.-J., Zhang, G., Luo, H.-S., Liang, L.-X., Huang, D., Zhang, F.-C., 2016. Tryptase and Protease-Activated Receptor 2 Expression Levels in Irritable Bowel Syndrome. *Gut Liver* 10, 382–390. doi:10.5009/gnl14319

- Lin, W., Stayton, I., Huang, Y., Zhou, X.-D., Ma, Y., 2008. Cytotoxicity and cell membrane depolarization induced by aluminum oxide nanoparticles in human lung epithelial cells A549. *Toxicol. Environ. Chem.* 90, 983–996. doi:10.1080/02772240701802559
- Lione, A., 1985. Aluminum intake from non-prescription drugs and sucralfate. *Gen. Pharmacol.* 16, 223–228.
- Liu, B., Qin, F., 2005. Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 1674–1681. doi:10.1523/JNEUROSCI.3632-04.2005
- Ljiljana Kezunović, S.S., 2004. ONE-YEAR PREVALENCE OF MUSCULOSKELETAL SYMPTOMS IN ALUMINIUM INDUSTRY POTROOM WORKERS. *Med. Biol.* 11, 148–153.
- Locke, G.R., Zinsmeister, A.R., Fett, S.L., Melton, L.J., Talley, N.J., 2005. Overlap of gastrointestinal symptom complexes in a US community. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 17, 29–34. doi:10.1111/j.1365-2982.2004.00581.x
- Locke, G.R., Zinsmeister, A.R., Talley, N.J., Fett, S.L., Melton, L.J., 2000a. Familial association in adults with functional gastrointestinal disorders. *Mayo Clin. Proc.* 75, 907–912. doi:10.4065/75.9.907
- Locke, G.R., Zinsmeister, A.R., Talley, N.J., Fett, S.L., Melton, L.J., 2000b. Risk factors for irritable bowel syndrome: role of analgesics and food sensitivities. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 157–165. doi:10.1111/j.1572-0241.2000.01678.x
- Lomer, M.C.E., Parkes, G.C., Sanderson, J.D., 2008. Review article: lactose intolerance in clinical practice--myths and realities. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27, 93–103. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x
- Longhurst, J.C., Dittman, L.E., 1987. Hypoxia, bradykinin, and prostaglandins stimulate ischemically sensitive visceral afferents. *Am. J. Physiol.* 253, H556–567.
- Longhurst, J.C., Kaufman, M.P., Ordway, G.A., Musch, T.I., 1984. Effects of bradykinin and capsaicin on endings of afferent fibers from abdominal visceral organs. *Am. J. Physiol.* 247, R552–559.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., Markesbery, W.R., 1998. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* 158, 47–52. doi:10.1016/S0022-510X(98)00092-6
- Lovell, R.M., Ford, A.C., 2012a. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 10, 712–721.e4. doi:10.1016/j.cgh.2012.02.029
- Lovell, R.M., Ford, A.C., 2012b. Effect of gender on prevalence of irritable bowel syndrome in the community: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 991–1000. doi:10.1038/ajg.2012.131
- Ludidi, S., Conchillo, J.M., Keszthelyi, D., Van Avesaat, M., Kruimel, J.W., Jonkers, D.M., Masclee, A. a. M., 2012. Rectal hypersensitivity as hallmark for irritable bowel syndrome: defining the optimal cutoff. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 24, 729–733, e345–346. doi:10.1111/j.1365-2982.2012.01926.x
- Lynn, P.A., Brookes, S.J.H., 2011. Pudendal afferent innervation of the guinea pig external anal sphincter. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 23, 871–e343. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01741.x

- Macfarlane, G.T., Steed, H., Macfarlane, S., 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* 104, 305–344. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x
- Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T., Hunter, G.D., Plevin, R., 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 245–282.
- Madsen, J.L., Linnet, J., Rumessen, J.J., 2006. Effect of nonabsorbed amounts of a fructose-sorbitol mixture on small intestinal transit in healthy volunteers. *Dig. Dis. Sci.* 51, 147–153. doi:10.1007/s10620-006-3100-8
- Malik, Z., Baik, D., Schey, R., 2015. The Role of Cannabinoids in Regulation of Nausea and Vomiting, and Visceral Pain. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 17, 1–9. doi:10.1007/s11894-015-0429-1
- Malin, S., Molliver, D., Christianson, J.A., Schwartz, E.S., Cornuet, P., Albers, K.M., Davis, B.M., 2011. TRPV1 and TRPA1 function and modulation are target tissue dependent. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 10516–10528. doi:10.1523/JNEUROSCI.2992-10.2011
- Mameli, O., Caria, M.A., Melis, P., Zambenedetti, P., Ramila, M., Zatta, P., 2006. Effect of aluminum consumption on the vestibulo-ocular reflex. *Metab. Brain Dis.* 21, 89–107. doi:10.1007/s11011-006-9010-9
- Manheimer, E., Wieland, L.S., Cheng, K., Li, S.M., Shen, X., Berman, B.M., Lao, L., 2012. Acupuncture for irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 835–847; quiz 848. doi:10.1038/ajg.2012.66
- Manna, G., Das, R., 1972. Chromosome Aberrations in Mice Induced by Aluminum-Chloride. *Nucleus* 15, 180–186.
- Mannello, F., Tonti, G.A., Medda, V., Simone, P., Darbre, P.D., 2011. Analysis of aluminium content and iron homeostasis in nipple aspirate fluids from healthy women and breast cancer-affected patients. *J. Appl. Toxicol. JAT* 31, 262–269. doi:10.1002/jat.1641
- Manning, A.P., Thompson, W.G., Heaton, K.W., Morris, A.F., 1978. Towards positive diagnosis of the irritable bowel. *Br. Med. J.* 2, 653–654.
- Mansueto, P., Seidita, A., D’Alcamo, A., Carroccio, A., 2015. Role of FODMAPs in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Nutr. Clin. Pract. Off. Publ. Am. Soc. Parenter. Enter. Nutr.* 30, 665–682. doi:10.1177/0884533615569886
- Marciani, L., Cox, E.F., Hoad, C.L., Pritchard, S., Totman, J.J., Foley, S., Mistry, A., Evans, S., Gowland, P.A., Spiller, R.C., 2010. Postprandial changes in small bowel water content in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 138, 469–477, 477.e1. doi:10.1053/j.gastro.2009.10.055
- Marger, F., Gelot, A., Alloui, A., Matricon, J., Ferrer, J.F.S., Barrère, C., Pizzoccaro, A., Muller, E., Nargeot, J., Snutch, T.P., Eschalier, A., Bourinet, E., Ardid, D., 2011. T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11268–11273. doi:10.1073/pnas.1100869108
- Marmot, M., Allen, J., Bell, R., Bloomer, E., Goldblatt, P., Consortium for the European Review of Social Determinants of Health and the Health Divide, 2012. WHO European review of social determinants of health and the health divide. *Lancet Lond. Engl.* 380, 1011–1029. doi:10.1016/S0140-6736(12)61228-8
- Marquis, J.K., 1983. Aluminum inhibition of human serum cholinesterase. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 164–169.

