



HAL
open science

Influence de la fermentation intestinale sur le risque d'accident de désaturation

Sébastien De Maistre

► **To cite this version:**

Sébastien De Maistre. Influence de la fermentation intestinale sur le risque d'accident de désaturation. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1259 . tel-01515690

HAL Id: tel-01515690

<https://theses.hal.science/tel-01515690>

Submitted on 28 Apr 2017

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.



N°d'ordre NNT :

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, biologie, santé
Discipline : Physiologie intégrée et conditions extrêmes

Soutenue publiquement le 14/12/2016, par :
Sébastien de Maistre

Influence de la fermentation intestinale sur le risque d'accident de désaturation

Devant le jury composé de :

Pr VAN COPPENOLLE, Fabien	Université Claude Bernard Lyon1	Président
Dr GARDETTE, Bernard	COMEX SA, Marseille	Rapporteur
Dr RICHARD, Simone	Université du Sud, Toulon-Var	Rapporteure
Dr RISSO, Jean-Jacques	IRBA – ERRSO, Toulon	Examinateur
Dr AMERAND, Aline	Université de Bretagne, Brest	Examinatrice
Pr DUCHAMP, Claude	Université Claude Bernard Lyon1	Directeur de thèse
Pr BLATTEAU, Jean-Eric	HIA Sainte Anne, Toulon	Co-directeur de thèse



N°d'ordre NNT :

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie, biologie, santé
Discipline : Physiologie intégrée et conditions extrêmes

Soutenue publiquement le 14/12/2016, par :
Sébastien de Maistre

Influence de la fermentation intestinale sur le risque d'accident de désaturation

Devant le jury composé de :

Pr VAN COPPENOLLE, Fabien	Université Claude Bernard Lyon1	Président
Dr GARDETTE, Bernard	COMEX SA, Marseille	Rapporteur
Dr RICHARD, Simone	Université du Sud, Toulon-Var	Rapporteuse
Dr RISSO, Jean-Jacques	IRBA – ERRSO, Toulon	Examinateur
Dr AMERAND, Aline	Université de Bretagne, Brest	Examinatrice
Pr DUCHAMP, Claude	Université Claude Bernard Lyon1	Directeur de thèse
Pr BLATTEAU, Jean-Eric	HIA Sainte Anne, Toulon	Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

A notre Président de Thèse,

Monsieur le Professeur Fabien VAN COPPENOLLE

Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Nous avons été sensibles à vos conseils et discussions tout au long de cette entreprise.
Veuillez recevoir l'expression de nos vifs remerciements et de notre profond respect.

A notre Directeur de Thèse,

Monsieur le Professeur Claude DUCHAMP

Vous nous faites l'honneur d'avoir accepté d'être notre Directeur de thèse.
Vous nous avez fait confiance tout au long de ces trois dernières années.
Veuillez recevoir l'expression de notre gratitude pour votre accueil et votre aide dans la
réalisation de ce travail.

A notre Co-directeur,

Monsieur le Professeur Jean-Eric BLATTEAU

Vous êtes à l'origine de mon intégration au sein de la famille des « médecin de la plongée ».
Après avoir dirigé ma thèse de médecine il y a plus de dix ans, vous avez accepté sans
hésitation de vous relancer dans l'aventure pour cette thèse de science.
Veuillez trouver dans ce travail l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre jury,

Monsieur le Docteur Bernard GARDETTE (Rapporteur)

Vous avez accepté de juger ce travail et de nous faire partager vos connaissances.
Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération.

Madame le Docteur Simone RICHARD (Rapporteure)

Vous avez accepté de siéger parmi nos juges.
Nous sommes sensibles à l'intérêt que vous avez porté à notre travail.
Soyez en ici sincèrement remercié.

Monsieur le Docteur Jean-Jacques RISSO

Nous avons eu la chance de pouvoir bénéficier de votre expérience, vous remercions pour
votre amabilité et votre disponibilité.
Veuillez recevoir l'expression de notre sincère gratitude.

Madame le Docteur Aline AMERAND

Vous nous avez fait l'honneur d'apporter vos compétences à la critique de ce travail.
Veuillez recevoir l'expression de notre sincère gratitude.

à Armelle, ma compagne

à Ludivine, ma fille

à mes parents

à ma famille

à tous mes amis

A l'ensemble des personnels de l'Equipe Résidente de Recherche Subaquatique
Opérationnelle qui m'ont accueilli dans leurs locaux ces trois dernières années.

A l'ensemble des personnels, plongeurs, infirmiers, médecins ayant participé à nos études au
sein du centre hyperbare de l'HIA Sainte-Anne et du centre de plongée Espace Mer à Giens.

TITRE

Influence de la fermentation intestinale sur le risque d'accident de désaturation

RESUME

L'accident de désaturation (ADD) est un accident de plongée lié à la charge en gaz diluants pendant la plongée, et à la formation de bulles dans l'organisme au cours de la décompression. Il est susceptible d'engendrer des séquelles neurologiques. Au cours de plongées utilisant l'hydrogène comme gaz diluant, la diminution de la charge tissulaire en hydrogène par l'inoculation au niveau de l'intestin de bactéries métabolisant ce gaz réduit le risque d'ADD.

L'objectif de ce travail était d'évaluer si inversement : 1) la fermentation intestinale lors de la plongée peut favoriser la survenue d'un ADD, par l'intermédiaire de la production d'hydrogène endogène ; 2) la stimulation chronique de la fermentation avant plongée majore le risque d'ADD.

Nos résultats sont en faveur d'un effet dual de la fermentation intestinale sur la décompression. Délétère à court terme lors de la plongée, la fermentation intestinale prolongée pourrait être favorable en dehors de la plongée en prévenant la survenue et la sévérité d'un ADD. L'hydrogène, molécule aux propriétés antioxydantes, et le butyrate, un acide gras à chaîne courte, sont en effet deux produits de la fermentation des hydrates de carbone qui ont des vertus neuroprotectrices.

La prévention des accidents de désaturation pourrait passer par une exclusion des plongeurs présentant une fermentation importante le jour de la plongée, une élimination des gaz produits au niveau de l'intestin ou une modification de l'alimentation dans les 24 heures précédant une plongée. En revanche, tous les facteurs susceptibles de modifier le microbiote intestinal et d'augmenter la fermentation, en dehors de la plongée, pourraient être testés en prévention de l'ADD. En outre, l'hydrogène et le butyrate pourraient jouer un rôle bénéfique dans le cadre du traitement de l'ADD.

MOTS-CLES : accident de désaturation, microbiote intestinal, fermentation, transit intestinal, hydrogène, butyrate.

TITLE**Influence of gut fermentation on the risk of decompression sickness**

ABSTRACT

Decompression sickness (DCS) is a diving accident related to the dissolution of diluent gas in blood and tissues during a dive, followed by bubble formation in the body during decompression. It can lead to neurological damage. In dives using hydrogen as the diluent gas, the concentration of hydrogen in the tissues can be reduced by the presence in the gut of bacteria capable of metabolising this gas and this reduces the risk of DCS.

The aim of this work was conversely to check if: 1) fermentation in the gut at the time of diving could exacerbate DCS as a result of endogenous hydrogen generation; 2) long-term stimulation of fermentation before diving raises the risk of DCS.

Our findings point to a two-edged effect of intestinal fermentation on decompression: although deleterious in the short term, i.e. at the time of diving, longer-term intestinal fermentation between dives might have a positive effect by preventing the occurrence of DCS and limiting its severity. Indeed, hydrogen which has antioxidant properties and butyrate, a short-chain fatty acid, are both by-products of the fermentation of carbohydrate and both have neuroprotective activity.

DCS prevention could be promoted by excluding divers exhibiting strong fermentation on the day of a dive, by the elimination of gases being produced in gut or by modification of diet in the 24 hours before a dive. On the other hand, any factor that might affect the gut microbiota and stimulate fermentation between dives could be tested to investigate its potential in protecting against DCS. Furthermore, hydrogen and butyrate could play a positive role when it comes to treating DCS.

KEY WORDS: decompression sickness, gut microbiota, fermentation, gut transit, hydrogen, butyrate.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Remerciements	3
RESUME	6
ABSTRACT	7
Sommaire	8
Les unités de pression	16
Légendes des tableaux et figures.....	17
Liste des abréviations et acronymes	20
Introduction	21
Rappels	24
1 Formes cliniques des accidents de désaturation	24
1.1 Accidents neurologiques médullaires	24
1.2 Accidents cérébraux	25
1.3 Accidents labyrinthiques	26
1.4 Accidents cutanés	26
1.5 Accidents ostéoarticulaires	26
1.6 Malaise général	27
1.7 Accidents respiratoires	27
2 Facteurs favorisant d'accidents de désaturation (de Maistre 2004).....	27
2.1 La plongée	27
2.1.1 Les plongées répétitives	27
2.1.2 La plongée à « profil inversé ».....	28
2.1.3 L'effort en plongée.....	28
2.1.4 Le froid	28
2.2 Après la plongée	29
2.2.1 L'effort	29
2.2.2 L'ascension en altitude suivant la plongée.....	29
2.2.3 Le froid	30
2.3 Le plongeur.....	30

2.3.1	Le pourcentage de masse grasse.....	30
2.3.2	L'âge.....	30
2.3.3	L'antécédent d'accident de désaturation	31
2.3.4	La déshydratation	31
2.3.5	Le sexe.....	31
2.3.6	La condition physique	32
3	La fermentation intestinale chez l'homme	32
3.1	Substrats disponibles pour le microbiote colique	33
3.1.1	Substrats exogènes	33
3.1.2	Substrats endogènes	33
3.2	Métabolisme des glucides.....	35
3.2.1	Chaîne trophique de fermentation des glucides	35
3.2.2	Fermentation des glucides.....	35
3.3	Métabolisme des protéines	38
3.3.1	Protéolyse	38
3.3.2	Métabolisme des peptides et des acides aminés.....	40
4	Causes de variabilité de la fermentation intestinale	41
4.1	Composition de l'alimentation	41
4.2	Pathologies intestinales et fermentation	42
4.2.1	Malabsorption des glucides.....	42
4.2.2	Syndrome du grêle court	43
4.2.3	Pullulation microbienne intestinale.....	43
4.2.4	Syndrome de l'intestin irritable.....	43
4.2.5	Symptômes liés aux gaz	44
4.3	Médicaments et fermentation	44
4.4	Transit intestinal et fermentation.....	44
5	Origine des gaz intestinaux chez l'homme.....	45

5.1	Entrée et production de gaz dans l'intestin.....	45
5.2	Gaz produits par la fermentation intestinale.....	46
5.2.1	Composition du microbiote intestinal	46
	Figure 7 : Origine et devenir des gaz dans le côlon. (d'après Azpiroz 2004).....	47
5.2.2	Substrats à l'origine des gaz.....	48
6	Facteurs de contrôle du microbiote intestinal	49
6.1	Facteurs alimentaires	49
6.2	Modulateurs du transit intestinal	50
6.3	Antibiotiques	51
6.4	Probiotiques.....	51
6.4.1	Définitions.....	51
6.4.2	Composition	52
6.4.3	Pharmacocinétique	52
6.4.4	Modes d'action démontrés ou supposés des probiotiques	53
6.5	Prébiotiques et symbiotiques	54
6.5.1	Définitions, composition	54
6.5.2	Modes d'action démontrés ou supposés des prébiotiques.....	55
6.5.3	Effets indésirables observés ou théoriques des prébiotiques	56
7	Naissance des bulles.....	58
7.1	Les phénomènes de sursaturation – désaturation	59
7.1.1	La sursaturation (Méliet 2002).....	59
7.1.2	La désaturation	60
7.1.3	Formation des bulles par sursaturation : une théorie insuffisante.....	60
7.2	Recherche in vivo des noyaux gazeux.....	61
7.2.1	Taille des microbulles détectables in vivo	61
7.2.2	Localisation des noyaux gazeux.....	62

7.3	Mécanismes de formation des noyaux gazeux	62
7.4	Dissolution des noyaux gazeux	62
7.5	Persistance des noyaux gazeux.....	63
7.5.1	Hypothèse d'un mécanisme de stabilisation des noyaux gazeux	63
7.5.2	Théorie de l'équilibre dynamique (Powell et coll. 1992).....	63
7.6	Evolution du noyau gazeux vers la bulle circulante	64
7.6.1	Croissance (Harvey 1951, Ishiyama 1983)	64
7.6.2	Coalescence (Hills 1977)	65
7.6.3	Théorie d'évolution du noyau gazeux à la bulle (Hennessy 2002)	65
8	Accident bullaire initial	67
9	Aspects microcirculatoires de la maladie de la décompression	68
9.1	Interactions bulles-paroi	68
9.1.1	Mise à nu de la lame basale.....	68
9.1.2	Activation des cellules endothéliales	69
9.2	Interactions bulles-plasma	69
9.3	Interactions avec les éléments figurés du sang.....	69
9.3.1	Les plaquettes	69
9.3.2	Les leucocytes	70
9.3.3	Les hématies	70
9.3.4	Mise en jeu du système immunitaire.....	70
9.4	Conséquences microcirculatoires de la maladie de la décompression	70
9.4.1	Constriction des fibres musculaires lisses artériolaires et précapillaires	70
9.4.2	Constriction des fibres musculaires lisses postcapillaires.....	71
9.4.3	Cas particulier de la circulation pulmonaire.....	71
	Matériels et outils méthodologiques	73
1	Population d'étude.....	73
1.1	Etudes animales	73

1.2	Etude chez l'homme	73
2	Protocole de plongées expérimentales des rats	74
3	Exploration de la fermentation intestinale	75
3.1	Mesure de l'hydrogène dans l'air expiré	75
3.1.1	Etudes animales	75
	Figure 11 : Profil de plongée expérimentale utilisé chez les rats	76
	Figure 12 : Principe du test respiratoire à l'hydrogène. (d'après Azpiroz 2004)	77
3.1.2	Etude chez l'homme	78
3.2	Validité de la méthode utilisée chez l'homme	78
4	Classification des accidents de désaturation	79
4.1	Evaluation neurologique des rats	79
4.2	Evaluation clinique des plongeurs	80
5	Numérations des éléments figurés du sang	80
6	Examens et prélèvements réalisés après anesthésie des rats	81
6.1	Cytokines inflammatoires circulantes et marqueurs du stress oxydant	81
6.2	Prélèvement du caecum	82
7	Analyses statistiques	82
	Contribution scientifique	83
1	Présentation de notre première étude	84
1.1	Hypothèses de l'étude	84
1.2	Objectifs de l'étude	84
1.3	Principaux résultats de l'étude	84
2	Présentation de notre deuxième étude (acceptée le 08/09/2016)	92
2.1	Hypothèses de l'étude	92
2.2	Objectifs de l'étude	92
2.3	Principaux résultats de l'étude	92

3	Présentation de notre troisième étude (à soumettre)	115
3.1	Hypothèses de l'étude.....	115
3.2	Objectifs de l'étude.....	115
3.3	Principaux résultats de l'étude.....	115
	Discussion	142
1	Effet néfaste à court terme de la fermentation lors de la plongée	142
1.1	Devenir des gaz intestinaux	142
1.2	Augmentation de la charge en gaz diluants	144
1.2.1	Démonstration chez le rat.....	144
1.2.2	Démonstration chez l'homme	145
2	Effet bénéfique à long terme de la fermentation en dehors de la plongée	146
2.1	Mécanismes de la mort cellulaire après ischémie du système nerveux central.....	146
2.1.1	Glutamate et excitotoxicité.....	146
2.1.2	Augmentation et toxicité du calcium intracellulaire	147
2.1.3	Dépolarisation péri-infarctus et « spreading depression »	147
2.1.4	Œdème cellulaire (« cytotoxique »)	148
2.1.5	Perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE) et œdème vasogénique 148	
2.1.6	Stress oxydant : NO et espèces réactives de l'oxygène	149
2.1.7	Glycolyse et acidose.....	151
2.1.8	Oligodendrocytes et substance blanche.....	151
2.1.9	Inflammation du système nerveux central et immunodépression systémique .	151
2.1.10	Nécrose et apoptose.....	153
2.2	Voies d'action du microbiote intestinal sur le système nerveux central	153
2.3	Effets bénéfiques de la production endogène d'hydrogène.....	154
	Figure 17 : Voies de communication possibles entre le microbiote intestinal et le cerveau..	155
2.4	Effets bénéfiques du butyrate sur le système nerveux central.....	156

2.4.1	Inhibiteur de l'histone déacétylase	157
2.4.2	Métabolisme énergétique et activité mitochondriale	159
2.4.3	Activateur de récepteur couplé aux protéines G	160
Conclusion.....		161
Perspectives		162
1	Limitation de la fermentation en plongée	162
2	Stimulation chronique de la fermentation en dehors de la plongée	165
2.1	Accélération prolongée du transit intestinal	165
2.2	Administration de prébiotiques	166
2.3	Administration de probiotiques	167
3	Intérêt des produits de la fermentation pour le traitement de l'accident de désaturation 167	
Références		169
Annexe 1		192

LES UNITES DE PRESSION

Le Newton / m² ou Pascal (Pa) est la seule unité internationale de pression

Le bar est une mesure de pression relative par rapport à la pression atmosphérique prise comme référence

1 bar correspond à 105 Pascal et à 0,987 ATA

L'atmosphère absolue (ATA) correspond à la pression à laquelle est soumis un organisme vivant (pression relative) additionnée à la pression atmosphérique rencontrée au niveau de la mer qui est de 1 ATA (ou 1,013 bar et 1,013.105 Pa)

Le millimètre de mercure ou Torr, souvent utilisé en physiologie pour les pressions partielles de gaz dissous, n'est généralement pas employé en hyperbarie

1 Torr correspond à $1,316 \cdot 10^{-3}$ ATA

1 ATA correspond à 760 Torr

Le mètre d'eau de mer, meter of sea water (msw) et le foot of sea water (fsw) sont souvent utilisés pour mettre en évidence la profondeur à laquelle s'opère la plongée ;

L'altitude est également souvent renseignée en *feet* ou mètres

1 msw correspond à 0,099 ATA

1 fsw correspond à 0,030 ATA

Le pound/square inch (Psi) reste également utilisé par les anglo-saxons

1 Psi correspond à 0,068 ATA

1 fsw correspond à 2.25 Psi

Le kg / cm² n'est plus utilisé que par les journalistes pour rendre perceptibles les problèmes d'hyperbarie

1 kg / cm² correspond à 0,9681 ATA

On admet dans un but de simplification, avec une erreur de 0.5% que :

1 bar correspond à 1 ATA, 10 m d'eau de mer, 30 pieds d'eau de mer et 105 Pa, à 10 m de profondeur, il y a 2 ATA.