- Marshall, J.K., 2009. Post-infectious irritable bowel syndrome following water contamination. *Kidney Int. Suppl.* S42-43. doi:10.1038/ki.2008.618
- Marshall, J.K., Thabane, M., Garg, A.X., Clark, W., Meddings, J., Collins, S.M., WEL Investigators, 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. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02284.x
- Marzin, D.R., Phi, H.V., 1985. Study of the mutagenicity of metal derivatives with *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 155, 49–51.
- Massa, F., Storr, M., Lutz, B., 2005. The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 83, 944–954. doi:10.1007/s00109-005-0698-5
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561–564. doi:10.1038/346561a0
- Matthews, S.B., Waud, J.P., Roberts, A.G., Campbell, A.K., 2005. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad. Med. J.* 81, 167–173. doi:10.1136/pgmj.2004.025551
- Maukonen, J., Satokari, R., Mättö, J., Söderlund, H., Mattila-Sandholm, T., Saarela, M., 2006. Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria. *J. Med. Microbiol.* 55, 625–633. doi:10.1099/jmm.0.46134-0
- Mawe, G.M., Hoffman, J.M., 2013. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 473–486. doi:10.1038/nrgastro.2013.105
- Maxwell, P.R., Mendall, M.A., Kumar, D., 1997. Irritable bowel syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 350, 1691–1695.
- Mayer, E.A., Gebhart, G.F., 1994. Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. *Gastroenterology* 107, 271–293.
- McKendrick, M.W., Read, N.W., 1994. Irritable bowel syndrome--post salmonella infection. *J. Infect.* 29, 1–3.
- McLaughlin, A.I.G., Kazantzis, G., King, E., Teare, D., Porter, R.J., Owen, R., 1962. Pulmonary Fibrosis and Encephalopathy Associated with the Inhalation of Aluminium Dust. *Br. J. Ind. Med.* 19, 253–263. doi:10.1136/oem.19.4.253
- Mearin, F., Badía, X., Balboa, A., Baró, E., Caldwell, E., Cucala, M., Díaz-Rubio, M., Fueyo, A., Ponce, J., Roset, M., Talley, N.J., 2001. Irritable bowel syndrome prevalence varies enormously depending on the employed diagnostic criteria: comparison of Rome II versus previous criteria in a general population. *Scand. J. Gastroenterol.* 36, 1155–1161.
- Mehrpour, O., Jafarzadeh, M., Abdollahi, M., 2012. A Systematic Review of Aluminium Phosphide Poisoning. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 63, 61–73.
- Mendall, M.A., Kumar, D., 1998. Antibiotic use, childhood affluence and irritable bowel syndrome (IBS). *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 59–62.
- Menees, S.B., Maneerattannaporn, M., Kim, H.M., Chey, W.D., 2012. The efficacy and safety of rifaximin for the irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 28–35; quiz 36. doi:10.1038/ajg.2011.355

- Merskey, H., Bogduk, N., n.d. "Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage" (pp 209-214) Classification of Chronic - iasp_terminologie_fr.pdf.
- Mertz, H., Morgan, V., Tanner, G., Pickens, D., Price, R., Shyr, Y., Kessler, R., 2000. Regional cerebral activation in irritable bowel syndrome and control subjects with painful and nonpainful rectal distention. *Gastroenterology* 118, 842–848.
- Migliore, L., Cocchi, L., Nesti, C., Sabbioni, E., 1999. Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. *Environ. Mol. Mutagen.* 34, 279–284.
- Miller, R.G., Kopfler, F.C., Kelty, K.C., Stober, J.A., Ulmer, N.S., 1984. The occurrence of aluminum in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 84–91.
- Mirick, D.K., Davis, S., Thomas, D.B., 2002. Antiperspirant use and the risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1578–1580.
- Miyasaka, K., Funakoshi, A., 2003. Cholecystokinin and cholecystokinin receptors. *J. Gastroenterol.* 38, 1–13. doi:10.1007/s005350300000
- Moayyedi, P., Quigley, E.M.M., Lacy, B.E., Lembo, A.J., Saito, Y.A., Schiller, L.R., Soffer, E.E., Spiegel, B.M.R., Ford, A.C., 2014. The effect of fiber supplementation on irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 109, 1367–1374. doi:10.1038/ajg.2014.195
- Mohammed, I., Cherkas, L.F., Riley, S.A., Spector, T.D., Trudgill, N.J., 2005. Genetic influences in irritable bowel syndrome: a twin study. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 1340–1344. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.41700.x
- Möller, W., Häussinger, K., Winkler-Heil, R., Stahlhofen, W., Meyer, T., Hofmann, W., Heyder, J., 2004. Mucociliary and long-term particle clearance in the airways of healthy nonsmoker subjects. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 97, 2200–2206. doi:10.1152/jappphysiol.00970.2003
- Montell, C., 2001. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2001, re1. doi:10.1126/stke.2001.90.re1
- Moore, J., Barlow, D., Jewell, D., Kennedy, S., 1998. Do gastrointestinal symptoms vary with the menstrual cycle? *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105, 1322–1325.
- Morken, T., Moen, B., Riise, T., Bergum, O., Bua, L., Hauge, S.H., Holien, S., Langedrag, A., Olson, H.O., Pedersen, S., Saue, I.L., Seljebø, G.M., Thoppil, V., 2000. Prevalence of musculoskeletal symptoms among aluminium workers. *Occup. Med. Oxf. Engl.* 50, 414–421.
- Morris-Yates, A., Talley, N.J., Boyce, P.M., Nandurkar, S., Andrews, G., 1998. Evidence of a genetic contribution to functional bowel disorder. *Am. J. Gastroenterol.* 93, 1311–1317. doi:10.1111/j.1572-0241.1998.440_j.x
- Mulak, A., Taché, Y., Larauche, M., 2014. Sex hormones in the modulation of irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 2433–2448. doi:10.3748/wjg.v20.i10.2433
- Mulè, F., Baffi, M.C., Capparelli, A., Pizzuti, R., 2003. Involvement of nitric oxide and tachykinins in the effects induced by protease-activated receptors in rat colon longitudinal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 139, 598–604. doi:10.1038/sj.bjp.0705273
- Muller, G., Hutin, M.F., Burnel, D., Lehr, P.R., 1992. Aluminum transfer through milk in female rats intoxicated by aluminum chloride. *Biol. Trace Elem. Res.* 34, 79–87. doi:10.1007/BF02783900

- Mutlu, E.A., Engen, P.A., Soberanes, S., Urich, D., Forsyth, C.B., Nigdelioglu, R., Chiarella, S.E., Radigan, K.A., Gonzalez, A., Jakate, S., Keshavarzian, A., Budinger, G.R.S., Mutlu, G.M., 2011. Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 8, 19. doi:10.1186/1743-8977-8-19
- Nanda, R., James, R., Smith, H., Dudley, C.R., Jewell, D.P., 1989. Food intolerance and the irritable bowel syndrome. *Gut* 30, 1099–1104.
- Neal, K.R., Hebden, J., Spiller, R., 1997. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *BMJ* 314, 779–782.
- Niness, K.R., 1999. Inulin and oligofructose: what are they? *J. Nutr.* 129, 1402S–6S.
- Nordic Expert Group, 2011. Aluminium and aluminium compounds.
- Nozawa, K., Kawabata-Shoda, E., Doihara, H., Kojima, R., Okada, H., Mochizuki, S., Sano, Y., Inamura, K., Matsushime, H., Koizumi, T., Yokoyama, T., Ito, H., 2009. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3408–3413. doi:10.1073/pnas.0805323106
- Nusrat, A., Turner, J.R., Madara, J.L., 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G851–857.
- O'Hare, J.A., Murnaghan, D.J., 1982. Reversal of aluminum-induced hemodialysis anemia by a low-aluminum dialysate. *N. Engl. J. Med.* 306, 654–656. doi:10.1056/NEJM198203183061107
- Ohashi, K., Ichikawa, K., Chen, L., Callahan, M., Zasadny, K., Kurebayashi, Y., 2008. MicroPET detection of regional brain activation induced by colonic distention in a rat model of visceral hypersensitivity. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 70, 43–49.
- Ohman, L., Isaksson, S., Lindmark, A.-C., Posserud, I., Stotzer, P.-O., Strid, H., Sjövall, H., Simrén, M., 2009. T-cell activation in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 1205–1212. doi:10.1038/ajg.2009.116
- Ohman, L., Lindmark, A.-C., Isaksson, S., Posserud, I., Strid, H., Sjövall, H., Simrén, M., 2009. B-cell activation in patients with irritable bowel syndrome (IBS). *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 21, 644–650, e27. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01272.x
- Olivier, P., Marzin, D., 1987. Study of the genotoxic potential of 48 inorganic derivatives with the SOS chromotest. *Mutat. Res.* 189, 263–269.
- Ong, D.K., Mitchell, S.B., Barrett, J.S., Shepherd, S.J., Irving, P.M., Biesiekierski, J.R., Smith, S., Gibson, P.R., Muir, J.G., 2010. Manipulation of dietary short chain carbohydrates alters the pattern of gas production and genesis of symptoms in irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 1366–1373. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06370.x
- Ostgaard, H., Hausken, T., Gundersen, D., El-Salhy, M., 2012. Diet and effects of diet management on quality of life and symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Mol. Med. Rep.* 5, 1382–1390. doi:10.3892/mmr.2012.843
- O'Sullivan, M., Clayton, N., Breslin, N.P., Harman, I., Bountra, C., McLaren, A., O'Morain, C.A., 2000. Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 12, 449–457.
- Oteiza, P.I., Keen, C.L., Han, B., Golub, M.S., 1993. Aluminum accumulation and neurotoxicity in Swiss-Webster mice after long-term dietary exposure to aluminum and citrate.

Metabolism. 42, 1296–1300.

Page, A.J., Blackshaw, L.A., 1998. An in vitro study of the properties of vagal afferent fibres innervating the ferret oesophagus and stomach. *J. Physiol.* 512 (Pt 3), 907–916.

Paintal, A.S., 1957. Responses from mucosal mechanoreceptors in the small intestine of the cat. *J. Physiol.* 139, 353–368.

Paintal, A.S., 1954. A study of gastric stretch receptors; their role in the peripheral mechanism of satiation of hunger and thirst. *J. Physiol.* 126, 255–270.

Pan, S.Y., Morrison, H., Gibbons, L., Zhou, J., Wen, S.W., DesMeules, M., Mao, Y., Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group, 2011. Breast cancer risk associated with residential proximity to industrial plants in Canada. *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 53, 522–529. doi:10.1097/JOM.0b013e318216d0b3

Park, C.H., Joo, Y.E., Choi, S.K., Rew, J.S., Kim, S.J., Lee, M.C., 2003. Activated mast cells infiltrate in close proximity to enteric nerves in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J. Korean Med. Sci.* 18, 204–210.

Park, J.-H., Chae, J., Roh, K., Kil, E.-J., Lee, M., Auh, C.-K., Lee, M.-A., Yeom, C.-H., Lee, S., 2015. Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy via TRPA1 Stimulation in Mice Dorsal Root Ganglion Is Correlated with Aluminum Accumulation. *PloS One* 10, e0124875. doi:10.1371/journal.pone.0124875

Parry, S., Forgacs, I., 2005. Intestinal infection and irritable bowel syndrome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 5–9.

Parsons, V., Davies, C., Goode, C., Ogg, C., Siddiqui, J., 1971. Aluminium in bone from patients with renal failure. *Br. Med. J.* 4, 273–275.

Pennington, J.A., Schoen, S.A., 1995. Estimates of dietary exposure to aluminium. *Food Addit. Contam.* 12, 119–128. doi:10.1080/02652039509374286

Pennington, J.A.T., 1988. Aluminium content of foods and diets. *Food Addit. Contam.* 5, 161–232. doi:10.1080/02652038809373696

Perl, D.P., Good, P.F., 1987. Uptake of aluminium into central nervous system along nasal-olfactory pathways. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1028.

Perl, D.P., Moalem, S., 2006. Aluminum and Alzheimer's disease, a personal perspective after 25 years. *J. Alzheimers Dis. JAD* 9, 291–300.

Pertwee, R.G., Fernando, S.R., Nash, J.E., Coutts, A.A., 1996. Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in guinea-pig small intestine. *Br. J. Pharmacol.* 118, 2199–2205.

Petrik, M.S., Wong, M.C., Tabata, R.C., Garry, R.F., Shaw, C.A., 2007. Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *Neuromolecular Med.* 9, 83–100.

Philpott, H., Gibson, P., Thien, F., 2011. Irritable bowel syndrome - An inflammatory disease involving mast cells. *Asia Pac. Allergy* 1, 36–42. doi:10.5415/apallergy.2011.1.1.36

Pierre, F., Baruthio, F., Diebold, F., Biette, P., 1995. Effect of different exposure compounds on urinary kinetics of aluminium and fluoride in industrially exposed workers. *Occup. Environ. Med.* 52, 396–403.

Pineau, A., Guillard, O., Favreau, F., Marty, M.-H., Gaudin, A., Vincent, C.M., Marraud, A., Fauconneau, B., Marty, J.-P., 2012. In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from

antiperspirants through human skin in the FranzTM diffusion cell. *J. Inorg. Biochem.* 110, 21–26. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.02.013

Pineton de Chambrun, G., Body-Malapel, M., Frey-Wagner, I., Djouina, M., Deknuydt, F., Atrott, K., Esquerre, N., Altare, F., Neut, C., Arrieta, M.C., Kanneganti, T.-D., Rogler, G., Colombel, J.-F., Cortot, A., Desreumaux, P., Vignal, C., 2014. Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol.* 7, 589–601. doi:10.1038/mi.2013.78

Pinto, L., Izzo, A.A., Cascio, M.G., Bisogno, T., Hospodar-Scott, K., Brown, D.R., Mascolo, N., Di Marzo, V., Capasso, F., 2002. Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* 123, 227–234.

Pivnick, E.K., Kerr, N.C., Kaufman, R.A., Jones, D.P., Chesney, R.W., 1995. Rickets secondary to phosphate depletion. A sequela of antacid use in infancy. *Clin. Pediatr. (Phila.)* 34, 73–78.

Platts, M.M., Goode, G.C., Hislop, J.S., 1977. Composition of the domestic water supply and the incidence of fractures and encephalopathy in patients on home dialysis. *Br. Med. J.* 2, 657–660.

Poirier, J., Semple, H., Davies, J., Lapointe, R., Dziwenka, M., Hiltz, M., Mujibi, D., 2011. Double-blind, vehicle-controlled randomized twelve-month neurodevelopmental toxicity study of common aluminum salts in the rat. *Neuroscience* 193, 338–362. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.05.008

Polizzi, S., Pira, E., Ferrara, M., Bugiani, M., Papaleo, A., Albera, R., Palmi, S., 2002. Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 23, 761–774. doi:10.1016/S0161-813X(02)00097-9

Poole, D.P., Amadesi, S., Veldhuis, N.A., Abogadie, F.C., Lieu, T., Darby, W., Liedtke, W., Lew, M.J., McIntyre, P., Bunnett, N.W., 2013. Protease-activated receptor 2 (PAR2) protein and transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) protein coupling is required for sustained inflammatory signaling. *J. Biol. Chem.* 288, 5790–5802. doi:10.1074/jbc.M112.438184

Posserud, I., Agerforz, P., Ekman, R., Björnsson, E.S., Abrahamsson, H., Simrén, M., 2004. Altered visceral perceptual and neuroendocrine response in patients with irritable bowel syndrome during mental stress. *Gut* 53, 1102–1108. doi:10.1136/gut.2003.017962

Posserud, I., Syrous, A., Lindström, L., Tack, J., Abrahamsson, H., Simrén, M., 2007. Altered rectal perception in irritable bowel syndrome is associated with symptom severity. *Gastroenterology* 133, 1113–1123. doi:10.1053/j.gastro.2007.07.024

Powell, J.J., Ainley, C.C., Evans, R., Thompson, R.P., 1994. Intestinal perfusion of dietary levels of aluminium: association with the mucosa. *Gut* 35, 1053–1057.

Powley, T.L., Phillips, R.J., 2011. Vagal intramuscular array afferents form complexes with interstitial cells of Cajal in gastrointestinal smooth muscle: analogues of muscle spindle organs? *Neuroscience* 186, 188–200. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.04.036

Precioso, A.R., Miraglia, J.L., Campos, L.M.A., Goulart, A.C., Timenetsky, M. do C.S.T., Cardoso, M.R.A., Luna, E., Mondini, G., Guedes, J. da S., Raw, I., 2011. A phase I randomized, double-blind, controlled trial of 2009 influenza A (H1N1) inactivated monovalent vaccines with different adjuvant systems. *Vaccine* 29, 8974–8981. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.040

Priest, N.D., 2004. The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update. *J. Environ. Monit. JEM* 6, 375–403. doi:10.1039/b314329p