LEGENDES DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Différents substrats exogènes et endogènes disponibles pour le microbiote du côlon. (d'après Bernalier-Donadille 2004)

Figure 2 : Schéma global de la chaîne trophique de dégradation et de fermentation des glucides par le microbiote colique. (d'après Bernalier-Donadille 2004)

Figure 3 : Principales voies métaboliques de fermentation des glucides par la microflore colique. (d'après Bernalier-Donadille 2004)

Figure 4 : Représentation schématique des voies de fermentation des hydrates de carbone qui conduisent à la production de butyrate dans le gros intestin. Les enzymes finales impliquées dans la formation de butyrate : (a) Butyryl CoA/acetate CoA transferase (b) Phosphotransbutyrylase/butyrate kinase. (d'après Pryde et coll. 2002)

Figure 5 : Principales voies du métabolisme des protéines dans le côlon. (d'après Bernalier-Donadille 2004)

Figure 6 : Origine et devenir des gaz dans le tractus digestif supérieur. (d'après Azpiroz 2004)

Figure 7 : Origine et devenir des gaz dans le côlon. (d'après Azpiroz 2004)

Figure 8 : Effets physiologiques des acides gras à courte chaîne produits lors de la fermentation colique. (d'après Marteau 2004)

Figure 9 : Prébiotiques : physiopathologie des effets indésirables. (d'après Marteau 2004)

Figure 10 : Vision schématique des accidents par shunt droite gauche. (d'après Blatteau et coll. 2006)

Figure 11 : Profil de plongée expérimentale utilisé chez les rats.

Figure 12 : Principe du test respiratoire à l'hydrogène. (d'après Azpiroz 2004)

Figure 13 : Illustration du montage utilisé pour la mesure de l'hydrogène et du dioxyde de carbone dans l'air expiré chez l'ensemble des rats.

Figure 14 : Résumé des effets de la fermentation intestinale par rapport au risque d'accident de désaturation.

Figure 15 : Conséquences de l'ischémie focale du système nerveux central. Cibles d'action potentielles de l' H_2 et du butyrate. (BSCB: blood-spinal cord barrier; BHE: barrière hémato-encéphalique).

Figure 16 : Voies métaboliques oxydatives : 1) voie classique dans laquelle l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) est dismuté par la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), celui-ci étant détoxifié par les catalases ou la glutathion peroxydase (GSH-Px). En présence de traces de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{2+}), H_2O_2 est transformé en radical hydroxyl (OH°) délétère vis-à-vis des lipides, des protéines et des acides nucléiques ; 2) voie d'oxydation chlorée mettant en jeu la myéloperoxydase (MPO) qui, à partir de H_2O_2 et en présence de chlorures, génère de l'acide hypochloreux (HOCl), puissant oxydant des protéines et à l'origine de la formation des produits d'oxydation avancée des protéines AOPP ; 3) voie d'oxydation carbonylée conduisant à la formation des produits de glyco-oxydation des protéines, AGE ; 4) voie d'oxydation nitrée dans laquelle les peroxynitrites ($ONOO^-$) conduisent à la formation de nitrotyrosine.

Figure 17 : Voies de communication possibles entre le microbiote intestinal et le cerveau.

Les produits bactériens actifs peuvent être des métabolites ou des macromolécules de l'architecture cellulaire (ex : lipopolysaccharide). Ils peuvent gagner le cerveau par voie sanguine, après absorption par l'épithélium intestinal ; stimuler la sécrétion de neuropeptides par les cellules entéro-endocrines ; stimuler les cellules immunitaires intestinales et la production de cytokines ; stimuler des neurones du système nerveux entérique et de la composante parasympathique du système nerveux autonome. (d'après Rabot 2015)

Figure 18 : Mécanismes proposés pour expliquer les effets neuroprotecteurs de butyrate et maladies pouvant bénéficier d'un traitement par butyrate ou d'une alimentation riche en fibres. (d'après Bourassa et coll. 2016)

Tableau I : Moyens de moduler la fermentation envisageables chez l'homme en vue de diminuer le risque d'accident de désaturation.

Tableau II : Résumé des proportions d'AGCC produits par fermentation à partir de différentes formes d'hydrates de carbone. (d'après Smith et coll. 1998)

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADD : accident de désaturation

AGCC : acide gras à chaîne courte

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate

BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BHE : barrière hématoencéphalique

BSCB : blood-spinal cord barrier

DSC : débit sanguin cérébral

FOS : fructo-oligosaccharide

GABA : acide γ -amino-butyrique

GDNF : facteur neurotrophique dérivé de la glie

GPCR : récepteur couplé à la protéine G

HAT : histone acétyltransférase

HDAC : histone désacétylase

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

MMP9 : matrix metalloproteinase-9

NaB : butyrate de sodium

NGF : nerve growth factor

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

nNOS I : oxyde nitrique [NO] synthase neuronale

iNOS II : NOS inductible indépendante du Ca²⁺

eNOS III : NOS endothéliale

O₂^{•-} : anion superoxyde

OH[•] : radical hydroxyle

ONOO⁻ : anion peroxydinitrite

RE : réticulum endoplasmique

ROS : espèce réactive de l'oxygène

TNF α : facteur de nécrose tumorale α

INTRODUCTION

La plongée sous-marine est une activité à risque qui peut conduire, durant la décompression, à la production de bulles à partir de la quantité de gaz diluants accumulée sous forme dissoute, au cours de la plongée, dans les tissus périphériques. Quand les bulles sont formées en quantité excessive dans le sang et les tissus, des symptômes et des signes d'accident de désaturation (ADD) peuvent survenir (Bert 1978). On admet habituellement que les bulles de gaz se développent à partir de noyaux gazeux (nano ou microbulles) attachés à la paroi des vaisseaux sanguins (Arieli et coll. 2002, Blatteau et coll. 2006), et que l'abondance des bulles veineuses est corrélée au risque de survenue d'un ADD (Sawatzky 1991, Nishi et coll. 2003). La présence de ces bulles engendre une activation endothéliale accompagnée de phénomènes prothrombotiques et immuno-inflammatoires (Laborit et coll. 1961). Il a ainsi été observé une activation des leucocytes et des plaquettes sanguines, accompagnée d'une augmentation des sécrétions de substances vasoactives et d'adhésion cellulaire (Laborit et coll. 1961, Francis & Mitchell 2003). Ces phénomènes pro-thrombotiques sont susceptibles d'entraîner une ischémie focale médullaire et cérébrale, elle-même, à l'origine des symptômes neurologiques de l'ADD (DeGirolami & Zivin 1982). Les lésions neurologiques avec atteinte de la moelle épinière et du cerveau sont à l'origine des symptômes les plus graves et les plus fréquemment rencontrés dans l'ADD (Francis & Mitchell 2003). Malgré le traitement de référence par oxygénothérapie hyperbare, 20 à 30% des patients gardent des séquelles au décours de la prise en charge d'un ADD neurologique (Blatteau et coll. 2010). L'identification et le contrôle de nouveaux facteurs favorisant les accidents de désaturation est donc un enjeu majeur.

Des auteurs ont mis en évidence que le tube digestif pouvait avoir une influence sur la survenue d'accidents de désaturation par l'intermédiaire du microbiote intestinal (Kayar et coll. 1998, Kayar et coll. 2001, Kayar 2009). Ces auteurs ont placé dans le côlon de porcs des bactéries (les achae *Methanobrevibacter smithii*) métabolisant l'hydrogène. Le métabolisme des *M. smithii* convertit l' H_2 et le CO_2 en méthane et en eau. L'objectif était d'éliminer une partie de l'hydrogène accumulé dans l'organisme durant l'exposition hyperbare, au cours de plongées utilisant l'hydrogène comme gaz diluant de l' O_2 . Les auteurs ont démontré que l'élimination d'environ 5 à 10% de la charge corporelle en H_2 réduisait le risque d'ADD d'environ 50%. Par ailleurs, le risque d'ADD diminuait avec l'augmentation de l'activité des microbes injectés ($p < 0,05$) (Kayar et coll. 2001). Ainsi, l'élimination tissulaire de gaz diluant par le métabolisme microbien était inversement relié au risque d'ADD de façon dose

dépendante (Fahlman et coll. 2001). En outre, des auteurs ont émis l'hypothèse que le métabolisme de l'hydrogène par le microbiote intestinal naturel des porcs pourrait protéger de l'ADD suite à une plongée simulée à l'hydrogène (Kayar & Fahlman 2001).

Inversement, on sait que les sucres non digérés sont à l'origine d'une fermentation bactérienne dans l'intestin avec production d'hydrogène (Piche & Dainese 2011). Comme une partie de l'hydrogène formé diffuse à travers la barrière intestinale dans tout l'organisme, nous pensons que cet hydrogène endogène pourrait favoriser l'ADD. En effet, il pourrait contribuer à augmenter directement la charge en gaz diluant au cours de l'exposition hyperbare, et s'éliminer sous forme de bulles pendant la phase de décompression. Avant la plongée, il pourrait également participer à la croissance initiale des noyaux gazeux par diffusion, et amplifier la formation de bulles au cours de la décompression (Arieli et coll. 2002, Blatteau et coll. 2006). Cependant, les régimes riches en fibres présentent par ailleurs de nombreux avantages pour la santé comme en témoigne la réduction du risque de diabète de type 2, de cancer du côlon, d'obésité, d'accident vasculaire cérébral et de maladies cardiovasculaires, ce qui en fait une alimentation saine largement recommandée. La plupart des effets rapportés sont associés au microbiome et sa capacité à produire des acides gras à chaîne courte, comme le butyrate (Bourassa et coll. 2016). Un microbiote intestinal diversifié est crucial pour la prévention des maladies comme le démontrent des études sur le microbiome (à savoir, les analyses des séquences métagénomiques) et la perturbation de l'homéostasie énergétique observée chez des souris axéniques (Sudo et coll. 2004). Bien que la façon dont le microbiote intestinal affecte positivement ou négativement le cerveau ne soit pas encore claire, plusieurs mécanismes sont susceptibles d'être impliqués. En particulier, les bactéries intestinales ont une prodigieuse capacité métabolique, et certains métabolites dérivés des microbes entrent dans la circulation et peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique, comme le butyrate.

Le premier objectif de cette thèse est de vérifier si la fermentation intestinale lors de la plongée peut favoriser la survenue d'un ADD. Le deuxième objectif est d'évaluer l'impact d'une stimulation chronique de la fermentation avant plongée sur le risque d'ADD. L'intérêt principal de ce travail est de suggérer de nouvelles approches de prévention de l'ADD, en lien avec une modulation de la fermentation intestinale.

La première partie est consacrée à des rappels concernant l'ADD (formes cliniques, facteurs favorisants, physiopathologie) et le microbiote intestinal (fermentation bactérienne intestinale, origine et tolérance des gaz intestinaux, facteurs de contrôle du microbiote intestinal).

La deuxième partie décrit plus particulièrement le protocole de plongées expérimentales des rats, les moyens d'exploration de la fermentation intestinale et d'évaluation neurologique aussi bien chez l'homme que chez le rat.

La troisième partie est dédiée à l'exposé des résultats de nos études portant sur l'évaluation (i) de la fermentation intestinale lors de la plongée chez l'homme en cas de survenue d'un ADD ; (ii) de l'effet de la stimulation de la fermentation intestinale, par ingestion de mannitol avant plongée, sur la survenue d'un ADD chez des rats à jeun ; (iii) de l'effet de la stimulation chronique de la fermentation par l'accélération du transit intestinal, dans le cadre particulier d'une ingestion prolongée de polyéthylène glycol pendant une semaine avant plongée, sur la survenue d'un ADD chez le rat.

En conclusion, nous discutons de l'effet dual de la fermentation intestinale sur la décompression. Enfin, nous évoquons des pistes à explorer pour limiter les accidents de désaturation.

Ces accidents articulaires (« bends ») siègent le plus souvent au niveau d'une grosse articulation d'un membre soumis au travail. Il s'agit d'une douleur d'installation progressive, croissante, articulaire ou para-articulaire, à type de broiement, non calmée par les antalgiques. Elle peut être suffisamment intense pour induire une impotence fonctionnelle. L'examen clinique est pauvre, la douleur à la mobilisation passive est inconstante. Il n'y a pas de parallélisme anatomoclinique.

1.6 Malaise général

Il s'agit d'une asthénie intense au décours immédiat de la plongée, sans commune mesure avec les efforts fournis. Elle est parfois accompagnée de céphalées et dure plusieurs heures.

1.7 Accidents respiratoires

Ils se caractérisent par une dyspnée, une gêne respiratoire avec oppression thoracique, une toux paroxystique. Des crachats saumonés dénoncent un stade évolué avec œdème pulmonaire. Ces accidents posent le problème du diagnostic différentiel des barotraumatismes pulmonaires et des œdèmes pulmonaires en plongée.

2 Facteurs favorisant d'accidents de désaturation (de Maistre 2004)

Beaucoup de facteurs supposés accroître la formation de bulles ou prédisposer les tissus à des accidents bullaires ont été avancés. Malheureusement, la quantité et la qualité des données sur le sujet sont pauvres la plupart du temps. La principale raison en est que, jusqu'à il y a peu de temps, la collecte de renseignements sur la population de plongeurs et leurs accidents a été aléatoire. Par ailleurs le risque d'ADD est faible (de l'ordre de 1/10 000 plongées), si bien qu'à moins qu'un facteur ne joue un rôle extraordinaire, il est quasiment impossible de démontrer une association statistiquement significative.

2.1 La plongée

Le temps de plongée, la profondeur et le mode de remontée sont les facteurs de risque les plus couramment modélisés et activement contrôlés.

2.1.1 Les plongées répétitives

Les plongées répétitives ou les ascensions multiples vers la surface lors d'une plongée unique sont considérées accroître le risque d'ADD (Vann et coll. 1989). En marge de l'accumulation de gaz diluant dans les tissus, le fondement d'un risque accru est la formation de bulles après

la première remontée vers la surface. Lors d'une nouvelle plongée, ces bulles peuvent affecter la cinétique des gaz diluants (Hills 1977), se comporter comme des germes pour des bulles plus importantes. En outre, on a démontré *in vivo* que les bulles veineuses retenues dans les capillaires pulmonaires après la plongée peuvent se redistribuer dans la circulation artérielle lors d'une nouvelle compression (Butler & Hills 1983). Toutefois le risque d'ADD demeure inconnu.

2.1.2 La plongée à « profil inversé »

La pratique de plusieurs plongées de plus en plus profondes, couramment décrite comme plongée à « profil inversé », est une forme particulière de plongée répétitive qui est sensée augmenter le risque d'ADD. Cependant, les profils inversés ne s'accompagnent pas d'une formation de bulles veineuses plus importante (Dunford et coll. 1994), et le risque lié à la plongée à profil inversé est probablement faible, en particulier quand les plongés sont conduites dans la courbe de sécurité (sans paliers de décompression), dans les limites de profondeur de la plongée loisir (0 à 40 m), et quand le gradient d'inversion de profil n'excède pas 12 mètres (Lang & Lehner 2000).

2.1.3 L'effort en plongée

L'effort sous pression accélère l'absorption de gaz diluant dans les tissus dont la perfusion est accrue pendant le travail. Il en résulte un accroissement de la charge de gaz diluant, du dégazage pour des modèles tissulaires mathématiques (Flook 1997), et donc du risque d'ADD à la fois chez les animaux et chez l'homme (Van der Aue 1945, 1951, Vann R. D. 1982). Un temps de décompression plus important est nécessaire (Buhlmann 1975, Schibli 1972). De manière intéressante, si on réalise un effort moyen durant la décompression, la perfusion et l'élimination de gaz diluant est accélérée (Flook 1997), le temps de décompression est réduit (Vann R. D. 1982), et le nombre de bulles veineuses détecté après la plongée est plus faible (Jankowski 1997). Un corollaire est que les postures statiques et, en particulier, recroquevillées qui diminuent la perfusion durant la décompression peuvent accroître le risque d'ADD (Guilliod et coll. 1996).

2.1.4 Le froid

L'exposition au froid est souvent citée comme facteur de risque d'ADD, mais la véritable relation entre le froid et l'ADD est complexe et dépend du moment de l'exposition au froid.

Des résultats chez l'homme laissent penser que si le plongeur est froid depuis le début de la plongée, alors la formation de bulles et le risque d'ADD sont réduits (Dunford & Hayward 1981), probablement parce qu'à la fois la perfusion périphérique et la capture de gaz diluant sont réduites.

En revanche, on a montré que la réduction de la perfusion périphérique durant la décompression augmentait la formation de bulles veineuses (Guilliod et coll. 1996, Koteng et coll. 1996).