- Priest, N.D., Talbot, R.J., Austin, J.G., Day, J.P., King, S.J., Fifield, K., Cresswell, R.G., 1996. The bioavailability of ²⁶Al-labelled aluminium citrate and aluminium hydroxide in volunteers. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 9, 221–228.
- Quigley, E.M., 2013. PARs for the course: roles of proteases and PAR receptors in subtly inflamed irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 1644–1646. doi:10.1038/ajg.2013.245
- Quigley, E.M.M., Bytzer, P., Jones, R., Mearin, F., 2006. Irritable bowel syndrome: the burden and unmet needs in Europe. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 38, 717–723. doi:10.1016/j.dld.2006.05.009
- Rajilić-Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H.G.H.J., Kajander, K., Kekkonen, R.A., Tims, S., de Vos, W.M., 2011. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 141, 1792–1801. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.043
- Reed, D.E., Barajas-Lopez, C., Cottrell, G., Velazquez-Rocha, S., Dery, O., Grady, E.F., Bunnett, N.W., Vanner, S.J., 2003. Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J. Physiol.* 547, 531–542. doi:10.1113/jphysiol.2002.032011
- Rescigno, M., 2011. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 32, 256–264. doi:10.1016/j.it.2011.04.003
- Riedl, A., Schmidtman, M., Stengel, A., Goebel, M., Wisser, A.-S., Klapp, B.F., Mönnikes, H., 2008. Somatic comorbidities of irritable bowel syndrome: a systematic analysis. *J. Psychosom. Res.* 64, 573–582. doi:10.1016/j.jpsychores.2008.02.021
- Ringel, Y., Drossman, D.A., Turkington, T.G., Bradshaw, B., Hawk, T.C., Bangdiwala, S., Coleman, R.E., Whitehead, W.E., 2003. Regional brain activation in response to rectal distension in patients with irritable bowel syndrome and the effect of a history of abuse. *Dig. Dis. Sci.* 48, 1774–1781.
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.-J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Meheust, A., 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104 Suppl 2, S1–63. doi:10.1017/S0007114510003363
- Roberfroid, M.B., 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J. Nutr.* 137, 2493S–2502S.
- Roberts-Thomson, I.C., Fettman, M.J., Jonsson, J.R., Frewin, D.B., 1992. Responses to cholecystokinin octapeptide in patients with functional abdominal pain syndromes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 293–297.
- Róka, R., Rosztóczy, A., Leveque, M., Izbéki, F., Nagy, F., Molnár, 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. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 5, 550–555. doi:10.1016/j.cgh.2006.12.004
- Rondeau, V., Commenges, D., Jacqmin-Gadda, H., Dartigues, J.F., 2000. Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: an 8-year follow-up study. *Am. J. Epidemiol.* 152, 59–66.
- Rose, M., Baxter, M., Brereton, N., Baskaran, C., 2010. Dietary exposure to metals and other

elements in the 2006 UK Total Diet Study and some trends over the last 30 years. *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 27, 1380–1404. doi:10.1080/19440049.2010.496794

Rossbach, B., Buchta, M., Csanády, G.A., Filser, J.G., Hilla, W., Windorfer, K., Stork, J., Zschesche, W., Gefeller, O., Pfahlberg, A., Schaller, K.-H., Egerer, E., Escobar Pinzón, L.C., Letzel, S., 2006. Biological monitoring of welders exposed to aluminium. *Toxicol. Lett.* 162, 239–245. doi:10.1016/j.toxlet.2005.09.018

Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., Barnich, N., Neut, C., Dubuquoy, L., Dubuquoy, C., Merour, E., Geboes, K., Chamaillard, M., Ouwehand, A., Leyer, G., Carcano, D., Colombel, J.-F., Ardid, D., Desreumaux, P., 2007. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat. Med.* 13, 35–37. doi:10.1038/nm1521

Ruilope, L.M., Després, J.-P., Scheen, A., Pi-Sunyer, X., Mancía, G., Zanchetti, A., Van Gaal, L., 2008. Effect of rimonabant on blood pressure in overweight/obese patients with/without comorbidities: analysis of pooled RIO study results. *J. Hypertens.* 26, 357–367. doi:10.1097/HJH.0b013e3282f2d625

Rusina, R., Matěj, R., Kašparová, L., Kukal, J., Urban, P., 2011. Higher aluminum concentration in Alzheimer's disease after Box-Cox data transformation. *Neurotox. Res.* 20, 329–333. doi:10.1007/s12640-011-9246-y

Saito, Y.A., 2011. The role of genetics in IBS. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 40, 45–67. doi:10.1016/j.gtc.2010.12.011

Saito, Y.A., Locke, G.R., Talley, N.J., Zinsmeister, A.R., Fett, S.L., Melton, L.J., 2000. A comparison of the Rome and Manning criteria for case identification in epidemiological investigations of irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 2816–2824. doi:10.1111/j.1572-0241.2000.03192.x

Saito, Y.A., Mitra, N., Mayer, E.A., 2010a. Genetic approaches to functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 138, 1276–1285. doi:10.1053/j.gastro.2010.02.037

Saito, Y.A., Petersen, G.M., Larson, J.J., Atkinson, E.J., Fridley, B.L., de Andrade, M., Locke, G.R., Zimmerman, J.M., Almazar-Elder, A.E., Talley, N.J., 2010b. Familial aggregation of irritable bowel syndrome: a family case-control study. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 833–841. doi:10.1038/ajg.2010.116

Saito, Y.A., Zimmerman, J.M., Harmsen, W.S., De Andrade, M., Locke, G.R., Petersen, G.M., Talley, N.J., 2008. Irritable bowel syndrome aggregates strongly in families: a family-based case-control study. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 20, 790–797. doi:10.1111/j.1365-2982.2007.1077.x

Salib, E., Hillier, V., 1996. A case-control study of Alzheimer's disease and aluminium occupation. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 168, 244–249.

Sánchez-Iglesias, S., Méndez-Alvarez, E., Iglesias-González, J., Muñoz-Patiño, A., Sánchez-Sellero, I., Labandeira-García, J.L., Soto-Otero, R., 2009. Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 109, 879–888.

Sang, Q., Young, H.M., 1998. The origin and development of the vagal and spinal innervation of the external muscle of the mouse esophagus. *Brain Res.* 809, 253–268.

Sangwan, V., Tomar, S.K., Singh, R.R.B., Singh, A.K., Ali, B., 2011. Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *J. Food Sci.* 76, R103–111. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02131.x

- Sanson, M., Bueno, L., Fioramonti, J., 2006. Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 18, 949–956. doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00819.x
- Scarborough, R.M., Naughton, M.A., Teng, W., Hung, D.T., Rose, J., Vu, T.K., Wheaton, V.I., Turck, C.W., Coughlin, S.R., 1992. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J. Biol. Chem.* 267, 13146–13149.
- Schaefer, U., Seifert, M., 2006. Oral intake of aluminum from foodstuffs, food additives, food packaging, cookware and pharmaceutical preparations with respect to dietary regulations. *Public Health*.
- Schaller, K.H., Csanady, G., Filser, J., Jüngert, B., Drexler, H., 2007. Elimination kinetics of metals after an accidental exposure to welding fumes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 80, 635–641. doi:10.1007/s00420-007-0176-1
- Schenk, R.U., Bjorksten, J., Yeager, L., 1989. Composition and consequences of Al in water, beverages and other ingestibles. *Environ. Chem. Toxicol.* Al Lewis TE Ed Chelsea MI Lewis Publ. Inc.
- Schmidt, B., Hammer, J., Holzer, P., Hammer, H.F., 2004. Chemical nociception in the jejunum induced by capsaicin. *Gut* 53, 1109–1116. doi:10.1136/gut.2003.029793
- Schoepfer, A.M., Schaffer, T., Seibold-Schmid, B., Müller, S., Seibold, F., 2008. Antibodies to flagellin indicate reactivity to bacterial antigens in IBS patients. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 20, 1110–1118. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01166.x
- Schönholzer, K.W., Sutton, R.A., Walker, V.R., Sossi, V., Schulzer, M., Orvig, C., Venczel, E., Johnson, R.R., Vetterli, D., Dittrich-Hannen, B., Kubik, P., Suter, M., 1997. Intestinal absorption of trace amounts of aluminium in rats studied with ²⁶aluminium and accelerator mass spectrometry. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 92, 379–383.
- Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H., 2013. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol. Res.* 69, 52–60. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.020
- Sekiguchi, F., Hasegawa, N., Inoshita, K., Yonezawa, D., Inoi, N., Kanke, T., Saito, N., Kawabata, A., 2006. Mechanisms for modulation of mouse gastrointestinal motility by proteinase-activated receptor (PAR)-1 and -2 in vitro. *Life Sci.* 78, 950–957. doi:10.1016/j.lfs.2005.06.035
- Sengupta, J.N., Snider, A., Su, X., Gebhart, G.F., 1999. Effects of kappa opioids in the inflamed rat colon. *Pain* 79, 175–185.
- Serra, J., Salvioli, B., Azpiroz, F., Malagelada, J.-R., 2002. Lipid-induced intestinal gas retention in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 123, 700–706.
- Sharma, P., Mishra, K.P., 2006. Aluminum-induced maternal and developmental toxicity and oxidative stress in rat brain: response to combined administration of Tiron and glutathione. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 21, 313–321. doi:10.1016/j.reprotox.2005.06.004
- Shen, W., Li, S., Chung, S.H., Zhu, L., Stayt, J., Su, T., Couraud, P.-O., Romero, I.A., Weksler, B., Gillies, M.C., 2011. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and claudin-5 is associated with TGF- β 1-induced permeability of centrally derived vascular endothelium. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 323–332. doi:10.1016/j.ejcb.2010.10.013
- Shinoda, M., Feng, B., Gebhart, G.F., 2009. Peripheral and central P2X receptor contributions to colon mechanosensitivity and hypersensitivity in the mouse. *Gastroenterology* 137, 2096–

2104. doi:10.1053/j.gastro.2009.06.048

Sim, M., Dick, R., Russo, J., Bernard, B., Grubb, P., Krieg, E., Mueller, C., McCammon, C., 1997. Are aluminium potroom workers at increased risk of neurological disorders? *Occup. Environ. Med.* 54, 229–235.

Simrén, M., Månsson, A., Langkilde, A.M., Svedlund, J., Abrahamsson, H., Bengtsson, U., Björnsson, E.S., 2001. Food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome. *Digestion* 63, 108–115. doi:51878

Simrén, M., Simms, L., D'Souza, D., Abrahamsson, H., Björnsson, E.S., 2003. Lipid-induced colonic hypersensitivity in irritable bowel syndrome: the role of 5-HT₃ receptors. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17, 279–287.

Sińczuk-Walczak, H., Szymczak, M., Raźniewska, G., Matczak, W., Szymczak, W., 2003. Effects of occupational exposure to aluminum on nervous system: clinical and electroencephalographic findings. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 16, 301–310.

Sjögren, B., Elinder, C.G., Lidums, V., Chang, G., 1988. Uptake and urinary excretion of aluminum among welders. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 60, 77–79.

Sjölund, K., Ekman, R., Lindgren, S., Rehfeld, J.F., 1996. Disturbed motilin and cholecystokinin release in the irritable bowel syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.* 31, 1110–1114.

Slavin, J.L., Brauer, P.M., Marlett, J.A., 1981. Neutral detergent fiber, hemicellulose and cellulose digestibility in human subjects. *J. Nutr.* 111, 287–297.

Song, B.K., Cho, K.O., Jo, Y., Oh, J.W., Kim, Y.S., 2012. Colon Transit Time According to Physical Activity Level in Adults. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 18, 64–69. doi:10.5056/jnm.2012.18.1.64

Song, X., Chen, B.N., Zagorodnyuk, V.P., Lynn, P.A., Blackshaw, L.A., Grundy, D., Brunsden, A.M., Costa, M., Brookes, S.J.H., 2009. Identification of medium/high-threshold extrinsic mechanosensitive afferent nerves to the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 137, 274–284, 284.e1. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.061

Spiegel, B.M.R., Farid, M., Esrailian, E., Talley, J., Chang, L., 2010. Is irritable bowel syndrome a diagnosis of exclusion?: a survey of primary care providers, gastroenterologists, and IBS experts. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 848–858. doi:10.1038/ajg.2010.47

Spiller, R., 2007. Recent advances in understanding the role of serotonin in gastrointestinal motility in functional bowel disorders: alterations in 5-HT signalling and metabolism in human disease. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 19 Suppl 2, 25–31. doi:10.1111/j.1365-2982.2007.00965.x

Spiller, R., Garsed, K., 2009. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 136, 1979–1988. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.074

Spiller, R.C., Jenkins, D., Thornley, J.P., Hebden, J.M., Wright, T., Skinner, M., Neal, K.R., 2000. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 47, 804–811.

Stahl, T., Taschan, H., Brunn, H., 2011. Aluminium content of selected foods and food products. *Environ. Sci. Eur.* 23, 37. doi:10.1186/2190-4715-23-37

Staudacher, H.M., Lomer, M.C.E., Anderson, J.L., Barrett, J.S., Muir, J.G., Irving, P.M., Whelan, K., 2012. Fermentable carbohydrate restriction reduces luminal bifidobacteria and

gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *J. Nutr.* 142, 1510–1518. doi:10.3945/jn.112.159285

Stead, R.H., Kosecka-Janiszewska, U., Oestreicher, A.B., Dixon, M.F., Bienenstock, J., 1991. Remodeling of B-50 (GAP-43)- and NSE-immunoreactive mucosal nerves in the intestines of rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 11, 3809–3821.

Stefanini, G.F., Saggioro, A., Alvisi, V., Angelini, G., Capurso, L., di Lorenzo, G., Dobrilla, G., Doderio, M., Galimberti, M., Gasbarrini, G., 1995. Oral cromolyn sodium in comparison with elimination diet in the irritable bowel syndrome, diarrheic type. Multicenter study of 428 patients. *Scand. J. Gastroenterol.* 30, 535–541. doi:10.3109/00365529509089786

Steinhagen, W.H., Cavender, F.L., Cockrell, B.Y., 1978. Six month inhalation exposures of rats and guinea pigs to aluminum chlorhydrate. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 1, 267–277.

Stivland, T., Camilleri, M., Vassallo, M., Proano, M., Rath, D., Brown, M., Thomforde, G., Pemberton, J., Phillips, S., 1991. Scintigraphic measurement of regional gut transit in idiopathic constipation. *Gastroenterology* 101, 107–115.

Stone, C.J., McLaurin, D.A., Steinhagen, W.H., Cavender, F.L., Haseman, J.K., 1979. Tissue deposition patterns after chronic inhalation exposures of rats and guinea pigs to aluminum chlorhydrate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 49, 71–76.

Storr, M., Gaffal, E., Saur, D., Schusdziarra, V., Allescher, H.D., 2002. Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80, 67–76.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A., 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819–829.

Sutherland, J.E., Greger, J.L., 1998. Effect of the size of an oral dose of aluminium on the relative importance of biliary v. urinary aluminium excretion in conscious rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 36, 505–512.

Takashima, Y., Daniels, R.L., Knowlton, W., Teng, J., Liman, E.R., McKemy, D.D., 2007. Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 14147–14157. doi:10.1523/JNEUROSCI.4578-07.2007

Talley, N.J., Weaver, A.L., Zinsmeister, A.R., Melton, L.J., 1992. Onset and disappearance of gastrointestinal symptoms and functional gastrointestinal disorders. *Am. J. Epidemiol.* 136, 165–177.

Tana, C., Umesaki, Y., Imaoka, A., Handa, T., Kanazawa, M., Fukudo, S., 2010. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 22, 512–519, e114–115. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01427.x

Tang, Y., Yang, W., Wang, Y.-L., Lin, L., 2012. Sex differences in the symptoms and psychological factors that influence quality of life in patients with irritable bowel syndrome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 702–707. doi:10.1097/MEG.0b013e328351b2c2

Tang, Y.-R., Yang, W.-W., Liang, M.-L., Xu, X.-Y., Wang, M.-F., Lin, L., 2012. Age-related symptom and life quality changes in women with irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol. WJG* 18, 7175–7183. doi:10.3748/wjg.v18.i48.7175