L'exposition au froid et l'effort peuvent expliquer le risque accru d'ADD pour les plongées en pleine eau ou les plongées en chambre humide comparées à des plongées équivalentes au sec et au repos dans des chambres hyperbares (Weathersby et coll. 1990).

2.2 Après la plongée

2.2.1 L'effort

On a prouvé que l'effort après la décompression peut accroître l'incidence de l'ADD à la fois chez les animaux et chez l'homme (Cook 1951, Pollard 1995). Le mécanisme n'est pas certain mais pourrait reposer sur la génération de zones de faible pression dans les tissus au travail, favorisant ainsi la formation de bulles par un processus de cavitation. Par ailleurs l'accumulation de CO₂ pourrait générer des noyaux gazeux à l'origine des bulles de gaz diluant. L'effort pourrait permettre la mise en circulation des bulles veineuses stationnaires. Une autre explication possible est que l'effort, en particulier le levage genou fléchi avec élévation de la pression intra thoracique, puisse favoriser le passage de bulles au travers d'un foramen ovale perméable (FOP) latent (Balestra et coll. 1998).

2.2.2 L'ascension en altitude suivant la plongée

Elle favorise la formation et le développement de bulles de gaz diluant, et est un facteur déclenchant bien connu d'ADD (Laursen et coll. 1999, Gorman et coll. 1988). L'ascension à une altitude modeste par la route peu de temps après la plongée a déclenché un ADD chez des plongeurs loisirs (Yamani et coll. 2000). Cependant, la question la plus ardue est la prescription d'un délai entre la plongée et le vol dans les avions de ligne, la plupart étant pressurisés à une altitude équivalente à 2438 mètres (Vann et coll. 1995). Des données humaines restreintes laissent penser qu'un délai de 12 h est suffisant après une plongée simple sans palier, et qu'une période plus longue serait requise après des plongées multiples (Vann et coll. 1996). Malheureusement, aucune recommandation ne préviendra tous les cas. Des

accidents de désaturation ont été décrits chez des plongeurs sportifs sans symptômes avant le vol, et qui ont attendu 48 h avant de prendre l'avion.

2.2.3 Le froid

Broome (1992) a démontré que les plongées étaient plus à risque d'induire un ADD si l'environnement de surface était froid. Mekjavic & Kakitsuba (1989) ont détecté plus de bulles veineuses chez les plongeurs exposés au froid après la plongée que chez les plongeurs gardés au chaud, peut-être en raison de la réduction de la perfusion périphérique et en conséquence de l'évacuation plus lente du gaz diluant. Cependant, les mêmes auteurs ont observé que les douches chaudes prises par les plongeurs froids après la plongée conduisaient à des symptômes d'ADD. Ceci peut s'expliquer par une réduction rapide de la solubilité des gaz dans les tissus superficiels rapidement réchauffés. Il en résulte que les plongeurs devraient être tenus au chaud, mais à une température relativement stable après la plongée.

2.3 Le plongeur

Des études Doppler ont montré que la formation de bulles veineuses présentait une variabilité inter individuelle importante, aussi bien chez les animaux que chez les humains (Nishi 1993), pour des expositions en profondeur et en temps identiques. Un certain nombre de facteurs favorisants inhérents au plongeur ont été proposés, mais dans la plupart des cas leur importance ne fait pas l'unanimité. En outre, il est souvent difficile de déterminer si ces facteurs prédisposent à une formation accrue de bulles ou agissent en élevant la susceptibilité à ces dernières.

2.3.1 Le pourcentage de masse grasse

Etant donné que l'azote est plus soluble dans les lipides que dans les tissus aqueux, il a été avancé que le pourcentage de masse grasse influe sur la charge d'azote, la formation de bulles et le risque d'ADD suivant la décompression. Des études sur des animaux, des travailleurs en caisson, des aviateurs et des plongeurs (Carturan et coll. 1999, Dembert et coll. 1984) corroborent cette hypothèse. Cependant, d'autres études n'ont pas réussi à montrer un lien entre le pourcentage de masse grasse (Curley et coll. 1989, Wise 1963) ou l'indice de masse corporelle (Conkin et coll. 2000) et le risque d'ADD. Quelques données suggèrent également que des paramètres biochimiques tels que les taux de cholestérol, de potassium et de calcium peuvent influencer le dégazage (Jauchem et coll. 1986).

2.3.2 L'âge

On a montré que les plongeurs âgés génèrent plus de bulles veineuses que de jeunes plongeurs après des plongées comparables (Carturan et coll. 1999, Eckenhoff et coll. 1989). Cependant, l'âge n'est pas constamment identifié comme un facteur de risque (Conkin et coll. 2000, Dembert et coll. 1984, Wise 1963). Une étude sur des tunneliers, contrôlée pour de nombreux facteurs, a trouvé que l'âge en lui-même n'était pas un facteur de risque significatif (Lam & Yau 1989). L'accroissement du risque avec l'âge pourrait être lié à un déclin physique général (Dehn & Bruce 1972), une réduction de la capillarité tissulaire, un pourcentage plus élevé de masse grasse ou une plus grande probabilité d'antécédent d'ADD.

2.3.3 L'antécédent d'accident de désaturation

Un ADD ancien peut prédisposer à un épisode ultérieur en réduisant la réserve organique ou par d'autres mécanismes inconnus. Les observations de travailleurs en caisson laissent penser que c'est un facteur de risque (Lam & Yau 1989) mais il y a peu de données en ce qui concerne la plongée. En outre, l'existence d'une prédisposition non connue, ou le comportement à risque répété sont aussi des explications possibles pour des épisodes récurrents. Dans tous les cas, au moins chez les travailleurs en caisson, un petit pourcentage de la population est responsable d'une majorité des cas d'ADD (Golding et coll. 1960).

2.3.4 La déshydratation

La déshydratation et l'hémoconcentration avant la plongée peuvent exacerber l'altération de la microcirculation quand la formation des bulles survient. Cependant, il n'y a pas de données cliniques pour soutenir cette affirmation, et les données animales sont discordantes. Broome et coll. (1995) ont montré que le remplissage volumique intra-vasculaire aigu avant la plongée chez les porcs ne réduisait pas le risque d'ADD. Cependant, Fahlman & Dromsky (2006) ont montré que les porcs normalement hydratés avaient un risque moindre d'ADD que ceux soumis à une restriction par prélèvement de fluide et administration de diurétiques. En outre, Hjelde et coll. (2000) ont montré que la formation de bulles après la décompression était inversement proportionnelle à la tension de surface du sérum, et il semble plausible que la tension de surface du plasma soit élevée chez le plongeur bien hydraté.

2.3.5 Le sexe

Les femmes ont longtemps été considérées comme étant plus à risque de développer un ADD (Bangasser 1978, Bassett 1973, Dixon et coll. 1988). Ceci était habituellement expliqué par le fait que les femmes présentent un plus grand pourcentage de masse grasse, ou que les

menstruations peuvent accroître le risque (Dunford & Hampson 1992, Krause et coll. 1998, Lee et coll. 1998, Rudge 1990), en particulier chez les femmes utilisant une contraception orale (Doyle et coll. 1997).

Cependant, deux rapports récents sur le risque d'ADD en milieu hypobare n'ont pas retrouvé d'argument pour un risque lié au sexe (Conkin et coll. 2000, Webb et coll. 1999). Il manque de grandes études bien conduites permettant de conclure.

2.3.6 La condition physique

La mauvaise condition physique est parfois retenue comme facteur de risque d'ADD. On a détecté moins de bulles après décompression chez des sujets humains qui avaient entrepris un programme d'exercice régulier (Powell 1991) ou qui avaient une VO_2 max élevée (capacité aérobie maximale) (Carturan et coll. 1999).

3 La fermentation intestinale chez l'homme

(d'après Bernalier-Donadille 2004)

Le côlon de l'homme héberge une communauté bactérienne extrêmement dense et diversifiée, composée en majorité de micro-organismes anaérobies stricts. Les principales sources de carbone et d'énergie de ce microbiote sont représentées par les glucides et les protéines non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif, ainsi que par les sécrétions endogènes (mucopolysaccharides, débris cellulaires, enzymes...). Une grande diversité de substrats est ainsi disponible pour le microbiote colique, la nature et la quantité de ces différentes sources carbonées variant, pour une large part, en fonction du régime alimentaire. La quantité totale de glucides fermentescibles varie ainsi de 10 à 60 g par jour, alors que celle des composés azotés, dont 1 à 2 g proviennent de l'effluent iléal (Macfarlane & Cummings 1991), est estimée entre 6 et 18 g par jour (Cummings & Macfarlane 1991). Le métabolisme des glucides est ainsi quantitativement plus important que celui des protéines, en particulier dans le côlon proximal où la disponibilité en substrats fermentescibles est importante. Les activités métaboliques du microbiote colique sont très nombreuses et diversifiées. Les polymères complexes sont dégradés par une grande variété d'hydrolases (polysaccharidases, glycosidases, protéases, peptidases) en fragments plus petits (oses, acides aminés) assimilables par les bactéries. La fermentation de ces substrats par le microbiote conduit ensuite à la production de divers métabolites comme les acides gras à chaîne courte (AGCC), les gaz et l'ammoniaque. L'ensemble de ces réactions de fermentation permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et au maintien de leurs fonctions cellulaires.

formée lors du métabolisme des acides aminés, comme des phénols, des acides dicarboxyliques et des acides gras ramifiés (isobutyrate, 2-méthylbutyrate, isovalérate formés respectivement à partir de la valine, de l'isoleucine et de la leucine). Les acides gras ramifiés constituent des marqueurs de la protéolyse dans le côlon, puisque ces composés sont exclusivement formés lors du métabolisme des acides aminés. La concentration de ces métabolites augmente significativement du côlon proximal au côlon distal (Macfarlane & Cummings 1991). Les composés phénoliques et indoliques sont issus de la dégradation des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) par certaines espèces de *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et d'entérobactéries. Ces métabolites sont absorbés et détoxifiés par la muqueuse colique, puis excrétés dans les urines. Cependant, une augmentation de la formation des phénols et des indoles a été trouvée associée à diverses pathologies chez l'homme, en particulier dans le cas de cancer colique (Macfarlane & Gibson 1994). Enfin, la fermentation de certains acides aminés (valine, alanine, glutamate, leucine) peut également contribuer à la production d'H₂ dans l'écosystème. Les micro-organismes hydrogénotrophes (méthanogènes, acétogènes ou sulfitoréducteurs) pourraient ainsi potentiellement influencer le métabolisme des acides aminés par l'intermédiaire de transferts interspèces d'H₂.

4 Causes de variabilité de la fermentation intestinale

La fermentation intestinale varie d'un sujet à un autre, et tout au long de la journée (Le Marchand et coll. 1992). Cette variabilité dépend, d'une part, de la composition de l'alimentation et de sa répartition sur la journée, et d'autre part, de la composition qualitative et quantitative du microbiote intestinal.

4.1 Composition de l'alimentation

La relation entre l'alimentation et la production de gaz est complexe et non encore complètement élucidée. Jusqu'à 20% des hydrates de carbone ingérés au cours d'un repas normal ne sont pas résorbés (Anderson et coll. 1981). A cela s'ajoutent les oligosaccharides complexes non résorbables (stachyoses, raffinoses) retrouvés dans certains légumes, en particulier les légumineuses. Ce qu'on appelle « amidon résistant » est une autre source de flatulences. Elles résultent d'une impossibilité de scission de l'amidon par l'amylase, du fait d'un changement de sa configuration physique dû à la congélation (Perman & Montes 1995). Le fructose et le sorbitol contenus dans les fruits ou rajoutés comme édulcorants dans les

produits diététiques sont aussi scindés par la fermentation bactérienne, tout comme la pectine et l'hémicellulose qui font partie des fibres alimentaires (Hanson & Winterfeldt 1985).

L'excrétion d'hydrogène par voie respiratoire suit un cycle circadien. On note une baisse tôt dans la matinée, suivie d'une augmentation progressive pendant le reste de la journée (Le Marchand et coll. 1992), suivant ainsi le rythme des prises alimentaires sur une journée. L'excrétion persiste souvent en dépit d'une nuit de jeûne, habituellement à un niveau faible. Dans une étude portant sur 221 enfants et 9 adultes en bonne santé, l'hydrogène expiré à jeun était en moyenne de 7,1 +/- 5,0 ppm (moyenne +/- écart-type), excédant 30 ppm dans moins de 1% des cas (Perman et coll. 1984). Les auteurs ont par ailleurs mis en évidence que les prises alimentaires de la veille au soir pouvaient influencer la fermentation.

4.2 Pathologies intestinales et fermentation

Un certain nombre de pathologies intestinales peuvent s'accompagner d'une fermentation accrue soit lors de l'ingestion d'aliments bien particuliers (malabsorptions des glucides) (Di Stefano et coll. 2003), soit quel que soit le type d'aliment ingéré (syndrome du grêle court, pullulation microbienne intestinale, syndrome de l'intestin irritable). Ces pathologies peuvent être méconnues car pauci symptomatiques, et expliquer des différences de fermentation entre les individus.

4.2.1 Malabsorption des glucides

Il y a dix à 20 ans, le principal représentant des hydrates de carbone qui représentent 40 à 50% de l'apport calorique quotidien était l'amidon. Or, l'alimentation occidentale évolue. Les dernières décennies ont été marquées par une diminution régulière de la part de l'amidon dans les hydrates de carbones alimentaires. En Europe et aux Etats-Unis, plus de 50% des sucres simples alimentaires proviennent d'additifs sucrés incorporés dans la pâtisserie industrielle, les plats cuisinés et les jus de fruits. Le fructose y tient une bonne place en raison de ces qualités édulcorantes qui l'amène à être incorporé largement dans les gâteaux, les bonbons, les jus de fruits ou certaines sauces. La quantité de sorbitol dans l'alimentation augmente également car il entre dans la composition des bonbons, des chewing-gums mais également des produits dits « diététiques sans sucres » qui sont consommés de plus en plus largement. En dehors de l'intolérance au lactose, un excès de gaz peut découler d'une malabsorption des glucides comme le fructose et le sorbitol (Fernández-Bañares et coll.1993). Il est possible que la malabsorption du fructose et du sorbitol soit sous-estimée (Ducrotté 2009). Dans une population de patients souffrant de symptômes fonctionnels digestifs (dont le ballonnement),

Rumessen et Gudmand-Høyer ont montré qu'une malabsorption du fructose diagnostiquée par test respiratoire s'observait chez un sujet sur deux pour une dose de fructose de 25 g et chez un sujet sur trois pour une dose inférieure à 15 g, certains sujets n'absorbant pas du tout le fructose (Rumessen & Gudmand-Høyer 1988). Une malabsorption de sorbitol s'observait parallèlement pour une dose inférieure à 5 g et l'administration combinée de fructose-sorbitol aggravait les symptômes fonctionnels digestifs (Rumessen & Gudmand-Høyer 1988). Hyams a montré chez des sujets sains qu'une malabsorption de sorbitol peut apparaître dès une charge de 5 g et que cette malabsorption devient symptomatique (ballonnement, émission accrue de gaz) dès 10 g (Hyams 1983).

La malabsorption des glucides peut également être secondaire comme dans la maladie coeliaque (Corazza et coll. 1987, Di Stefano et coll. 2003, Di Stefano et coll. 2004). Dans le cas de la maladie coeliaque, les substrats endogènes sont augmentés dans la lumière des patients présentant une maladie coeliaque et peuvent être responsables de niveaux d'hydrogène expiré à jeun élevés (Di Stefano et coll. 2004).

4.2.2 Syndrome du grêle court

La malabsorption chronique des glucides chez les patients atteints de syndrome du grêle court pourrait donner lieu à une fermentation plus efficace. Chez de tels patients atteints de syndrome du grêle court, une étude a montré que la capacité du microbiote à fermenter le lactulose et la masse des bactéries fécales sont augmentées (Briet et Coll. 1995).

4.2.3 Pullulation microbienne intestinale

Chez les individus atteints de pullulation microbienne intestinale et dans l'entéropathie exsudative, le catabolisme bactérien des glycoprotéines endogènes peut entraîner une excrétion basale d'hydrogène et de méthane élevée (Perman & Modler 1982). Dans une étude portant sur des patients souffrant de douleur abdominales récurrentes ou de diarrhée chronique, lorsque l'hydrogène expiré à jeun dépassait 42 ppm, on retrouvait une pullulation bactérienne du grêle dans près de 50% des cas (Perman et coll. 1984).

4.2.4 Syndrome de l'intestin irritable

L'origine des ballonnements et de la distension abdominale, retrouvés en cas de syndrome de l'intestin irritable, est multi factorielle : augmentation de la production de gaz ou diminution de la consommation intraluminaire de gaz, anomalies de la motilité gastro-intestinale et l'élimination des gaz, hypersensibilité viscérale, anomalies de l'activité musculaire de la paroi

abdominale et facteurs psychologiques (Gabarrini et coll. 2009). Néanmoins, en présence d'un syndrome de l'intestin irritable, on retrouve fréquemment une production accrue de gaz liée (Lin HC 2004, Triantafyllou et coll. 2015), ou non à la présence d'une pullulation microbienne intestinale (King et coll. 1998, Shah et coll. 2010, Kumar et coll. 2010).

4.2.5 Symptômes liés aux gaz

Flatulences et ballonnements intestinaux font partie des symptômes liés aux gaz (Di Stefano et coll. 2000, Sharara et coll. 2006). La production de gaz par fermentation est accrue chez les patients présentant des flatulences (Rao 1997) ou des ballonnements (King et coll. 1998).