- Tassicker, B.C., Hennig, G.W., Costa, M., Brookes, S.J., 1999. Rapid anterograde and retrograde tracing from mesenteric nerve trunks to the guinea-pig small intestine in vitro. *Cell Tissue Res.* 295, 437–452.
- Taylor, G.A., Moore, P.B., Ferrier, I.N., Tyrer, S.P., Edwardson, J.A., 1998. Gastrointestinal absorption of aluminium and citrate in man. *J. Inorg. Biochem.* 69, 165–169.
- Terada, Y., Fujimura, M., Nishimura, S., Tsubota, M., Sekiguchi, F., Nishikawa, H., Kawabata, A., 2013. Contribution of TRPA1 as a downstream signal of proteinase-activated receptor-2 to pancreatic pain. *J. Pharmacol. Sci.* 123, 284–287.
- Teraoka, H., 1981. Distribution of 24 elements in the internal organs of normal males and the metallic workers in Japan. *Arch. Environ. Health* 36, 155–165.
- Theng, B.K.G., Yuan, G., 2008. Nanoparticles in the Soil Environment. *Elements* 4, 395–399. doi:10.2113/gselements.4.6.395
- Thériault, G., Tremblay, C., Cordier, S., Gingras, S., 1984. Bladder cancer in the aluminium industry. *Lancet Lond. Engl.* 1, 947–950.
- Thompson, W.G., Irvine, E.J., Pare, P., Ferrazzi, S., Rance, L., 2002. Functional gastrointestinal disorders in Canada: first population-based survey using Rome II criteria with suggestions for improving the questionnaire. *Dig. Dis. Sci.* 47, 225–235.
- Thomson, S.M., Burnett, D.C., Bergmann, J.D., Hixson, C.J., 1986. Comparative inhalation hazards of aluminum and brass powders using bronchopulmonary lavage as an indicator of lung damage. *J. Appl. Toxicol. JAT* 6, 197–209.
- Thomson, W.G., Doleval, G., Drossman, D.A., Heaton, W., 1989. Irritable bowel syndrome; A guideline for diagnosis. *Gastroenterol Int* 2, 92–5.
- Toda, S., Yase, Y., 1998. Effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation and protein oxidative modification of mouse brain homogenate. *Biol. Trace Elem. Res.* 61, 207–217. doi:10.1007/BF02784031
- Tomlinson, H., 1967. ALUMINIUM UTENSILS AND DISEASE The Dangers Inherent In the Widespread Use of the Metal, L.N.Fowler. ed.
- Tooth, D., Garsed, K., Singh, G., Marciani, L., Lam, C., Fordham, I., Fields, A., Banwait, R., Lingaya, M., Layfield, R., Hastings, M., Whorwell, P., Spiller, R., 2014. Characterisation of faecal protease activity in irritable bowel syndrome with diarrhoea: origin and effect of gut transit. *Gut* 63, 753–760. doi:10.1136/gutjnl-2012-304042
- Tsung Min Kuo, J.F.V., 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *J Agric Food Chem* 36: 32-36. *J. Agric. Food Chem.* 36. doi:10.1021/jf00079a008
- Turnbull, A.V., Rivier, C., 1997. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 215, 1–10.
- USGS, U. states G. survey, 2015. Aluminum. *Miner. Commod. Summ.* 16–17.
- Valdez-Morales, E.E., Overington, J., Guerrero-Alba, R., Ochoa-Cortes, F., Ibeakanma, C.O., Spreadbury, I., Bunnett, N.W., Beyak, M., Vanner, S.J., 2013. Sensitization of peripheral sensory nerves by mediators from colonic biopsies of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome patients: a role for PAR2. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 1634–1643. doi:10.1038/ajg.2013.241
- van den Wijngaard, R.M., Welting, O., Bulmer, D.C., Wouters, M.M., Lee, K., de Jonge, W.J.,

- Boeckxstaens, G.E., 2009. Possible role for TRPV1 in neomycin-induced inhibition of visceral hypersensitivity in rat. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 21, 863–e60. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01287.x
- van der Schaar, P.J., van Hoboken, E., Ludidi, S., Masclee, A. a. M., 2013. Effect of cholecystokinin on rectal motor and sensory function in patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *Colorectal Dis.* 15, e29–e34. doi:10.1111/codi.12034
- Van Kerkhoven, L. a. S., Laheij, R.J.F., Jansen, J.B.M.J., 2007. Meta-analysis: a functional polymorphism in the gene encoding for activity of the serotonin transporter protein is not associated with the irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26, 979–986. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03453.x
- van Loo, J., Coussement, P., de Leenheer, L., Hoebregs, H., Smits, G., 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 525–552. doi:10.1080/10408399509527714
- Vanner, S., Surprenant, A., 1996. Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am. J. Physiol.* 271, G223–230.
- Vassallo, M.J., Camilleri, M., Phillips, S.F., Steadman, C.J., Talley, N.J., Hanson, R.B., Haddad, A.C., 1992. Colonic tone and motility in patients with irritable bowel syndrome. *Mayo Clin. Proc.* 67, 725–731.
- Vazquez-Roque, M.I., Camilleri, M., Smyrk, T., Murray, J.A., Marietta, E., O'Neill, J., Carlson, P., Lamsam, J., Janzow, D., Eckert, D., Burton, D., Zinsmeister, A.R., 2013. A controlled trial of gluten-free diet in patients with irritable bowel syndrome-diarrhea: effects on bowel frequency and intestinal function. *Gastroenterology* 144, 903–911.e3. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.049
- Venkatachalam, K., Montell, C., 2007. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
- Verdier, F., Burnett, R., Michelet-Habchi, C., Moretto, P., Fievet-Groyne, F., Sauzeat, E., 2005. Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the *Cynomolgus* monkey. *Vaccine* 23, 1359–1367. doi:10.1016/j.vaccine.2004.09.012
- Verdú, E.F., Bercik, P., Verma-Gandhu, M., Huang, X.-X., Blennerhassett, P., Jackson, W., Mao, Y., Wang, L., Rochat, F., Collins, S.M., 2006. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut* 55, 182–190. doi:10.1136/gut.2005.066100
- Vergnolle, N., 2010. Visceral afferents: what role in post-inflammatory pain? *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 153, 79–83. doi:10.1016/j.autneu.2009.07.015
- Vergnolle, N., 2009. Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol. Ther.* 123, 292–309. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.05.004
- Vergnolle, N., 2005. Clinical relevance of proteinase activated receptors (PARs) in the gut. *Gut* 54, 867–874. doi:10.1136/gut.2004.048876
- Vergnolle, N., 2004. Modulation of visceral pain and inflammation by protease-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* 141, 1264–1274. doi:10.1038/sj.bjp.0705750
- Vergnolle, N., Wallace, J.L., Bunnett, N.W., Hollenberg, M.D., 2001. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 146–152.
- Verne, G.N., Sen, A., Price, D.D., 2005. Intrarectal lidocaine is an effective treatment for

- abdominal pain associated with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 6, 493–496. doi:10.1016/j.jpain.2005.02.009
- Verstraeten, S.V., Golub, M.S., Keen, C.L., Oteiza, P.I., 1997a. Myelin is a preferential target of aluminum-mediated oxidative damage. *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 289–294. doi:10.1006/abbi.1997.0146
- Verstraeten, S.V., Nogueira, L.V., Schreier, S., Oteiza, P.I., 1997b. Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: role in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 338, 121–127. doi:10.1006/abbi.1996.9810
- Vilceanu, D., Stucky, C.L., 2010. TRPA1 mediates mechanical currents in the plasma membrane of mouse sensory neurons. *PloS One* 5, e12177. doi:10.1371/journal.pone.0012177
- Virk, S.A., Eslick, G.D., 2015a. Aluminum Levels in Brain, Serum, and Cerebrospinal Fluid are Higher in Alzheimer’s Disease Cases than in Controls: A Series of Meta-Analyses. *J. Alzheimers Dis. JAD* 47, 629–638. doi:10.3233/JAD-150193
- Virk, S.A., Eslick, G.D., 2015b. Occupational Exposure to Aluminum and Alzheimer Disease: A Meta-Analysis. *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 57, 893–896. doi:10.1097/JOM.0000000000000487
- Virk, S.A., Eslick, G.D., 2015c. Brief Report: Meta-analysis of Antacid Use and Alzheimer’s Disease: Implications for the Aluminum Hypothesis. *Epidemiol. Camb. Mass* 26, 769–773. doi:10.1097/EDE.0000000000000326
- Vivinus-Nébot, M., Frin-Mathy, G., Bziouche, H., Dainese, R., Bernard, G., Anty, R., Filippi, J., Saint-Paul, M.C., Tulic, M.K., Verhasselt, V., Hébuterne, X., Piche, T., 2014. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut* 63, 744–752. doi:10.1136/gutjnl-2012-304066
- Vu, T.K., Wheaton, V.I., Hung, D.T., Charo, I., Coughlin, S.R., 1991. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 353, 674–677. doi:10.1038/353674a0
- Wada, K., 1987. Minerals formed and mineral formation from volcanic ash by weathering. *Chem. Geol., Proceedings of an International Seminar on Laterite* 60, 17–28. doi:10.1016/0009-2541(87)90106-9
- Waehrens, R., Ohlsson, H., Sundquist, J., Sundquist, K., Zöller, B., 2015. Risk of irritable bowel syndrome in first-degree, second-degree and third-degree relatives of affected individuals: a nationwide family study in Sweden. *Gut* 64, 215–221. doi:10.1136/gutjnl-2013-305705
- Walton, J.R., 2010. Evidence for participation of aluminum in neurofibrillary tangle formation and growth in Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 22, 65–72. doi:10.3233/JAD-2010-100486
- Wang, J., Sjöberg, S., Tia, V., Secco, B., Chen, H., Yang, M., Sukhova, G.K., Shi, G.-P., 2013. Pharmaceutical stabilization of mast cells attenuates experimental atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Atherosclerosis* 229, 304–309. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.025
- Wang, J., Zhang, X., Cao, B., Liu, J., Li, Y., 2015. Facilitation of synaptic transmission in the anterior cingulate cortex in viscerally hypersensitive rats. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 25, 859–868. doi:10.1093/cercor/bht273
- Wang, L.-H., Fang, X.-C., Pan, G.-Z., 2004. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 53, 1096–1101. doi:10.1136/gut.2003.021154