4.3 Médicaments et fermentation

La prise de laxatifs (Gilat et coll. 1978, Urita et coll. 2003) ou d'antibiotiques (Gabarrini et coll. 2009) modifie la composition du microbiote intestinal. En outre, on n'a pas de données sur le temps nécessaire à la récupération du métabolisme et de la composition du microbiote intestinal après l'administration de laxatifs ou d'antibiotiques (Gabarrini et coll. 2009).

Il a été démontré qu'une combinaison de laxatifs et de solutions d'électrolytes administrés en lavement, pour le nettoyage du côlon, diminue la production d'hydrogène par fermentation de façon très marquée (Gilat et coll. 1978, Urita et coll. 2003, Altomare et coll. 2014). A l'inverse, l'utilisation de laxatifs pour la régulation des selles, chez des sujets non à jeun, peut favoriser la fermentation (Kashyap et coll. 2013). Cela est d'autant plus vrai qu'il s'agit de laxatifs à base de sucres.

Pour de nombreux traitements antibiotiques (rifamixine (Di Stefano et coll. 2000, Cappello & Marzio 2005, Sharara et coll. 2006, Triantafyllou et coll. 2015), métronidazole (Bjørneklett & Midtvedt 1981, Lembcke et coll. 1980, Muir et coll. 1996), pénicilline (Bjørneklett et Midtvedt 1981), ampicilline (Rao et coll. 1988)), il existe une réduction significative de la fermentation. Dans certain cas, on note une augmentation de l'hydrogène expiré par inhibition de la consommation d'hydrogène par certaines bactéries au niveau du côlon, en particuliers les bactéries méthanogènes (néomycine (Lembcke et coll. 1980, Pimentel et coll. 2014), oxytetracycline (Muir et coll. 1996)).

Outre les laxatifs et les antibiotiques, d'autres médicaments pourraient théoriquement avoir un impact sur la fermentation, tels que les modulateurs du transit intestinal.

4.4 Transit intestinal et fermentation

Chez l'homme comme chez l'animal, des auteurs ont démontré que le temps de transit intestinal était inversement proportionnel aux concentrations fécales d'acides gras à chaîne courte – comprenant les acides butyrique et propionique – et à l'hydrogène dans l'air expiré, qui sont un reflet de la fermentation intestinale (El Oufir et coll. 1996, Lewis & Heaton 1997, Bustos et coll. 1991). Les acides gras à chaîne courte pourraient à leur tour stimuler la fermentation par le biais d'une accélération du transit du grêle (Richardson et coll. 1991). L'hydrogène endogène pourrait également stimuler la fermentation par le biais d'une accélération du transit colique, prédominante au niveau du côlon proximal (Jouët et coll. 2008, Jahng et coll. 2012).

Certaines pathologies sont susceptibles d'accélérer le transit intestinal. Chez les patients atteints de syndrome du grêle court, outre une accélération du transit oro-caecal, on note une plus grande capacité de fermentation (Briet et Coll. 1995). Un état de stress chronique pourrait stimuler la fermentation par le biais d'une accélération du transit digestif global (Enck et coll. 1989). Le transit intestinal peut également être accéléré de façon physiologique. C'est le cas par exemple lors d'un entraînement physique aérobie (Enck et coll. 1989), ou lors de la consommation de cellulose non fermentescible (Kashyap et coll. 2013). Inversement, la consommation chronique d'alcool pourrait inhiber la fermentation via un ralentissement du transit oro-caecal (Addolorato et coll. 1997).

5 Origine des gaz intestinaux chez l'homme

(d'après Azpiroz 2004)

Les bactéries du côlon produisent et consomment de larges quantités de gaz. On connaît peu de chose sur l'homéostasie des gaz intestinaux ; toutefois, ce phénomène semble être un processus finement régulé puisque différentes études menées avec différentes techniques et sur des populations variées ont montré que, malgré la très grande contenance du tractus gastro-intestinal, le volume total des gaz intraluminaux s'élève à seulement 100-200 ml (Levitt 1971, Serra et coll. 2001, Bedell et coll. 1956). La constance de ce volume à un niveau relativement bas est d'autant plus surprenante lorsque l'on tient compte des processus dynamiques et compliqués d'entrée et de sortie des gaz du tube digestif (Strocchi & Levitt 1998, Cloarec et coll. 1990b).

5.1 Entrée et production de gaz dans l'intestin

L'entrée des gaz s'effectue lors de la déglutition, de réactions chimiques, de la diffusion à partir du sang et de la fermentation bactérienne.

atteignant jusqu'à 40 à 80 g de prébiotiques. Dans une autre étude (Marteau & Flourié 2001), le lactulose à forte dose induisait une diarrhée d'intensité variable d'un sujet à l'autre. Ainsi, après ingestion de 80 g de lactulose, quatre sujets sur douze avaient un volume de selles excédant un litre par jour, alors que quatre autres avaient un poids de selles inférieur à 280 g/jour. Il est probable que les variations entre individus sont liées à des différences de capacité à fermenter les hydrates de carbone puisque, quand des échantillons fécaux provenant de différents sujets sont incubés avec le même sucre, la production de gaz peut varier d'un facteur 10 (Williams & Jackson 2002).

Le risque d'intolérance et la sévérité des symptômes, chez un individu donné et dans une population, apparaissent plus ou moins dose-dépendants (Marteau & Flourié 2001). Un seuil est trouvé dans tous les cas en ce qui concerne la diarrhée, mais pas toujours pour ce qui est des borborygmes et des excès de gaz rectaux dans la mesure où ces symptômes sont fréquents dans la population témoin.

L'existence d'un syndrome de l'intestin irritable augmente le risque d'intolérance aux prébiotiques (Marteau & Flourié 2001, Hartemink et coll. 1999, Vesa et coll. 1998). De plus, le mode de consommation de sucres peut influencer leur absorption intestinale et donc moduler leur arrivée dans le côlon et leur effet diarrhéogène. Par exemple, l'absorption du lactose chez le sujet hypolactasique est augmentée quand ce sucre est consommé sous forme de lait entier par comparaison avec une consommation sous forme de lait écrémé, les graisses ralentissant la vidange gastrique. L'absorption est également accrue si le lactose est ingéré en même temps que des fibres, un repas, du cacao ou du loperamide qui ralentissent la motricité gastrique et/ou intestinale (in (Marteau & Flourié 2001)).

7 Naissance des bulles

(d'après Blatteau et coll. 2006)

La relation entre l'ADD et la formation de bulles s'impose dès Paul Bert (1878) qui décrit chez des animaux autopsiés après décompression la présence de bulles intravasculaires (Bert 1878). A partir des travaux de Boycott et Haldane (1908) les premières tables de décompression ont pour objectif de maintenir le plongeur à l'abri d'une sursaturation critique, au-delà de laquelle les bulles apparaîtraient et entraîneraient l'ADD (Boycott et coll. 1908).

Il faut attendre Behnke (1942) pour voir émerger la notion de bulles asymptomatiques appelées « bulles silencieuses » (Behnke 1951). Les techniques ultrasonores ont confirmé que

des bulles peuvent s'observer dans la circulation veineuse au décours d'une décompression en l'absence de toute manifestation clinique.

Enfin, on sait depuis Harvey (1944) que la formation des bulles n'est pas simplement la conséquence de la sursaturation du gaz diluant au cours de la décompression. L'existence de noyaux gazeux c'est-à-dire de phases gazeuses de très petites dimensions présentes à l'état basal dans les liquides, expliquerait la facilité de création des bulles (Harvey 1951).

Plusieurs étapes peuvent être distinguées pour décrire la formation des bulles après une plongée subaquatique :

- les phénomènes de sursaturation – désaturation ;
- la nucléation : commencement de la phase gazeuse au stade de noyaux gazeux ;
- la croissance et la coalescence des bulles.

7.1 Les phénomènes de sursaturation – désaturation

7.1.1 La sursaturation (Méliet 2002)

Le mélange gazeux ventilé par le plongeur est composé d'oxygène et d'un gaz neutre qui n'est pas métabolisé par l'organisme. Il s'agit le plus souvent d'azote dans le cadre de la plongée de loisir, lorsque les bouteilles de plongée sont remplies d'air.

En plongée, la pression augmente d'une atmosphère absolue (ATA) tous les 10 mètres. Le plongeur ventile par l'intermédiaire du détendeur un gaz à la pression équivalente à la profondeur à laquelle il évolue. La ventilation d'air à une pression supérieure à la pression atmosphérique génère un gradient de pression partielle d'azote entre l'air alvéolaire et les tissus de l'organisme, qui favorise la dissolution d'azote au travers de la barrière alvéolocapillaire. L'azote est ensuite distribué dans l'organisme par l'intermédiaire de la circulation systémique. L'importance de la dissolution dans les différents tissus est fonction de la perfusion du tissu et de son contenu en graisse, l'azote se dissolvant plus facilement dans les tissus riches en graisse.

La saturation est obtenue après un séjour en hyperbarie en pression constante. Elle est caractérisée par l'état d'équilibre entre la pression d'azote dissout dans les tissus et la pression d'azote alvéolaire. Elle est énoncée par la loi de Henry : « La quantité de gaz dissous dans un liquide (C_i) est, à saturation, directement proportionnelle à la pression (P_i) exercée par ce gaz à la surface du liquide » :

$C_i = P_i \cdot S_i$ où S_i est le coefficient de solubilité du gaz dans le tissu.

Cet équilibre n'est pas atteint instantanément. La pression du gaz dissous dans chaque tissu varie en première approximation en fonction du temps selon l'équation de Haldane :

$$P_t = P_0 + (P_i - P_0)(1 - e^{-kt})$$

où : P_t est la pression du gaz dissous dans le tissu à l'instant t ,

P_0 la pression du gaz dissout dans le tissu à l'instant $t = 0$,

P_i la pression du gaz inspiré,

$k = \ln(2)/T$ avec T la période de demi-saturation du tissu.

Lorsque $P_i > P_0$, le gaz se dissout dans le tissu : c'est la phase de dissolution.

Lorsque $P_t = P_i$, l'équilibre est atteint : c'est la saturation.

Lorsque $P_i < P_0$, des molécules de gaz quittent le tissu pour repasser dans la phase gazeuse : c'est la phase de désaturation. Le gaz dissous est dit en état de sursaturation.

7.1.2 La désaturation

Lors de la remontée du plongeur, la pression ambiante diminue et le gradient de pression s'inverse. L'azote se trouve donc en sursaturation, c'est-à-dire en excès de concentration dans les tissus. Il doit être éliminé de l'organisme. C'est la circulation veineuse qui assure l'extraction de l'azote des tissus et son élimination par l'échangeur pulmonaire. Le gaz dissous dans le sang peut être éliminé directement au travers de la barrière alvéolo-capillaire (désaturation monophasique). Mais lorsque la réduction de pression dépasse un certain seuil exprimé selon la théorie de Haldane par le rapport $P/P_H = C_s$ (où P_H est la pression hydrostatique ambiante et C_s le coefficient de sursaturation critique), l'azote peut passer sous forme bullaire avant d'arriver au poumon (désaturation biphasique). Ces phénomènes sont identiques, aux coefficients près, quel que soit le gaz diluant ventilé.

7.1.3 Formation des bulles par sursaturation : une théorie insuffisante

La variation de pression à l'occasion d'une décompression est l'une des raisons primaires de la formation de bulles. La taille et le taux de production des bulles sont déterminés en grande partie par la diffusion du gaz qui dépend non seulement de la différence de pression mais également de la surface d'échange et des constantes de diffusion avec en particulier la solubilité du gaz.

Si la sursaturation en gaz diluant joue un rôle important dans la genèse des bulles, elle n'est pas suffisante. Dès 1944, Harvey constate que le gradient de sursaturation nécessaire à l'apparition de bulles dans un liquide n'est jamais atteint chez l'homme au cours d'une

exposition hyperbare (Harvey 1951). Ce gradient est variable en fonction des liquides et des gaz utilisés.

Les données expérimentales montrent que dans le cas d'un liquide homogène au repos contenant du gaz dissous et reposant dans un récipient de verre parfaitement propre, il est nécessaire d'appliquer des variations de pression de l'ordre de 100 à 1400 atmosphères pour obtenir une phase gazeuse. Clare (Harvey 1951) a sursaturé de l'eau avec l'oxygène à 250 ATA puis ramené la pression à 1 ATA. Il observe que, dans cette eau, un nuage de fines bulles apparaît parfois, suggérant la formation spontanée des bulles dans le liquide loin des parois. Plus récemment avec de meilleures conditions expérimentales, Zheng (Zheng et coll. 1991) observe la formation de bulles de novo dans de l'eau pour une variation de pression de 1400 ATA. La relation avec le type de gaz (et sa solubilité) a aussi été étudiée (Finkelstein & Tamir 1985, Frenkel 1955) : la formation de bulles par sursaturation dans de l'eau requiert 120 ATA pour le méthane, 190 ATA pour l'azote et 350 ATA pour l'hélium.

Chez l'animal et chez l'homme la formation de bulles survient pour des variations de pression bien inférieures. On sait depuis longtemps qu'une diminution de pression de 8 à 1 ATA à l'air comprimé est suffisante chez l'animal endormi pour produire des bulles en grande quantité au niveau vasculaire et tissulaire (Harvey 1951). La formation de bulles après des expositions hyperbares prolongées (48 heures) à des pressions très peu supérieures à la pression atmosphérique (1,3 ATA), et donc avec des gradients de sursaturation très faibles, a aussi été démontrée chez l'homme dans des « maisons sous la mer » (Eckenhoff et coll. 1990). Tout cela évoque l'existence d'autres mécanismes et en particulier la présence de noyaux gazeux c'est-à-dire de phases gazeuses de très petites dimensions à l'état basal chez l'animal et l'homme qui pourraient expliquer la facilité de création des bulles (Daniels et coll. 1984, Harvey 1951).

7.2 Recherche in vivo des noyaux gazeux

7.2.1 Taille des microbulles détectables in vivo

La connaissance de la taille des micronoyaux in vivo est rendue difficile en raison de la difficulté de leur détection. Les techniques employées sont des techniques de microscopie optique ou des techniques d'échosoanographie Doppler qui ne permettent de distinguer que des microbulles.

En microscopie optique on peut mettre en évidence des micro-bulles à partir de 50 - 100 μm (Harris et coll. 1945). Avec l'écho-Doppler, en utilisant une sonde de 5 Mhz, on peut distinguer des microbulles ayant une taille minimum de 40 - 50 μm , mais cette sensibilité est

dépendante de la vitesse du flux de bulle. La vitesse du sang veineux de retour croît de $0,5 \text{ cm.s}^{-1}$ à 20 cm.s^{-1} (Hills 1977) : la sensibilité de détection est la meilleure pour les plus grandes vitesses.

7.2.2 Localisation des noyaux gazeux

De nombreuses données expérimentales suggèrent que la formation de microbulles ne se produit pas dans la cellule ou au sein d'organismes unicellulaires.

Les microbulles sont facilement observables *in vivo* par méthode Doppler dans le sang veineux au cours de la décompression. Pourtant, aucune bulle ne se forme dans un vaisseau ligaturé (veine cave de rats morts) soumis à des variations de pression considérables. Les bulles observables dans le sang veineux proviendraient donc des capillaires au sein des tissus. La formation directe de bulles s'obtient facilement au niveau de la peau, des articulations et de la moelle épinière mais pas au niveau du cerveau et des poumons. Les bulles observables dans ces tissus semblent provenir d'autres sites après migration vasculaire.

Pour Hills, cette disposition à la formation de microbulles résulterait de la richesse en phospholipides, de type surfactant observé en abondance au niveau de la moelle épinière (Hills 1993).

7.3 Mécanismes de formation des noyaux gazeux

La formation de ces noyaux gazeux reposerait sur des principes physiques de nucléation. La nucléation est « homogène » lorsqu'elle procède directement de la dispersion thermodynamique des molécules sous l'effet d'une énergie d'activation ou bien « hétérogène » lorsque le processus de nucléation s'ébauche à partir d'un noyau « hétérogène » qui peut être de natures diverses et variées. Les processus de nucléation hétérogène sont très certainement à l'œuvre dans les organismes vivants car il existe de très nombreuses possibilités de structures irrégulières propices à la nucléation. Par ailleurs les énergies d'activation requises sont bien inférieures à celles exigées dans la nucléation homogène.

7.4 Dissolution des noyaux gazeux

La persistance d'un noyau gazeux nouvellement formé est menacée par deux processus essentiels qui s'exercent à la pression atmosphérique :

- la « fenêtre oxygène », car du fait de la métabolisation de l'oxygène dans les tissus, la pression partielle des gaz contenus dans la microbulle devient supérieure à celle dans le tissu environnant, ces gaz auront tendance à s'échapper de la bulle par diffusion,

- les forces de tension superficielle qui s'exercent entre un liquide et une sphère de gaz ; les gaz contenus dans la microbulle auront également tendance à s'échapper par diffusion.

7.5 Persistance des noyaux gazeux

Deux types de théories s'affrontent pour expliquer la persistance des noyaux gazeux à la pression atmosphérique.

7.5.1 Hypothèse d'un mécanisme de stabilisation des noyaux gazeux

7.5.1.1 Théorie des crevasses hydrophobes de Harvey (Harvey 1951)

Une phase gazeuse est piégée au fond d'un cône inversé ou « crevasse » qui se comporte comme un noyau de nucléation hétérogène. Selon la géométrie de la crevasse (par exemple un espace de jonction intercellulaire), l'interface gaz-liquide devient alors concave avec une inversion du sens de la force de tension superficielle. Celle-ci n'entraîne plus la sortie des gaz par diffusion en dehors du noyau gazeux.

Le modèle du cône inversé a largement été étudié, mais d'autres types de géométrie permettraient également le piégeage de microbulles comme des surfaces poreuses contenant des réseaux de micro-tunnels.

A partir d'études microscopiques sur endothélium, les travaux de Hills soutiennent que la migration et le dépôt de surfactant pulmonaire pourraient être à l'origine de géométries locales favorables au développement des microbulles sur les parois vasculaires (Hills 1992).

7.5.1.2 Théorie des surfaces actives

Hypothèse des surfactants (Yount et coll. 1977)

Dans ce modèle, les microbulles sont entourées de phospholipides de type surfactant. Les noyaux gazeux peuvent ainsi résister à l'écrasement par l'application d'une pression élevée, mais ils redeviennent perméables à la décompression et au retour à la pression atmosphérique. Ce modèle de perméabilité variable ou VPM développé par Yount, s'appuie sur de nombreuses expérimentations à partir de bloc de gélatine.

7.5.2 Théorie de l'équilibre dynamique (Powell et coll. 1992)

Dans ce modèle, les noyaux gazeux sont générés en permanence par l'activité musculosquelettique et éliminés en permanence sous l'action de la fenêtre oxygène et de la tension superficielle. Ce modèle s'appuie sur des observations animales de formation de

microbulles générées uniquement par des mouvements de membres, sur des données humaines de la NASA et des études de simulation de microgravité (« bed-rest »).

Les vaisseaux spatiaux volent en effet avec une atmosphère interne de type terrestre normobare. Lors des opérations de sortie extra-véhiculaire dans l'espace, les scaphandres sont dépressurisés à 300 hPa (9000 m) avec un risque d'ADD important. Pourtant aucun accident n'a été constaté dans l'espace contrairement ce qui se passe au sol pour une même exposition hypobare. Il semble donc que la microgravité ait un effet protecteur sur la formation des bulles, hypothèse confirmée par des études en bed-rest.

La formation des noyaux gazeux se ferait par cavitation, forme particulière de nucléation à partir de gradients de pression négatifs localisés ; cette cavitation est proportionnelle à l'intensité de l'activité musculo-squelettique. La forme et le lieu exact de la cavitation ne sont pas connus :

- les turbulences du sang dans les ramifications vasculaires pourraient générer à l'exercice une cavitation dite de « Reynolds »
- la tribonucléation ou « adhésion visqueuse » se produit lors de la séparation rapide de surfaces solides adhésives laissant une cavité dans le liquide ambiant. Elle pourrait siéger :
 - dans l'arbre vasculaire à l'occasion des mouvements des membres
 - au niveau des surfaces articulaires ; la formation de bulles associée à un son correspond alors au « vacuum phenomenon »
 - au niveau des valves cardiaques ; la formation de bulles a pu être visualisée au niveau de valves mécaniques mais jamais au niveau de valves natives.

7.6 Evolution du noyau gazeux vers la bulle circulante

7.6.1 Croissance (Harvey 1951, Ishiyama 1983)

La croissance des noyaux gazeux ou des bulles de gaz est favorisée par l'augmentation du gradient de pression. Un noyau ou une bulle de gaz se développera ou se rétrécira par diffusion du gaz à travers la frontière gaz-liquide, si la pression réelle du gaz, P , dans le noyau est plus ou moins grande par rapport à la tension de gaz, t . S'il y a deux gaz impliqués, alors les taux relatifs de diffusion peuvent intervenir. Cependant, les molécules de gaz pénètrent dans le noyau dans des proportions qui dépendent principalement de la solubilité des gaz plutôt que de leurs pressions partielles.

La bulle de gaz formée par exemple par cavitation contient un excès d'oxygène par rapport à l'azote, puisque l'oxygène est le gaz le plus soluble. Le dioxyde de carbone, en raison de sa solubilité élevée, sera présent en concentration élevée bien que sa tension dans le liquide puisse être basse.

Si une bulle de N_2 est rapidement entourée par une solution de CO_2 à la même tension, la bulle se développera parce que le CO_2 se répand beaucoup plus rapidement à l'intérieur que l'azote ne peut se répandre à l'extérieur. Ceci est dû à la solubilité plus grande du CO_2 dans l'eau, puisque les constantes de diffusion des deux gaz sont voisines. En général, plus la solubilité et/ou le coefficient de diffusion d'un gaz sont grands, plus la croissance ou le rétrécissement d'une bulle du gaz dans une solution de tension de gaz et de pression hydrostatique donnée est plus rapide.

L'azote, l'oxygène et le dioxyde de carbone entreraient dans la bulle proportionnellement à leur concentration et à un taux dépendant de leur diffusibilité. Les bulles formées dans l'organisme ont une composition qui ne correspond pas aux pressions partielles en N_2 , O_2 et CO_2 sanguine, en outre cette composition gazeuse peut fluctuer de façon rapide.

7.6.2 Coalescence (Hills 1977)

Le délai entre la phase de décompression et l'apparition des symptômes de type bends a été attribué par Hills à la coalescence des microbulles de gaz initialement formées dans la solution. Cet événement repose sur la probabilité que deux bulles se rencontrent et que leur collision soit suffisante pour entraîner leur déformation puis leur fusion. La nature probabiliste de cet événement est compatible avec la distribution aléatoire des symptômes dans le temps. La coalescence de deux bulles semble être grandement accélérée par le mouvement, la contraction musculaire pouvant favoriser cette fusion lors de l'exercice musculaire. Il est en effet observé qu'un exercice pendant ou après la décompression peut aggraver les symptômes.

Le phénomène de coalescence dans le secteur intra-vasculaire est discuté. Pour Harvey, la coalescence intra-vasculaire est de faible probabilité car du matériel protéique et lipidique sanguin forme une couche à la surface des bulles. D'autres études (Waite et coll. 1967) ont vérifié qu'une coalescence intravasculaire pouvait se produire en présence de microbulles bloquées dans des artérioles de faibles diamètres.

7.6.3 Théorie d'évolution du noyau gazeux à la bulle (Hennessy 2002)

Les noyaux gazeux formés par un ou plusieurs mécanismes de nucléation sont stabilisés au niveau des parois endothéliales. Leur croissance dans la lumière vasculaire va dépendre de phénomènes amplificateurs avec en premier lieu la sursaturation mais aussi des mécanismes de cavitation. La cavitation cardiaque est d'autant plus efficace qu'il existe une amorce bullaire à partir de micronoyaux. Son amplification se poursuit au fur et à mesure des cycles cardiaques.

En ce qui concerne la sursaturation, les micronoyaux pénètrent dans différents tissus présentant toute une gamme de valeurs de sursaturation. Au départ le diamètre des noyaux gazeux est trop petit ou la sursaturation des tissus trop faible pour qu'il y ait amplification et capture. Mais au fur et à mesure que la bulle augmente de taille, le gaz diluant des tissus sursaturés va pouvoir diffuser en son sein et majorer sa croissance. Les microbulles pourront être capturées par des tissus lents comme les muscles. Les tissus rapides tels que le système nerveux central seront épargnés car pour une vitesse de décompression habituelle, la pression partielle d'azote aura suffisamment diminué pour que l'amplification et la capture des microbulles ne puissent se produire.

Au niveau du retour veineux, le courant circulatoire collecte le gaz diluant des tissus sursaturés ainsi que le CO₂ issu du métabolisme cellulaire. Il s'agit d'un milieu favorable (à basse pression) pour la croissance des bulles qui peuvent fusionner entre elles par coalescence.

Séquence des événements selon le diamètre des bulles :

Phase 1 : taille inférieure à 20 microns.

Les conditions de croissance des noyaux gazeux sur les parois endothéliales ont déjà été rapportées au paragraphe précédent. Le détachement de ces noyaux gazeux survient quand leur taille s'accroît et devient supérieure au micron ; il s'en suit une dispersion dans tout le corps de manière aléatoire. Tant que la taille de ces germes gazeux reste de l'ordre du micron, ils vont pouvoir réaliser plusieurs boucles circulatoires artério-veineuses et tissulaires sans être arrêtés par la circulation pulmonaire.

Phase 2 : taille supérieure à 20 microns.

A partir de ce stade les bulles deviennent détectables dans le retour veineux par méthode Doppler conventionnelle et non invasive.

La taille des bulles va s'accroître au cours de la décompression avec pour conséquence la capture dans certains tissus et dans le sang veineux. Le diamètre des vaisseaux augmentant, les bulles poursuivent leur chemin jusque dans le cœur droit ; à l'opposé, dans la circulation

artérielle pulmonaire, le calibre des vaisseaux décroît et les bulles vont aller se bloquer dans les capillaires pulmonaires dont le diamètre est estimé à 20 microns.

Phase 3 : travail du filtre pulmonaire.

L'accumulation des bulles dans la circulation pulmonaire entraîne un retard à l'évacuation du gaz diluant et des autres gaz (O₂ et CO₂) présents au sein des bulles. Dans chaque capillaire pris individuellement, la phase gazeuse prend la forme d'un tube de gaz. Pour être évacués dans l'espace alvéolaire, les gaz doivent sortir de ces manchons gazeux et repasser sous forme dissoute avant d'être libérés dans l'espace alvéolaire. Quand la charge bullaire d'amont est importante il peut se produire un échappement de microbulles calibrées à 20 microns sur le versant artériel. Ces bulles artérielles seront le plus souvent sans conséquence pathogène, car leur apparition, généralement marginale, s'effectue après un certain délai qui permet une désaturation suffisante pour les tissus cibles comme le système nerveux central.

8 Accident bullaire initial

(d'après Blatteau et coll. 2006)

La physiopathologie des accidents de décompression n'est pas totalement comprise et des théories différentes s'affrontent selon la localisation des lésions. Quelles que soient les hypothèses, le *primum movens* admis par tous est le phénomène bullaire secondaire à la désaturation en gaz diluant des tissus. Les bulles tissulaires sont stationnaires, elles peuvent s'observer dans les localisations suivantes : les tissus cutanés, les tendons, capsules articulaires et tissus osseux, les liquides péri- et endo-lymphatiques de l'oreille interne. Les bulles intra vasculaires sont responsables des accidents de désaturations les plus fréquents et les plus graves : accidents neurologiques cérébraux et médullaires, accidents cochléo-vestibulaires, « chokes ». Ils sont initialement liés à la présence excessive de bulles intravasculaires. Le dépassement de la capacité d'épuration en bulles par le poumon peut engendrer des accidents en amont par stase veineuse localisés au niveau médullaire, et/ou des accidents en aval par embolisation artérielle paradoxale au niveau céphalique, par l'intermédiaire d'un shunt cardiaque ou pulmonaire (Figure 10).

L'accident bullaire initial est caractérisé par des effets mécaniques directs. On peut distinguer :

- La compression : la dilatation de la bulle dans un espace limité va comprimer les structures et tissus alentour. Si un filet nerveux passe dans le voisinage, il sera

comprimé et une douleur apparaîtra. S'il s'agit d'un vaisseau sanguin, l'expansion de la bulle peut aller jusqu'à l'interruption de la circulation sanguine.

- L'oblitération : si le vaisseau obturé fait partie d'un réseau anastomotique, la circulation pourra se faire par les autres capillaires et les conséquences seront minimales, à moins qu'un grand nombre de vaisseaux ne soient bloqués, aboutissant à l'ischémie globale du territoire. Si la bulle oblitère un vaisseau terminal, c'est l'ischémie d'emblée, avec anoxie et acidose et le cercle vicieux qu'elle entraîne. La pathologie sera donc fonction de la localisation et du type de tissu atteint.
- La dilacération : si la bulle apparaît dans l'*interstitium* d'un tissu anisotrope (qui n'a pas les mêmes qualités dans toutes les directions de l'espace) comme un tendon, la dilatation de la bulle dilacère le tissu, créant une dissection.
- L'abrasion : si la bulle est intravasculaire, sa dilatation va endommager l'endothélium et mettre à nu le sous-endothélium ce qui a pour conséquence d'initier une cascade de réactions biochimiques caractéristiques de la maladie de décompression.

9 Aspects microcirculatoires de la maladie de la décompression

(d'après Méliet 1999)

En 1961, Laborit et Barthélémy décrivaient les phénomènes qui, au niveau tissulaire, accompagnent la présence de bulles dans le réseau vasculaire : amas plaquettaires, floculats plasmatiques, thromboses, vaso-constriction, stase circulatoire, extravasion, œdèmes interstitiels, aboutissant à l'anoxie tissulaire. Ce sont là tous les signes de ce que l'on a appelé depuis la maladie de la décompression.

La particularité de cette maladie réside en ce que son facteur déclenchant est ubiquitaire. En effet, les méthodes modernes de détection des bulles montrent que leur taille va de 10 à 500 μm de diamètre. Elles sont donc capables de s'infiltrer dans les réseaux capillaires pulmonaires, où se produit normalement leur élimination, ou systémiques, où elles exercent leurs effets délétères. Elles sont en contact avec le contenu (plasma et éléments figurés) et le contenant : les parois vasculaires, c'est-à-dire l'endothélium. Ce tissu particulier constitue un organe de 100 g grammes ayant une surface d'échange de 1000 m^2 .

9.1 Interactions bulles-paroi

9.1.1 Mise à nu de la lame basale

Au niveau de la paroi vasculaire, les bulles peuvent abraser l'endothélium (Nossum et coll. 1999), mettant à nu les protéines de la lame basale, en particulier le facteur de von Willebrand (vWF). Or, à la surface de la membrane des plaquettes, se trouvent des récepteurs (glycoprotéines GPIa, Ib, Ic) de la famille des intégrines les reconnaissant. Leur activation entraîne l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium et leur activation.

9.1.2 Activation des cellules endothéliales

Le contact des bulles sur la membrane endoluminale des cellules endothéliales provoque leur activation. A l'état normal au repos, les cellules endothéliales inhibent l'activation du système de coagulation. En revanche, lorsqu'elles sont activées, elles deviennent thrombogènes et activent les plaquettes et les leucocytes. L'équilibre des facteurs contrôlant la vasomotricité est modifié : inhibition des facteurs relaxants (NO synthase et PGI₂ (prostacycline) synthétase), libération de facteurs constricteurs (prostaglandine PGH₂, thromboxane TXA₂, endothélines). Il se produit en même temps une rétraction des cellules endothéliales qui libèrent des pores intercellulaires favorisant l'extravasation plasmatique.

9.2 Interactions bulles-plasma

A l'interface bulle-plasma se produit un réarrangement des macromolécules entraînant une modification des charges électriques, avec création d'une couche électronégative de quelques centaines d'Angströms. Ce déséquilibre active une voie de l'hémostase, le système de contact ou *voie intrinsèque*.

Ce système est en fait pré-coagulant. Son activation seule n'est pas suffisante pour entraîner une coagulation. Il rend disponible le facteur VIIa qui, en présence de facteur tissulaire (libéré par l'endothélium activé), conduira à la fibrinof ormation par la *voie extrinsèque*. Par ailleurs il active le complément. Des élévations de la concentration des fractions C3a, C4a et C5a du complément ont été mesurées par Ward et coll. (1987) après bullage in vitro dans du sang complet et retrouvées in vivo après décompression (Hjelde et coll. 1995, Pekna & Ersson 1996).

9.3 Interactions avec les éléments figurés du sang

9.3.1 Les plaquettes

Les plaquettes sont activées au contact de la matrice sous-endothéliale ou par divers médiateurs. Elles expriment à la surface de la membrane des glycoprotéines favorisant l'agrégation et le facteur tissulaire. La surface membranaire devient procoagulante et accélère

l'activation du facteur X et la formation de thrombine, qui à son tour active d'autres plaquettes. Elles libèrent des médiateurs vasoconstricteurs (endoperoxydes, TXA₂).

Des variations du taux de plaquettes circulantes ont été rapportées dans les phénomènes de décompression à partir de 1969 (Philp & Gowdey 1969). Elles ont été depuis régulièrement retrouvées et étudiées (Giry et coll. 1977, Boussuges et coll. 1998).

9.3.2 Les leucocytes

Les leucocytes sont mis en jeu lors de la maladie de décompression (Bernigaud 1995, Buttolph et coll. 1996). Ils reçoivent des signaux en provenance des cellules endothéliales (IL-1, IL-6, TNF- α), des plaquettes (thrombine) ou du système de contact (bradykinine, complément).

Leur activation entraîne leur adhésion à la paroi vasculaire et conduit aux phénomènes inflammatoires locaux. L'expression des β 2-intégrines à la surface des leucocytes leur permet de migrer vers l'espace extravasculaire.

9.3.3 Les hématies

Des modifications de l'agrégabilité des hématies ont été observées lors d'accidents de désaturation (Wells et coll. 1971), avec formation de rouleaux d'hématies. Les macromolécules plasmatiques d'origine inflammatoire (α 2-macroglobulines) et le fibrinogène participent à cette agrégabilité.

9.3.4 Mise en jeu du système immunitaire

Le système immunitaire est activé par les médiateurs libérés lors des différentes interactions. Le système du complément est activé par le système de contact (Ward et coll. 1987).

9.4 Conséquences microcirculatoires de la maladie de la décompression

On assiste à une réduction du débit capillaire à l'origine d'une ischémie, un œdème par fuite plasmatique, parfois une nucléation in situ de molécules de gaz en sursaturation. Ces phénomènes sont entretenus et aggravés par l'activation des plaquettes et l'instauration d'un état de pré-coagulation. Ils sont compliqués par le développement d'un état inflammatoire secondaire.

Le résultat est différent selon la circulation, systémique ou pulmonaire.