- Wang, S.-H., Dong, L., Luo, J.-Y., Gong, J., Li, L., Lu, X.-L., Han, S.-P., 2007. Decreased expression of serotonin in the jejunum and increased numbers of mast cells in the terminal ileum in patients with irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* 13, 6041–6047.
- Wedrychowski, A., Schmidt, W.N., Hnilica, L.S., 1986. The in vivo cross-linking of proteins and DNA by heavy metals. *J. Biol. Chem.* 261, 3370–3376.
- Weinbruch, S., Benker, N., Koch, W., Ebert, M., Drabløs, P.A., Skaugset, N.P., Ellingsen, D.G., Thomassen, Y., 2010. Hygroscopic properties of the workroom aerosol in aluminium smelter potrooms: a case for transport of HF and SO₂ into the lower airways. *J. Environ. Monit. JEM* 12, 448–454. doi:10.1039/b919142a
- Welgan, P., Meshkinpour, H., Beeler, M., 1988. Effect of anger on colon motor and myoelectric activity in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 94, 1150–1156.
- Westberg, H.B., Seldén, A.I., Bellander, T., 2001. Exposure to chemical agents in Swedish aluminum foundries and aluminum remelting plants--a comprehensive survey. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 16, 66–77. doi:10.1080/104732201456140
- Weston, A.P., Biddle, W.L., Bhatia, P.S., Miner, P.B., 1993. Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* 38, 1590–1595.
- Wettstein, A., Aeppli, J., Gautschi, K., Peters, M., 1991. Failure to find a relationship between mnestic skills of octogenarians and aluminum in drinking water. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 63, 97–103.
- White, A.M., Stevens, W.H., Upton, A.R., O’Byrne, P.M., Collins, S.M., 1991. Airway responsiveness to inhaled methacholine in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 100, 68–74.
- Whitehead, W.E., Engel, B.T., Schuster, M.M., 1980. Irritable bowel syndrome: physiological and psychological differences between diarrhea-predominant and constipation-predominant patients. *Dig. Dis. Sci.* 25, 404–413.
- WHO, E.C. on B.S., 2011. Fifty-seventh report [WWW Document]. URL http://www.who.int/biologicals/WHO_TRS_962.pdf (accessed 9.10.15).
- Wiesmüller, G.A., Ebel, H., Hornberg, C., Kwan, O., Friel, J., 2003. Are syndromes in environmental medicine variants of somatoform disorders? *Med. Hypotheses* 61, 419–430.
- Wilcz-Villega, E.M., McClean, S., O’Sullivan, M.A., 2013. Mast cell tryptase reduces junctional adhesion molecule-A (JAM-A) expression in intestinal epithelial cells: implications for the mechanisms of barrier dysfunction in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 1140–1151. doi:10.1038/ajg.2013.92
- Wills, M., Savory, J., 1983. ALUMINIUM POISONING: DIALYSIS ENCEPHALOPATHY, OSTEOMALACIA, AND ANAEMIA. *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 8340 322, 29–34. doi:10.1016/S0140-6736(83)90014-4
- Wilson, S., Roberts, L., Roalfe, A., Bridge, P., Singh, S., 2004. Prevalence of irritable bowel syndrome: a community survey. *Br. J. Gen. Pract. J. R. Coll. Gen. Pract.* 54, 495–502.
- Wong, B.S., Camilleri, M., Busciglio, I., Carlson, P., Szarka, L.A., Burton, D., Zinsmeister, A.R., 2011. Pharmacogenetic trial of a cannabinoid agonist shows reduced fasting colonic motility in patients with nonconstipated irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 141, 1638–1647–7. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.036
- Wood, J.N., 2004. Recent advances in understanding molecular mechanisms of primary afferent activation. *Gut* 53 Suppl 2, ii9–12.

- Woodson, G.C., 1998. An interesting case of osteomalacia due to antacid use associated with stainable bone aluminum in a patient with normal renal function. *Bone* 22, 695–698.
- Wouters, M.M., Lambrechts, D., Knapp, M., Cleynen, I., Whorwell, P., Agréus, L., Dlugosz, A., Schmidt, P.T., Halfvarson, J., Simrén, M., Ohlsson, B., Karling, P., Van Wanrooy, S., Mondelaers, S., Vermeire, S., Lindberg, G., Spiller, R., Dukes, G., D'Amato, M., Boeckxstaens, G., 2014. Genetic variants in CDC42 and NXP1 as susceptibility factors for constipation and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome. *Gut* 63, 1103–1111. doi:10.1136/gutjnl-2013-304570
- Wouters, M.M., Vicario, M., Santos, J., 2016. The role of mast cells in functional GI disorders. *Gut* 65, 155–168. doi:10.1136/gutjnl-2015-309151
- Wu, L.-J., Sweet, T.-B., Clapham, D.E., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.* 62, 381–404. doi:10.1124/pr.110.002725
- Wu, X., Li, J., Hu, J.-N., Deng, Z.-Y., 2012. The effects of glutamate and citrate on absorption and distribution of aluminum in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 148, 83–90. doi:10.1007/s12011-012-9345-5
- Xing, H., Ling, J.X., Chen, M., Johnson, R.D., Tominaga, M., Wang, C.-Y., Gu, J., 2008. TRPM8 mechanism of autonomic nerve response to cold in respiratory airway. *Mol. Pain* 4, 22. doi:10.1186/1744-8069-4-22
- Xu, G.-Y., Shenoy, M., Winston, J.H., Mittal, S., Pasricha, P.J., 2008. P2X receptor-mediated visceral hyperalgesia in a rat model of chronic visceral hypersensitivity. *Gut* 57, 1230–1237. doi:10.1136/gut.2007.134221
- Yanagishita, T., Tamada, Y., Ohshima, Y., Ito, K., Akita, Y., Watanabe, D., 2012. Histological localization of aluminum in topical aluminum chloride treatment for palmar hyperhidrosis. *J. Dermatol. Sci.* 67, 69–71. doi:10.1016/j.jdermsci.2012.02.016
- Yang, J., Deng, Y., Chu, H., Cong, Y., Zhao, J., Pohl, D., Misselwitz, B., Fried, M., Dai, N., Fox, M., 2013. Prevalence and presentation of lactose intolerance and effects on dairy product intake in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 11, 262–268.e1. doi:10.1016/j.cgh.2012.11.034
- Yang, M., Jiang, L., Huang, H., Zeng, S., Qiu, F., Yu, M., Li, X., Wei, S., 2014. Dietary exposure to aluminium and health risk assessment in the residents of Shenzhen, China. *PloS One* 9, e89715. doi:10.1371/journal.pone.0089715
- Yao, C.K., Tan, H.-L., van Langenberg, D.R., Barrett, J.S., Rose, R., Liels, K., Gibson, P.R., Muir, J.G., 2014. Dietary sorbitol and mannitol: food content and distinct absorption patterns between healthy individuals and patients with irritable bowel syndrome. *J. Hum. Nutr. Diet. Off. J. Br. Diet. Assoc.* 27 Suppl 2, 263–275. doi:10.1111/jhn.12144
- Ye, L., Kleiner, S., Wu, J., Sah, R., Gupta, R.K., Banks, A.S., Cohen, P., Khandekar, M.J., Boström, P., Mepani, R.J., Laznik, D., Kamenecka, T.M., Song, X., Liedtke, W., Mootha, V.K., Puigserver, P., Griffin, P.R., Clapham, D.E., Spiegelman, B.M., 2012. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell* 151, 96–110. doi:10.1016/j.cell.2012.08.034
- Yiangou, Y., Facer, P., Chessell, I.P., Bountra, C., Chan, C., Fertleman, C., Smith, V., Anand, P., 2007. Voltage-gated ion channel Nav1.7 innervation in patients with idiopathic rectal hypersensitivity and paroxysmal extreme pain disorder (familial rectal pain). *Neurosci. Lett.*

427, 77–82. doi:10.1016/j.neulet.2007.09.027

Yokel, R.A., 2000. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology* 21, 813–828.