9.4.1 Constriction des fibres musculaires lisses artériolaires et précapillaires

La réduction du débit sanguin local a pour conséquence une perturbation grave de la délivrance d'oxygène :

$$DO_2 = Q * CaO_2$$

Délivrance O₂ (mole.min⁻¹) = débit sanguin (l.min⁻¹) * contenu artériel en O₂ (mole.l⁻¹)

La PO₂ la plus basse du réseau se trouve en fin de capillaire, à l'extrémité veineuse : c'est là que l'anoxie se développera d'abord. C'est ce qui explique la topographie des lésions ischémiques de la substance blanche des accidents médullaires. Cette ischémie locale varie en fonction des modifications vasomotrices qui réalisent de véritables syndromes d'ischémie-reperfusion, générateurs d'espèces réactives de l'oxygène.

L'arrêt circulatoire retentit également sur les échanges de gaz diluants : en l'absence de drainage, des bulles peuvent se former in situ et ajouter leurs effets compressifs, particulièrement dans le canal rachidien (Francis et coll. 1988).

9.4.2 Constriction des fibres musculaires lisses postcapillaires

Elle fait suite à l'agression endothéliale. La diminution du débit entraîne une augmentation du temps de résidence et de la pression de filtration. L'activation endothéliale ouvre des portes intercellulaires. Il apparaît donc un œdème avec recrutement inflammatoire interstitiel (mastocytes).

9.4.3 Cas particulier de la circulation pulmonaire

Les bulles sont normalement éliminées par le poumon au cours du dégazage normal (Butler & Hills 1979), sans déclencher de maladie de décompression.

L'endothélium pulmonaire est très riche en prostacycline. Pour Masurel (1987), la sécrétion de prostacycline PGI₂ explique l'absence d'agrégation plaquettaire à la périphérie des bulles et permet leur migration et leur redissolution pendant leur court séjour dans la circulation pulmonaire. L'ADD surviendrait lorsque le flot de bulles, trop important, dépasse les capacités de sécrétion de prostacycline ou en épuise le stock. De même, les différences de susceptibilité individuelle devant le dégazage pourraient être liées à une différence de disponibilité de la PGI₂. Au-delà d'un certain seuil, la sécrétion de PGI₂ est inhibée et les endothélines s'expriment localement (hypertension artérielle pulmonaire). Leur durée de vie est assez longue pour être distribuée à l'ensemble de l'organisme, avec les produits d'activation de la coagulation et des processus immunologiques : la maladie de décompression d'origine pulmonaire est une maladie générale. Elle est à l'origine des accidents médullaires.

Conclusion

La maladie de la décompression est une maladie à point de départ endothélial et plaquettaire, impliquant des processus différents en fonction du temps : la dysfonction endothéliale et plaquettaire se produit dans les cinq premières minutes, l'adhésion leucocytaire apparaît dans les 20 minutes et la migration leucocytaire intervient dans les trois heures après l'activation initiale. Elle intéresse l'ensemble de l'organisme, et s'auto entretient.

MATERIELS ET OUTILS METHODOLOGIQUES

1 Population d'étude

1.1 Etudes animales

Toutes les procédures impliquant des animaux de laboratoire étaient en accord avec les règles de l'Union Européenne (Directive n°86/609) et la loi française (Décret n°87/848). Le comité d'éthique de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées a approuvé cette étude. Notre investigateur détient l'agrément numéro 83.6 délivré par la Direction de la Sécurité et de la Santé de notre département, comme exigé par la loi française (articles R.214-93, R-214-99 et R.214-102 du Code Rural).

Seuls des rats Sprague-Dawley mâles (laboratoire Charles River, France) ont été utilisés dans cette étude afin d'éviter les fluctuations dues aux cycles hormonaux féminins. Les rats ont été gardés dans une salle de soins dédiée à $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ avec un cycle jour/nuit de 12h00/12h00 (lumières allumées à 7h00). Avant le début de l'étude, les rats ont reçu une alimentation standard (granulés de 12 mm de diamètre, Global Diet 2018, Harlan, Italie) et de l'eau ad libidum.

Des études précédentes ont montré que la formation de bulles et l'incidence de l'ADD dépendaient grandement de la masse corporelle des rats (Berghage et coll 1979, Montcalm-Smith et coll 2008). Les protocoles utilisant des rats d'une masse corporelle supérieure à 350 g produisaient des accidents de désaturation sévères avec des signes neurologiques évidents et la mort. Nous avons reçu plusieurs lots de rats. Les lots ont été hébergés au minimum jusqu'à un âge de 12 semaines pour une masse cible supérieure à 350 g lorsque l'objectif était d'obtenir des signes neurologiques évidents voire la mort. Les lots ont été hébergés jusqu'à un âge de 10 semaines pour une masse cible inférieure à 350 g lorsque l'objectif était d'obtenir des manifestations non létales, pas nécessairement objectivables par notre examen clinique, permettant l'étude de perturbations biologiques en lien avec l'ADD.

1.2 Etude chez l'homme

Nous avons proposé à tous les plongeurs, adressés à notre centre (Service de Médecine Hyperbare et d'Expertise Plongée, Hôpital d'Instruction des Armées Sainte Anne, Toulon, France) entre mai 2013 et août 2015 pour un accident de plongée lors d'une plongée à l'air, de

participer à notre étude. Le critère d'inclusion était la survenue d'un ADD neurologique (groupe « plongeurs accidentés »). Le diagnostic d'ADD était posé par un médecin de notre centre, spécialiste en médecine de la plongée, à partir des données de l'anamnèse et de l'examen clinique. Tous les plongeurs qui nous ont été adressés ont accepté de participer à l'étude. Afin de tenir compte du cycle circadien de la fermentation intestinale (Le Marchand et coll. 1992) et de manière à éviter une trop grande disparité des prises alimentaires avant la plongée, nous n'avons retenu que les plongeurs qui avaient plongé le matin avant le déjeuner. Nous avons également exclu les plongeurs qui avaient déjeuné entre la sortie de l'eau et leur arrivée à notre centre. Au total, nous avons inclus 39 « plongeurs accidentés ».

Pour le groupe contrôle des « plongeurs sains », nous nous sommes rendus à 4 reprises dans un centre de plongée loisir (Espace Mer, Hyères, France), entre mai 2013 et août 2015, afin de réaliser des mesures à la sortie de l'eau après des plongées à l'air réalisées le matin avant le déjeuner. Toutes les plongées étaient conformes à une procédure de décompression propre à chaque plongeur, et les plongeurs étaient asymptotiques à la sortie de l'eau. Seuls 2 plongeurs ont refusé de participer à notre étude, alors que 39 « plongeurs sains » ont accepté d'y participer.

Tous les plongeurs qui ont participé à l'étude ont répondu à un questionnaire à l'issue de leur plongée (cf. Annexe 1).

Le protocole d'étude a été approuvé par le comité d'éthique local (Hôpital d'Instruction des Armées Sainte Anne, Toulon, France) et tous les plongeurs ont donné leur consentement éclairé par écrit.

2 Protocole de plongées expérimentales des rats

Des lots de 8 rats, répartis dans 2 cages et libres de leurs mouvements, étaient soumis à un protocole de compression/décompression dans un caisson de 200 litres équipé de 3 hublots pour l'observation.

On a utilisé une décompression par paliers, susceptible de causer des lésions ischémiques de la moelle épinière de gravité variable chez le rat (Pontier et coll. 2008, Blatteau et coll. 2013). Ce protocole permet de se rapprocher de l'ADD observé chez l'homme. En effet, l'ADD médullaire est fréquent en plongée loisir, et survient, dans la majorité des cas, en l'absence de faute de procédure ou de remontée rapide (Blatteau et coll. 2010).

Les rats ont été soumis à une compression à l'air à une vitesse de $10 \text{ kPa}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à une pression de 100 kPa, puis à une vitesse de $100 \text{ kPa}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à une pression de 1000 kPa (90 mètres), maintenue pendant 45 min. A la fin du palier, la décompression a été amorcée

jusqu'à 200 kPa à une vitesse de 100 kPa.min⁻¹ avec un palier de 5 min à 200 kPa, un palier de 5 min à 160 kPa, et un palier de 10 min à 130 kPa (Figure 11). La décompression entre 200 kPa et la surface était pratiquée à une vitesse de 10 kPa.min⁻¹. La vitesse de décompression était contrôlée automatiquement par un ordinateur relié à un convertisseur Analogique/Numérique (NIUSB-6211®, National Instrument, USA), relié lui-même à une électrovanne (Belino LR24A-SR®, Suisse) et à un capteur de pression (Pressure Transmitter 8314, Burket Fluid Control System, Allemagne). Le programme utilisé pour contrôler la vitesse de décompression a été conçu sur DasyLab (DasyLab®, National Instrument, USA) par notre ingénieur.

L'air comprimé était produit par un compresseur de plongée (Mini Verticus III, Bauer Comp, Allemagne) relié à une bouteille tampon de 100 litres à 3.10⁴ kPa. L'analyseur d'oxygène utilisait sur une cellule électrochimique avec pile à combustible (G18007 Teledyne Electronic Technologies/Analytical Instruments, USA). La vapeur d'eau et le dioxyde de carbone produits par les animaux étaient captés respectivement avec du seccagel (humidité relative : 40-60%) et de la chaux sodée (CO₂ < 300 ppm). Les gaz ont été mélangés par un ventilateur électrique. Le cycle jour/nuit a été respecté. La température à l'intérieur du caisson a été mesurée en utilisant une sonde de température à résistance de platine (Pt 100, Eurotherm, France). Toutes ces variables étaient contrôlées par un ordinateur dédié.

3 Exploration de la fermentation intestinale

3.1 Mesure de l'hydrogène dans l'air expiré

Les cellules de mammifère ne sont pas capables de produire de l'hydrogène. L'hydrogène retrouvé au niveau du côlon provient de la fermentation bactérienne, d'hydrates de carbone non résorbables principalement, et de glycoprotéines d'origine endogène (Newman 1974). L'hydrogène absorbé par l'intestin n'est pas métabolisé mais excrété dans l'air expiré (Scaldaferri et coll. 2013). Ainsi, la mesure de l'hydrogène dans l'air expiré est un reflet de l'hydrogène produit par fermentation bactérienne dans l'intestin et diffusant dans l'ensemble de l'organisme par voie sanguine (Figure 12).

La mesure de l'hydrogène a été assurée au moyen d'un analyseur d'hydrogène expiré portable (Gastrolyser®, Respur International, France).

3.1.1 Etudes animales

Pour mesurer l'hydrogène dans l'air expiré, nous avons considéré que la ventilation minute était constante dans le temps, identique pour tous les rats, et égale à 225 ml.min⁻¹. Nous avons

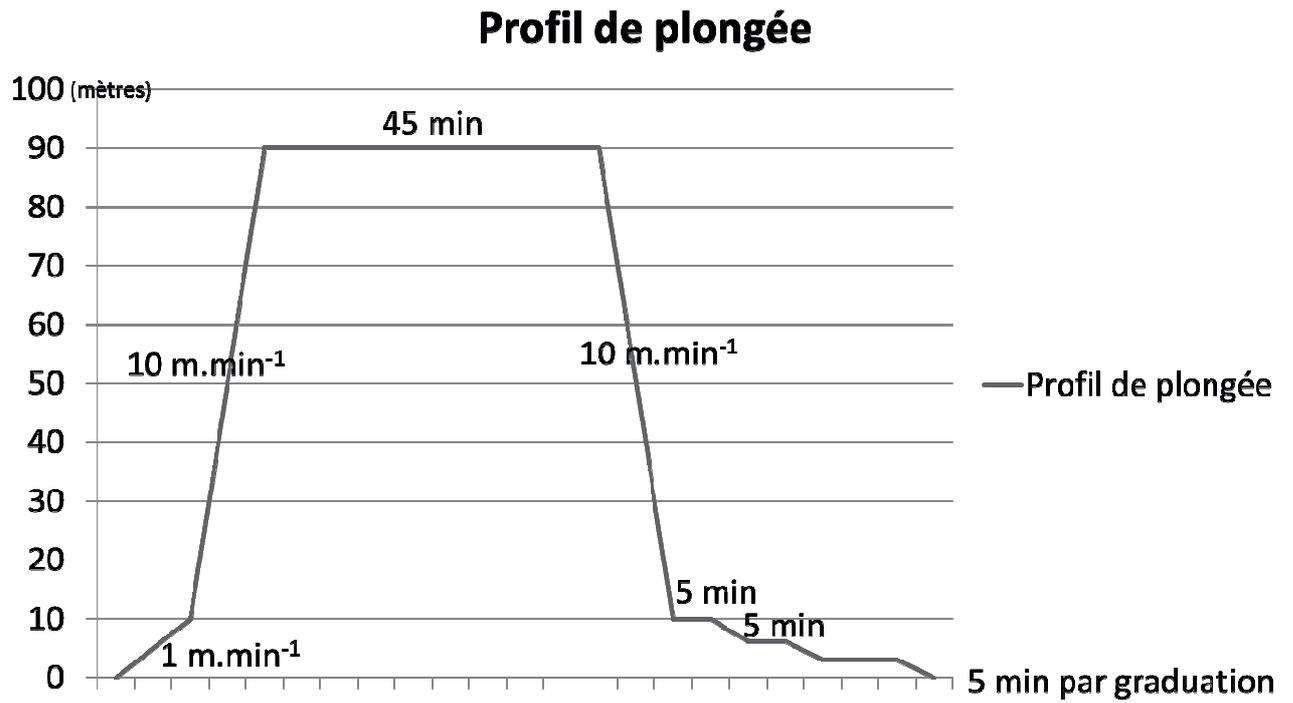


Figure 11 : Profil de plongée expérimentale utilisé chez les rats.

retrouvé dans la littérature une valeur au repos de $27,27 \pm 2,39 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (moyenne \pm écart-type) pour les rat Sprague-Dawley (Strohl et coll 1997). Afin de tenir compte du stress expérimental généré par la mesure des gaz, nous avons choisi pour la ventilation minute des rats une valeur qui approxime 2 fois celle des données de la littérature pour un rat de 400 g, au repos non stressé.

Pour chaque mesure, les rats étaient introduits individuellement dans des cylindres en polychlorure de vinyle (PVC) de 75 mm de diamètre intérieur et de 200 mm de longueur (soit 883 ml de volume intérieur), préalablement lavés à l'eau et séchés. Les deux extrémités du cylindre étaient fermées hermétiquement par des disques en plastique percés en leur centre d'un orifice permettant l'admission d'air d'un côté du cylindre et le recueil de d'air de l'autre côté. La circulation d'air était assurée au moyen d'un aérateur dédié (Rena Air 200®, France) à un débit constant de 225 ml/min, contrôlé par la montée d'une bulle de savon dans une éprouvette renversée et percée en son fond de 100 ml (Figure 13).

Après un délai de 5 min, nécessaire aux gaz de s'homogénéiser à l'intérieur du cylindre tout en tenant compte de l'espace mort (volume non occupé par le rat à l'intérieur du cylindre), nous avons mesuré l'hydrogène (en ppm) dans l'air à la sortie du cylindre.

3.1.2 Etude chez l'homme

A l'issue du premier examen clinique, l'hydrogène dans l'air expiré a été mesuré chez tous les « plongeurs accidentés » adressés à notre centre. La même mesure a été réalisée chez les « plongeurs sains » sur le bateau support de plongée. Dans tous les cas, la mesure a été réalisée 1 à 4 heures après la sortie de l'eau.

Le protocole de mesure était le suivant. Après avoir respiré librement en air ambiant pendant au moins 2 minutes, le plongeur devait prendre une grande inspiration et tenir l'apnée pendant 15 secondes. En fin d'apnée, le plongeur devait souffler le plus lentement possible dans un embout buccal, en essayant de vider complètement ses poumons. La valeur de la concentration d'hydrogène (en ppm) s'élevait progressivement sur l'écran de l'analyseur. La valeur la plus élevée, restant affichée sur l'écran en fin d'expiration, est celle que nous avons retenue pour notre étude.

3.2 Validité de la méthode utilisée chez l'homme

La mesure d'hydrogène dans l'air expiré était une estimation de la fermentation intestinale en cours. Les processus qui interfèrent avec l'excrétion d'hydrogène, pouvant rendre l'estimation moins précise, ont été contrôlés.

L'échantillonnage des gaz expirés représente une phase primordiale de la mesure. La mesure de l'hydrogène doit être réalisée sur de l'air alvéolaire, qui a été en contact avec du sang à l'intérieur des alvéoles. La procédure d'échantillonnage des gaz doit éviter les interférences avec les espaces morts respiratoires. La première partie de l'air expiré est en effet simplement un drainage des voies respiratoires remplies par de l'air ambiant, inhalé lors de l'inspiration précédente. La procédure utilisée, comprenant une inspiration maximale, une période d'apnée de 15 s, et enfin une expiration complète dans l'appareil était capable de réduire sensiblement la variabilité des mesures, une période d'apnée de 15 s garantissant des échanges respiratoires complets (Gasbarrini et coll. 2009).

L'hydrogène dans l'air expiré est modifié par la fréquence respiratoire. Il existe une réduction de la concentration d'hydrogène pendant une hyperventilation. La concentration est réduite durant une activité physique et augmente pendant la phase de récupération. En conséquence, à la sortie de l'eau et pendant la mesure, le plongeur devait être au repos (Gasbarrini et coll. 2009).

De nombreux gaz sont produits par la combustion du tabac dont l'hydrogène qui peut atteindre jusqu'à 2%. Le tabagisme interfère de façon importante avec la mesure d'hydrogène dans l'air expiré et devait être évité avant toutes les mesures (Gasbarrini et coll. 2009).

Le microbiote de la cavité buccale peut fermenter les hydrates de carbone administrés par voie orale, interférant ainsi avec la mesure de la production d'hydrogène intestinale (Gasbarrini et coll. 2009). Nous avons exclu tous les plongeurs qui avaient déjeuné entre la sortie de l'eau et le moment de la mesure d'hydrogène.

4 Classification des accidents de désaturation

4.1 Evaluation neurologique des rats

A la fin de la décompression, les rats ont été transférés dans des cages individuelles, et observés, sans contrainte, pendant 30 minutes par un personnel expérimenté, ignorant du traitement. On a considéré les signes suivants comme des manifestations d'ADD : déficits moteurs ou difficultés à se déplacer (incluant la boiterie, la difficulté à maintenir l'équilibre, la marche sur le côté, la chute, la difficulté de redressement après une chute), et la mort. On considérait que les rats avaient un déficit moteur quand ils n'atteignaient pas le niveau 4 du « Score Moteur » présenté par Gale et coll. (Gale et coll. 1985). On a enregistré le moment de survenue de ces signes.

On a également évalué plus finement une potentielle atteinte neurologique par un test de marche sur planchette. Nous avons utilisé sept planches de bois de différentes largeurs (7,7-1,7 cm), qui mesuraient 1,5 m de long et qui étaient élevées 110 cm au-dessus du sol. Les rats ont été placés en premier sur la planche la plus large, et on a observé la capacité à traverser la planche sans que le pied glisse au cours de deux essais. On a répété la procédure sur des planches de plus en plus étroites. On a retenu la planche la plus étroite sur laquelle le rat pouvait marcher, correspondant à un score de 0 à 7 (von Euler et coll. 1996). Lorsque le rat était mort, on a attribué un score de 0.

4.2 Evaluation clinique des plongeurs

Tous les plongeurs qui ont été inclus dans nos études ont été examinés par un des médecins du Service de Médecine Hyperbare et Expertise Plongée de l'Hôpital d'Instruction des Armées Sainte Anne, spécialiste en médecine de la plongée. Les « plongeurs accidentés » étaient à nouveau examinés à l'issue de la première séance d'oxygénothérapie hyperbare et à la sortie d'hospitalisation.

Le diagnostic d'ADD neurologique était posé devant la description de troubles neurologiques subjectifs (paresthésies, dysesthésies, engourdissement) associés ou non à un examen neurologique anormal (faiblesse musculaire, hypoesthésie, ataxie, dysfonctionnement de la vessie, troubles des fonctions supérieures ou du langage, troubles visuels), au décours d'une plongée saturante à l'air, après avoir éliminé un barotraumatisme pulmonaire (absence de difficultés respiratoires, d'hémoptysies, de toux, de pneumothorax, d'emphysème sous-cutané). Par ailleurs, chez tous les plongeurs souffrant d'un accident neurologique avec des troubles subjectifs persistants ou avec un examen neurologique initial anormal, une IRM médullaire et/ou cérébrale a été réalisée pour confirmer le diagnostic, éliminer un diagnostic différentiel, et rechercher des facteurs favorisants anatomiques.

Le risque d'évolution défavorable à la prise en charge initiale a été déterminé par le calcul d'un score de gravité, coté de 0 à 22 (Blatteau et coll. 2010). Ce score tient compte de l'âge du plongeur, de la présence d'une douleur vertébrale, de l'évolution de la symptomatologie sous oxygénothérapie normobare, de l'existence de signes objectifs sensitifs ou moteurs, et d'une atteinte vésico-sphinctérienne. Un score supérieur à 8 est considéré comme à risque d'évolution défavorable.

5 Numérations des éléments figurés du sang

Les numérations ont été réalisées au moyen d'un analyseur automatique (ABCvet®, SCIL, France) 4 heures avant la mise en pression et 30 min après la sortie du caisson. Les globules rouges, l'hématocrite, les leucocytes et les plaquettes ont été dénombrés dans des échantillons de 20 µl prélevés au niveau de l'extrémité de la queue et dilués dans un volume équivalent d'EDTA à 2 mmol.l⁻¹ (Sigma, France).

6 Examens et prélèvements réalisés après anesthésie des rats

Les rats ont été anesthésiés 30 min après la sortie du caisson au moyen d'une injection intra péritonéale d'un mélange de 10 mg.kg⁻¹ de xylazine (Rompum® 2%, Bayer Pharma, Allemagne), de 100 mg.kg⁻¹ de kétamine (Imalgène®1000, Merial, France) et de 1,65 mg.kg⁻¹ d'acépromazine (Calmivet®, Vetoquinal, France).

A la fin de l'étude, les rats ont été sacrifiés par une injection intra péritonéale de pentobarbital (200 mg.kg⁻¹, Sanofi Santé, France).

6.1 Cytokines inflammatoires circulantes et marqueurs du stress oxydant

Juste après l'anesthésie, on a prélevé des échantillons de sang des rats par ponction directe intra-aortique, afin de déterminer les concentrations plasmatiques d'IL-1β, d'IL-6, de Thiobarbituric Acid Reactive Substances et de glutathion peroxydase. Le sang était collecté dans des tubes stériles de 4 ml contenant de l'héparine de lithium (BD Vacutainer®, BD-Plymouth, UK). Dans les 30 min, on a obtenu du plasma par une simple centrifugation à 1200 g et à 4°C pendant 15 min. On a stocké le surnageant à -80°C jusqu'à l'analyse. En ce qui concerne les Thiobarbituric Acid Reactive Substances, on a dû déprotéiner le plasma avant le stockage. On a transféré 100 µl de plasma dans un micro tube de 1,5 ml. On a ajouté 200 µl de TCA glacé à 10%. Après 5 min d'incubation, on a centrifugé le micro tube à 14000 RPM pendant 5 min. Comme précédemment, le surnageant a également été stocké à -80°C jusqu'à l'analyse.

On a réalisé la détection des cytokines inflammatoires circulantes et des marqueurs du stress oxydant avec un Bioplex100 (BioradInc, CA, USA) et des kits d'immunodosage : Rat IL-1β ELISA Kit, Rat IL-6 ELISA Kit (Sigma-Aldrich, MO, USA), QuantiChrom TBARS Assay Kit et EnzyChrom Glutathione Peroxidase Assay Kit (BioAssay Systems, CA, USA). Les échantillons, les normes et les contrôles de qualité ont été effectués en utilisant deux doublons par point. Toutes les normes et les contrôles de qualité ont été préparés comme recommandé dans les kits.

6.2 Prélèvement du caecum

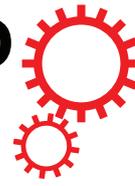
Juste avant le sacrifice des rats, le caecum était séparé du reste du tube digestif après réalisation d'une ligature. Il était ensuite pesé. Enfin, on l'ouvrait au moyen d'un scalpel et on effectuait un examen visuel de son contenu.

7 Analyses statistiques

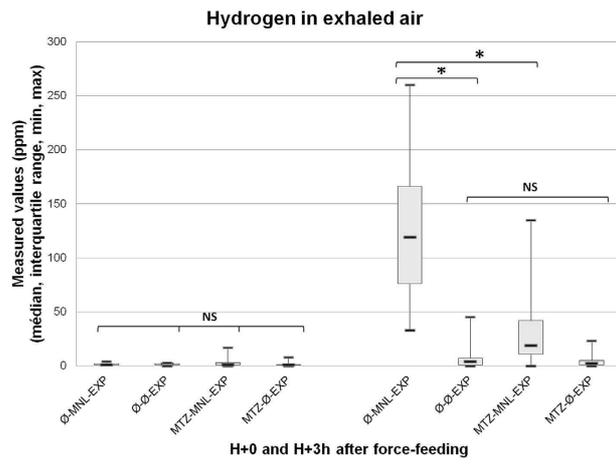
Les résultats numériques ont été exprimés en moyenne \pm écart type ou en médiane [intervalle interquartile] pour les variables quantitatives, et en pourcentage [intervalle de confiance à 95%] pour les variables dichotomiques. Un tableau de contingence a été utilisé pour les tests d'indépendance et d'association, couplé à un test de Fisher exact ou de Khi ². Un test t de Student ou un test de Mann-Whitney ont été utilisés pour analyser les différences entre deux groupes non appariés, et un test de Wilcoxon pour les comparaisons au sein des groupes appariés. Un test de Spearman a été réalisé pour rechercher des corrélations. Une courbe ROC avec l'aire sous la courbe correspondante a été réalisée pour déterminer la mesure la plus élevée des valeurs d'hydrogène expiré permettant de prédire la survenue d'un ADD neurologique chez l'homme ; la spécificité et la sensibilité ont été obtenues en utilisant des seuils prédéfinis. Des Odds ratio avec un intervalle de confiance à 95% ont été calculés si besoins. Une différence était considérée comme significative pour une p-value < 0,05. Pour le traitement statistique, nous avons utilisé le logiciel XLSTAT-Pro® (Addinsoft, Paris, France).

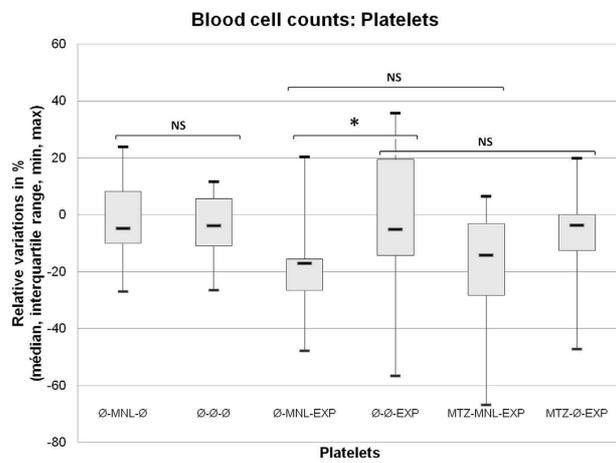
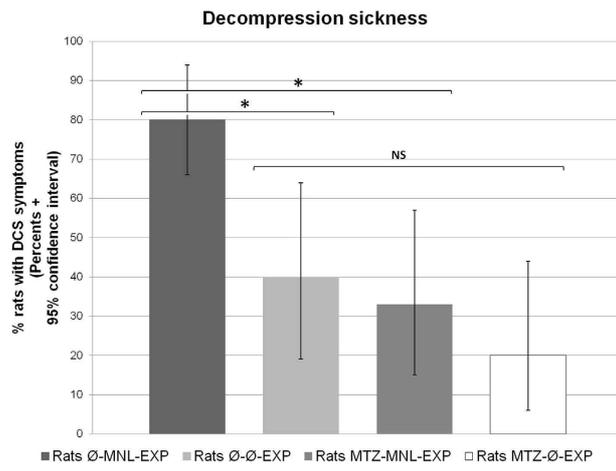
CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE

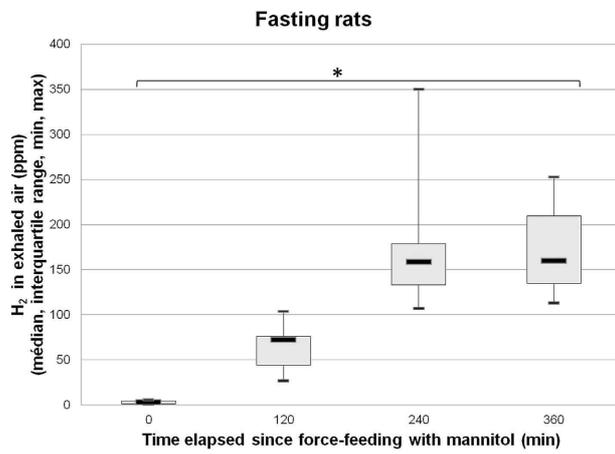
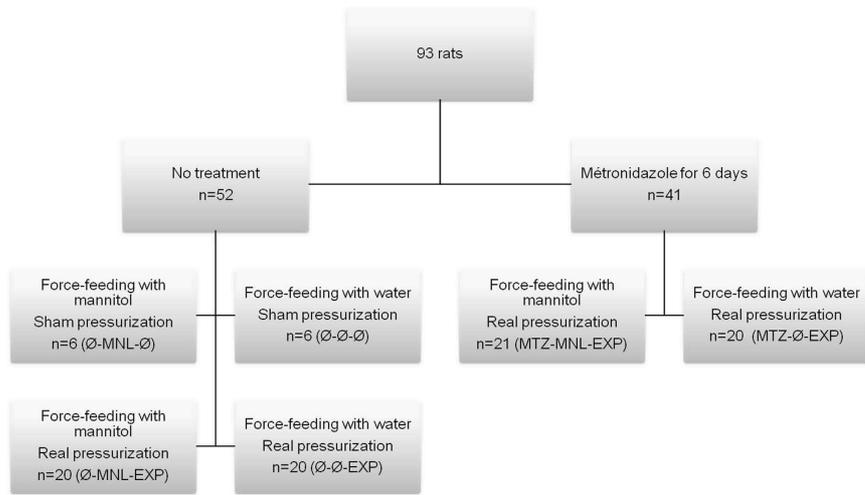
SCIENTIFIC REPORTS



OPEN









2 Présentation de notre deuxième étude (acceptée le 08/09/2016)

de Maistre S, Vallee N, Gempp E, et al. Gut Fermentation Seems to Promote Decompression Sickness in Humans. J Appl Physiol (1985) 2016:jap 00503 02016.

2.1 Hypothèses de l'étude

Nous avons montré, au cours de plongées à l'air chez le rat, que la fermentation bactérienne de sucres non digérés, au moment de la plongée, s'accompagne d'une plus grande incidence des accidents de désaturation (de Maistre et coll. 2016a).

Certains aliments sont connus pour provoquer la production de gaz (Azpiroz F et Malagelada 2005, Hartmeier et Fried 2001). Par ailleurs, un certain nombre de pathologies digestives sont connues pour entraîner une fermentation intestinale plus importante chez l'homme : malabsorption des glucides primaire ou secondaire (Ducrotté 2009), syndrome du grêle court (Briet et coll. 1995), pullulation microbienne intestinale (Perman et Modler 1982, Triantafyllou et coll. 2015), syndrome de l'intestin irritable avec (Lin HC 2004, Triantafyllou et coll. 2015) ou sans SIBO (King et coll. 1998, Shah et coll. 2010, Kumar et coll. 2010). La production de gaz par fermentation est accrue chez les patients présentant des flatulences (Rao 1997) ou des ballonnements (King et coll. 1998). Enfin, la prise de laxatifs modifie la composition du microbiote intestinal et peut donc également influencer la fermentation intestinale (Gilat et coll. 1978, Urita et coll. 2003, Altomare et coll. 2014, Kashyap et coll. 2013). Il en va de même pour la prise d'antibiotiques (Gasbarrini et coll. 2009).

Tous ces facteurs pourraient être à l'origine d'une variabilité de la fermentation intestinale chez l'homme au moment de la plongée. Cette variabilité de la fermentation intestinale pourrait influencer directement sur le risque d'accident de désaturation.

2.2 Objectifs de l'étude

Le but de notre étude était d'évaluer, chez l'homme, si la fermentation intestinale, au moment de la plongée, pouvait favoriser la survenue d'un accident de désaturation, diagnostiqué cliniquement. Nous voulions par ailleurs rechercher les facteurs à l'origine d'une plus grande fermentation au moment de la plongée.

2.3 Principaux résultats de l'étude

Notre étude a permis de mettre en évidence, chez l'homme, que l'hydrogène dans l'air expiré est plus élevé au décours d'une plongée au cours de laquelle est survenue un accident de désaturation qu'après une plongée sans accident associé, avec respect d'une procédure de

décompression. Cela laisse penser que la fermentation intestinale pourrait être plus importante, au moment de la plongée, chez les plongeurs accidentés. Cependant, la prise d'aliments à haut potentiel de fermentation n'était pas plus importante que chez les plongeurs non accidentés. Les populations de plongeurs ne différaient pas non plus, de manière significative, en ce qui concerne les antécédents de signes fonctionnels intestinaux, et la prise de laxatifs ou d'antibiotiques.

GUT FERMENTATION SEEMS TO PROMOTE DECOMPRESSION SICKNESS IN HUMANS

Authors : de MAISTRE¹ Sébastien, VALLEE² Nicolas, GEMPP¹ Emmanuel, LOUGE¹ Pierre, DUCHAMP³ Claude, BLATTEAU² Jean-Eric.

Conceived and designed the experiments: SdM CD JEB. Performed the experiments: SdM EG PL. Analyzed the data: SdM NV JEB. Contributed materials/analysis tools: SdM NV. Wrote the paper: SdM JEB.

Affiliation :

¹ Service de Médecine Hyperbare et Expertise Plongée, HIA Sainte-Anne, BP600, Toulon Cedex 9, France

² Équipe Résidente de Recherche Subaquatique Opérationnelle, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, BP 600, Toulon Cedex 9, France

³ LEHNA, UMR 5023-CNRS/UCBL, Université Claude Bernard Lyon 1, 43 Bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne Cedex, France

Abbreviated title: Gut fermentation and DCS.

Corresponding author:

Sébastien de Maistre

sebastien.de-maistre@wanadoo.fr

Phone : +33 483162326

Fax number : +33 483162705

Service de Médecine Hyperbare et Expertise Plongée, HIA Ste Anne, BCRM TOULON, BP600, 83800 Toulon Cedex 9, France

Abstract

Introduction

Massive bubble formation after diving can lead to decompression sickness (DCS) that can result in neurological disorders. In experimental dives using hydrogen as the diluent gas, decreasing the body's H₂ burden by inoculating hydrogen-metabolizing microbes into the gut reduces the risk of DCS. In contrast, we have shown that gut bacterial fermentation in rats on a standard diet promotes DCS through endogenous hydrogen production. So we set out to test these experimental results in humans.

Materials and methods

39 divers admitted into our hyperbaric center with neurological DCS (Affected Divers) were compared with 39 healthy divers (Unaffected Divers). Their last meal time and composition were recorded. Gut fermentation rate was estimated by measuring breath hydrogen 1-4 hours after the dive.