Yokel, R.A., 1985. Toxicity of gestational aluminum exposure to the maternal rabbit and offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 79, 121–133.

Yokel, R.A., Florence, R.L., 2006. Aluminum bioavailability from the approved food additive leavening agent acidic sodium aluminum phosphate, incorporated into a baked good, is lower than from water. *Toxicology* 227, 86–93. doi:10.1016/j.tox.2006.07.014

Yokel, R.A., McNamara, P.J., 2001. Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 159–167.

Yokel, R.A., McNamara, P.J., 1989. Elevated aluminum persists in serum and tissues of rabbits after a six-hour infusion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99, 133–138.

Yoshida, N., Isozaki, Y., Takagi, T., Takenaka, S., Uchikawa, R., Arizono, N., Yoshikawa, T., Okanoue, T., 2006. Review article: anti-tryptase therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24, 249–255. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.00053.x

Yoshida, S., Gershwin, M.E., Keen, C.L., Donald, J.M., Golub, M.S., 1989. The influence of aluminum on resistance to *listeria monocytogenes* in Swiss-Webster mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89, 404–409.

Young, E., Stoneham, M.D., Petruckevitch, A., Barton, J., Rona, R., 1994. A population study of food intolerance. *Lancet Lond. Engl.* 343, 1127–1130.

Young, V.B., Schmidt, T.M., 2008. Overview of the gastrointestinal microbiota. *Adv. Exp. Med. Biol.* 635, 29–40. doi:10.1007/978-0-387-09550-9_3

Yu, S., Undem, B.J., Kollarik, M., 2005. Vagal afferent nerves with nociceptive properties in guinea-pig oesophagus. *J. Physiol.* 563, 831–842. doi:10.1113/jphysiol.2004.079574

Yuan, B., Klein, M.H., Contiguglia, R.S., Mishell, J.L., Seligman, P.A., Miller, N.L., Molitoris, B.A., Alfrey, A.C., Shapiro, J.I., 1989. The role of aluminum in the pathogenesis of anemia in an outpatient hemodialysis population. *Ren. Fail.* 11, 91–96.

Yuan, C.-Y., Lee, Y.-J., Hsu, G.-S.W., 2012. Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *J. Biomed. Sci.* 19, 51. doi:10.1186/1423-0127-19-51

Yuan, J., Kang, C., Wang, M., Wang, Q., Li, P., Liu, H., Hou, Y., Su, P., Yang, F., Wei, Y., Yang, J., 2014. Association study of serotonin transporter SLC6A4 gene with Chinese Han irritable bowel syndrome. *PloS One* 9, e84414. doi:10.1371/journal.pone.0084414

Yuan, Y.-Z., Tao, R.-J., Xu, B., Sun, J., Chen, K.-M., Miao, F., Zhang, Z.-W., Xu, J.-Y., 2003. Functional brain imaging in irritable bowel syndrome with rectal balloon-distention by using fMRI. *World J. Gastroenterol. WJG* 9, 1356–1360.

Yumoto, S., Kakimi, S., Ohsaki, A., Ishikawa, A., 2009. Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Inorg. Biochem.* 103, 1579–1584. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.07.023

Zafar, T.A., Weaver, C.M., Martin, B.R., Flarend, R., Elmore, D., 1997. Aluminum (26Al) metabolism in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 216, 81–85.

Zakharian, E., Cao, C., Rohacs, T., 2010. Gating of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels activated by cold and chemical agonists in planar lipid bilayers. *J. Neurosci.*

Off. J. Soc. Neurosci. 30, 12526–12534. doi:10.1523/JNEUROSCI.3189-10.2010

Zarling, E.J., Ruchim, M.A., 1987. Protein origin of the volatile fatty acids isobutyrate and isovalerate in human stool. *J. Lab. Clin. Med.* 109, 566–570.

Zatta, P., Favarato, M., Nicolini, M., 1993. Deposition of aluminum in brain tissues of rats exposed to inhalation of aluminum acetylacetonate. *Neuroreport* 4, 1119–1122.

Zeng, J., Li, Y.-Q., Zuo, X.-L., Zhen, Y.-B., Yang, J., Liu, C.-H., 2008. Clinical trial: effect of active lactic acid bacteria on mucosal barrier function in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 28, 994–1002. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03818.x

Zhang, M., Leung, F.-P., Huang, Y., Bian, Z.-X., 2010. Increased colonic motility in a rat model of irritable bowel syndrome is associated with up-regulation of L-type calcium channels in colonic smooth muscle cells. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 22, e162-170. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01467.x

Zhang, Z.-J., Qian, Y.-H., Hu, H.-T., Yang, J., Yang, G.-D., 2003. The herbal medicine *Dipsacus asper* wall extract reduces the cognitive deficits and overexpression of beta-amyloid protein induced by aluminum exposure. *Life Sci.* 73, 2443–2454.

Zhao, A., Shea-Donohue, T., 2003. PAR-2 agonists induce contraction of murine small intestine through neurokinin receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G696-703. doi:10.1152/ajpgi.00064.2003

Zhao, J., Dong, L., Shi, H., Wang, Z., Shi, H., Ding, H., 2012. The expression of protease-activated receptor 2 and 4 in the colon of irritable bowel syndrome patients. *Dig. Dis. Sci.* 57, 58–64. doi:10.1007/s10620-011-1827-3

Zhou, Q., Souba, W.W., Croce, C.M., Verne, G.N., 2010. MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 59, 775–784. doi:10.1136/gut.2009.181834

Zhou, Q., Verne, G.N., 2011. New insights into visceral hypersensitivity--clinical implications in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 349–355. doi:10.1038/nrgastro.2011.83

Zhou, Q., Zhang, B., Verne, G.N., 2009. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* 146, 41–46. doi:10.1016/j.pain.2009.06.017

Zhou, Y., Yokel, R.A., 2005. The chemical species of aluminum influences its paracellular flux across and uptake into Caco-2 cells, a model of gastrointestinal absorption. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 87, 15–26. doi:10.1093/toxsci/kfi216

Zhu, F.-C., Wang, H., Fang, H.-H., Yang, J.G., Lin, X.J., Liang, X.-F., Zhang, X.-F., Pan, H.-X., Meng, F.-Y., Hu, Y.M., Liu, W.-D., Li, C.-G., Li, W., Zhang, X., Hu, J.M., Peng, W.B., Yang, B.P., Xi, P., Wang, H.-Q., Zheng, J.-S., 2009. A Novel Influenza A (H1N1) Vaccine in Various Age Groups. *N. Engl. J. Med.* 361, 2414–2423. doi:10.1056/NEJMoa0908535

Zucchelli, M., Camilleri, M., Andreasson, A.N., Bresso, F., Dlugosz, A., Halfvarson, J., Törkvist, L., Schmidt, P.T., Karling, P., Ohlsson, B., Duerr, R.H., Simren, M., Lindberg, G., Agreus, L., Carlson, P., Zinsmeister, A.R., D'Amato, M., 2011. Association of TNFSF15 polymorphism with irritable bowel syndrome. *Gut* 60, 1671–1677. doi:10.1136/gut.2011.241877