Results

Breath hydrogen concentrations were significantly higher in Affected Divers (15ppm [6-23] versus 7ppm [3-12]; p=0.0078). Using a threshold value of 16.5ppm, specificity was 87% (95%CI 73-95) for association with neurological DCS onset. We observed a strong association between hydrogen values above this threshold and an accident occurrence (OR=5.3, 95%CI 1.8-15.7, p=0.0025). However, high fermentation potential foodstuffs consumption was not different between Affected and Unaffected Divers.

Discussion and conclusion

Gut fermentation rate at dive time seemed to be higher in Affected Divers. Hydrogen generated by fermentation diffuses throughout the body and could increase DCS risk. Prevention could be helped by excluding divers who are showing a high fermentation rate, by eliminating gas produced in gut or even by modifying intestinal microbiota to reduce fermentation rate during a dive.

Keywords

Diving, Decompression sickness, Gut fermentation, Hydrogen, Humans.

New & Noteworthy

This is the first time that the gut microbiota has been shown to affect the risk of decompression sickness in humans: we show that gut bacterial fermentation seems to

exacerbate the likelihood of the problem. This confirms results that we obtained in rats in simulated air dives in a chamber. The main interest of this study is to suggest new recommendations on how to prevent decompression sickness by reducing the fermentation rate in the gut.

Introduction

Diving is a dangerous activity that can lead to bubble formation in peripheral tissues as a result of dissolved gas changing phase during decompression. When too many bubbles are generated in bloodstream and tissues, signs and symptoms referred to decompression sickness (DCS) can occur (3). It is generally accepted that these bubbles form from pre-existing gaseous nuclei attached to vessel walls (5) and that the amount of venous gas emboli is linked to the risk of DCS (33, 38). Neurological damage in the spinal cord and brain underlies the most serious and commonest symptoms seen in DCS (14). Even after standard treatment with hyperbaric oxygen, 20-30% of the divers suffering from neurological DCS do not fully recover at the time of discharge (4). Identifying and managing new factors that might exacerbate the risk of DCS is therefore a major challenge.

Gut fermentation and decompression sickness in animals

It has been shown that the digestive tract can affect the risk of DCS through activity of the gut microbiota (21, 23, 24). In the course of simulated dives with hydrogen as the diluent gas, metabolism of this gas by the native microbiota in pigs protects against DCS by decreasing the amount of H₂ in the body (22). In contrast, we have shown that in rats diving with air, bacterial fermentation of undigested sugars present at the time of diving is accompanied by a rise in the incidence of DCS (9). Since a fraction of the hydrogen generated by such gut fermentation diffuses across the gut wall, we think that this endogenous hydrogen might exacerbate the risk of DCS. It could directly increase inert gas load during hyperbaric exposure and contribute to bubble formation during the decompression phase. Before diving, it could also help to seed the initial formation of inert gas bubbles from nuclei—the micro-bubbles that are at the origin of desaturation events (5).

Gut fermentation and decompression sickness in humans?

The aim of this study was to see if gut fermentation at the time of diving could exacerbate the risk of clinical DCS in humans. In addition, we sought to identify factors that control fermentation activity at the time of diving, the final objective being to arrive at recommendations on how to prevent DCS by reducing the rate of gut fermentation.

Materials and Methods

Study population

We proposed participation in the study to all divers referred to our Centre (*Service de Médecine Hyperbare et d'Expertise Plongée, Hôpital d'Instruction des Armées Sainte Anne, Toulon, France*) between May 2013 and August 2015 for a diving accident following an air dive. The inclusion criterion was a diagnosis of neurological DCS (Affected Divers Group) made by one of the Centre's physicians specialising in diving medicine, on the basis of information from an interview and a physical examination. All the divers consented to take part. Because of circadian variations in the rate of gut fermentation (28) and in order to minimise differences in food intake before the dive, we only studied divers who had dived in the morning before lunch; also excluded were all divers who had eaten between leaving the water and arriving at the Centre: in all, the Affected Divers Group comprised 39 subjects (Fig. 1).

For the control group of Unaffected Divers, we made four series of measurements at a recreational diving centre (*Espace Mer, Hyères, France*) on divers coming out of the water after an air dive in the morning before lunch between May 2013 and August 2015. All dives were followed by a diver-specific decompression procedure and none of the divers showed any symptoms after getting out of the water. Only two divers refused to take part; 39 Unaffected Divers consented to participate (Fig. 1).

The study protocol was approved by the local Ethics Committee (*Hôpital d'Instruction des Armées Sainte Anne, Toulon, France*) and all subjects gave Consent to participate in writing.

Questionnaire

All divers who took part in the study filled out a questionnaire after their dive.

Gender, age, anthropometric data, details of the dive

Every diver's date of birth, weight and height were recorded together with details of their dive, namely maximum depth, total duration, decompression stops and time of getting out of the water.

Personal history

Divers were asked about their medical history as well as any drugs they were taking. They were also asked about their gut function (flatulence, bloating, constipation) and whether they had recently used an antibiotic or a laxative.

Indeed, some gastrointestinal conditions are known to lead to greater intestinal fermentation, including primary and secondary sugar malabsorption (11), short bowel syndrome (7), small

intestinal bacterial overgrowth (SIBO) (34, 46), irritable bowel syndrome with (30, 46) or without SIBO (25, 26, 41).

Flatulence and bloating are gas-related symptoms (10, 42) and patients who suffer from these tend to be producing more gas (25, 36).

Taking laxative products affects the composition of the intestinal microbiota and can therefore also influence the rate of gut fermentation (1, 16, 20, 47) as can taking antibiotics (15).

Food intake before the dive

The divers were asked what they ate before the dive as well as when they ate it.

The focus was on foodstuffs known to generate gas eaten that morning before the dive (2, 18):

1. beans, soy beans, brassicas (Brussels sprouts, cauliflower, broccoli, kale and red white or Chinese cabbage), aubergine, bell peppers, onions
2. nuts
3. apples, pears, apricots, plums, peaches, raisins
4. starchy foods like potatoes, cereals and pop-corn
5. artificial sweeteners like sorbitol and fructose (often found in dietary supplements)
6. frozen foods (because of “resistant” starch).

The questionnaire particularly focused on readily fermented foods, including legumes, cabbage and pitted fruits.

Clinical observation

All the diver subjects were examined by one of our Centre’s specialist physicians. Affected Divers were re-examined after the first session of hyperbaric oxygen therapy and again on discharge from our Centre.

A diagnosis of neurological DCS was made on the basis of subjective reports of neurological problems (paraesthesia, dysaesthesia, numbness) with or without abnormal findings in a neurological examination (muscle weakness, hypoaesthesia, ataxia, impaired bladder function, higher function or language deficit, visual problems), following an air dive. Pulmonary barotrauma was ruled out: no difficulty breathing, haemoptysis, coughing, pneumothorax or subcutaneous emphysema. In addition, all divers suffering from a neurological accident with persistent subjective problems or abnormal findings in the initial neurological examination were given a medullary and/or brain MRI examination to confirm the diagnosis, rule out any other diagnosis and investigate predisposing anatomical factors.

The risk of a negative outcome was determined before the first session of hyperbaric oxygen therapy by calculating a severity score (on a scale of 0-22) (4). This score takes into account the diver's age, the presence of vertebral pain, changes in the symptoms on normobaric oxygen therapy, the existence of objective sensory or motor signs and involvement of the bladder sphincter. A score of over 8 is considered as possibly indicating poor prognosis.

Hydrogen in exhaled air

Test principle

Mammalian cells are incapable of producing hydrogen so any hydrogen in the colon comes from bacterial fermentation, mainly of unabsorbable carbohydrates and endogenous glycoprotein (32). Hydrogen absorbed in gut is not metabolised but is excreted in breath (39) so measuring this hydrogen reflects the amount produced by bacterial gut fermentation which thereafter diffuses throughout the body via the blood.

2.3.1 Measurement

After the first physical examination, breath hydrogen was measured in all the divers referred to our Centre; the same measurement was made on Unaffected Divers on the boat. In all cases, the measurement was made within 1-4 hours of getting out of the water.

Breath hydrogen was measured using a portable device (Gastrolyser®, Bedfont Scientific Ltd, UK) in the following way: after breathing normally in air for at least two minutes, the diver was asked to take a deep breath and hold it in for 15 seconds. Then the diver expired as slowly and as completely as possible into a mouthpiece. The hydrogen concentration reading (in ppm) on the device's screen steadily increased and the final highest value remaining displayed after the end of expiration was taken as the result.

2.4 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation or median [interquartile interval] for quantitative variables, and as a percentage [95% confidence interval] for dichotomous variables. A contingency table was used for independence and association tests coupled with a Fisher Exact or Chi² test of significance. Student's t test or a Mann-Whitney test were used to analyse differences between two unmatched groups. Spearman's test was used to identify correlations. A receiver operating characteristics (ROC) curve with the corresponding area under the curve was plotted to discriminate the highest measurement of breath hydrogen values that predicts the onset of neurological DCS; specificity and sensitivity were determined

using predefined thresholds. Odds Ratios with their 95% confidence intervals were calculated when needed. A difference was considered as significant if its p-value was less than 0.05. Statistical processing was done with XLSTAT-Pro® (Addinsoft, Paris, France).

Results

Gender, age, anthropometric data, details of the dive

Data on gender, age, anthropometric data and dive details are shown in Tab. I. There are no significant differences between Affected Divers and Unaffected Divers in any of these parameters.

Personal history

Significant items are shown in Tab. II. Functional gut signs are listed in Tab. III with no difference found between the two groups (8% [95%CI 2-21] in the Affected Divers versus 15% [95%CI 6-31]; $p=0.5899$). None of the subjects had recently used a laxative product or taken an antibiotic.

Food intake

Two Affected Divers and four Unaffected Divers had eaten nothing since the evening before the dive; most of the others had eaten a continental breakfast but two Affected Divers and two Unaffected Divers had cereal for breakfast. None of the subjects had eaten any food of high fermentation potential on the day of the dive. Intervals between the last meal and getting out of the water were similar (Tab. I).

Clinical observation

In the physical examination, objective neurological problems were detected in 49% of the Affected Divers with a severity score of over 8 in 10% of cases. Neurological abnormalities were still detected at discharge in 23% of cases. The most common neurological sequelae were proprioceptive ataxia and bladder sphincter problems. None of the Unaffected Divers experienced any symptom after the dive.

Hydrogen in exhaled air

Hydrogen levels were significantly higher in the breath of the Affected Divers (15 ppm [6-23] versus 7 ppm [3-12] ; $p=0.0078$) (Fig. 2).

Analysis of the ROC curve showed that the threshold hydrogen concentration in exhaled air that was significantly associated with the onset of neurological DCS was 16.5 ppm with the following parameters: specificity 87% (95%CI 73-96); sensitivity 44% (95%CI 28-60); positive predictive value 77% (95%CI 69-88); and negative predictive value 61% (95% 57-65). Differences in distribution between the Affected Divers and Unaffected Divers with respect to the hydrogen threshold were significant ($p=0.0025$) (Tab. IV) and the proportion of divers experiencing neurological DCS was higher when the hydrogen concentration exceeded 16.5 ppm (OR=5.3, 95%CI 1.6-15.7).

On the other hand, we did not detect any correlation between breath hydrogen concentration and initial severity score in the Affected Divers (Spearman $_{H_2/severity}$ score: $n=39$, $\alpha=0.05$, $p=0.562$). Furthermore, breath hydrogen concentration was not significantly higher in Affected Divers with neurological sequelae at discharge than in those without them (20 ppm [4-22] versus 14 ppm [7-23] ; $p=0.907$).

Discussion

This study shows that, in humans, there is more hydrogen in breath after a dive associated with DCS than after an accident-free dive with an effective decompression procedure. This suggests that the rate of gut fermentation might be higher at the time of the dive in Affected Divers although they had not consumed more food with high fermentation potential than those who suffered no accident. The diver populations did not significantly differ in terms of their history of functional gastrointestinal problems or the taking of antibiotics and laxatives.

Validity of measuring breath hydrogen to estimate gut fermentation

Method validity

The amount of hydrogen in exhaled air gives an estimate of the rate of gut fermentation at the moment of measurement. Processes that might interfere with hydrogen elimination and compromise the accuracy of the measurement are controlled.

Sampling of the expired gas represents an essential phase of the measurement. Hydrogen should be measured on alveolar air that has been in contact with blood inside alveoli. The gas sampling procedure should preclude interference with respiratory dead space. The first fraction breathed out is actually just unchanged air from the upper airways inhaled in the previous inspiration. The protocol involves deep inspiration, holding it in for 15 seconds and then complete evacuation into the measuring device: the 15-second period of apnoea ensures complete respiratory exchange and minimises variability between readings (15).

The amount of breath hydrogen depends on the breathing rate: the concentration will be lower if the subject is breathing fast, e.g. it is reduced during exercise and rises during the recovery phase so after getting out of the water and during the measurement, the diver should be at rest (15).

Various gases are generated when tobacco burns. In addition to methane and carbon monoxide, hydrogen levels can reach 2%. Smoking substantially interferes with the measurement of hydrogen in exhaled air and must be avoided before measurement (15).

Because microbiota in the mouth can also ferment carbohydrates and thereby interfere with measurement of hydrogen produced by gut micro-organisms (15), we excluded any diver who had already eaten after getting out of the water.

Validity for estimating fermentation rate at the time of the dive

Hydrogen elimination via the airways follows a circadian cycle. There is a drop early in the morning followed by a steady rise over the rest of the day, fluctuating with food intake (28). Moreover, variation in the amount of breath hydrogen is lower in the morning before lunch (28). In this study, the times of getting out of the water were comparable between the two groups as were intervals between breakfast and getting out of the water. These hydrogen measurements—performed before lunch over a short time frame—can therefore be considered as giving a good measure of the rate of fermentation during decompression.

None of the subjects had consumed food with high fermentation potential. However, it has been shown that elimination often continues even after a night fasting (usually at a slow rate). In a study of 221 children and 9 adults in good health, breath hydrogen was on average 7.1 +/- 5.0 ppm (mean +/- standard deviation), exceeding 30 ppm in fewer than 1% of cases (34). But in certain circumstances, food eaten the day before affected fermentation the next day (34, 37). This could be relevant in our study in which we only know that no food with high fermentation potential had been consumed on the morning of the dive.

Validity for estimating fermentation rate before the dive

The hydrogen threshold value that we determined by ROC curve analysis as significantly associated with the onset of DCS is 16.5 ppm. We believe that excessive fermentation and endogenous hydrogen production exacerbates the risk of DCS. However this value was determined from measurements made after diving and these may not give a representative estimate of fermentation before diving. It could be that diving or DCS stimulates fermentation. It has been demonstrated in rats that a 30-day hyperbaric exposure can affect

gut microbiota profile (31) and stress—common in diving—is known to accelerate global intestinal transit (13). In humans, it has been shown that accelerated intestinal transit over three weeks stimulates bacterial fermentation capacity (12). Nevertheless, dive parameters were comparable between the two groups, the clinical manifestations of DCS did not appear until after the dive, and Affected Divers did not report greater stress during the dive than the Unaffected Divers. So the effects of hyperbaric exposure and stress were probably no greater in one group compared with the other. Finally, with respect to both hyperbaric exposure and stress, perturbation of gut fermentation depends on changes in the composition of the intestinal microbiota which would be unlikely within the time frame of a dive lasting less than one hour, even in case of DCS. Furthermore, when the amount of hydrogen in the breath of non-diving Caucasians was measured between noon and 1 p.m., the average was found to be 9.60 ppm which is close to the values obtained in the Unaffected Divers (27). Nevertheless, further studies are required to determine the effect of short dives—one-off or repeated over several days—on gut microbiota profile and fermentation capacity.

Minimizing gas generation in gut during diving

The results of this study suggest that fermentation plays an exacerbatory role in DCS. It therefore seems judicious to consider ways of slowing fermentation down in the gut when diving with a view to prevention.

The first approach might be to identify and exclude divers who exhibit strong fermentation before a dive. However, our study shows that even a well-conducted interview does not suffice to identify divers with strong fermentation. In practice, gut disease—which the diver might be unaware of because of mild symptoms—can stimulate fermentation. Moreover, we do not know how many drugs affect fermentation or how long it takes for gut microbiota metabolism to return to normal after perturbation. An interval of four weeks has been suggested after the administration of a laxative or antibiotic (15). Pre-dive breath hydrogen measurement could be a better way of estimating fermentation rate for the next dive.

We believe that gases generated by fermentation (hydrogen, carbon dioxide, methane) could exacerbate the risk of DCS. In an early study, hydrogen and methane production was measured in humans using a triple-lumen polyvinyl tube (29). Hydrogen production in the colon was less than $0.1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ in subjects who had fasted for at least 24 hours. After infusion of lactose into the small intestine, colonic hydrogen production rised to an average peak of $1.7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. The maximum amount of H_2 produced by any subject over a one-hour period was approximately 140 ml. Methane production differed from H_2 in several respects.

Normal subjects could be readily separated into two groups. Some of them produced large quantities of methane in the colon with a mean fasting level of $0.55 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. On the other hand, methane production was undetectable (less than $0.02 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) in other subjects. In sharp contrast to H_2 , the instillation of lactose did not influence the rate of CH_4 production. If less than $76 \text{ ml}/6 \text{ h}$ of hydrogen is produced in the colon then all of it is absorbed (17). As total flatus volume increases, efficiency of colonic hydrogen absorption decreases from 90% to 20%. Hydrogen and methane are exclusively produced by intestinal fermentation, mammalian cells not being able to generate these gases. Thus, the amount of hydrogen and methane produced in gut can be estimated by summing their anal discharge and their quantity in the exhaled air. A relatively old study (43) measured anal gas evacuation after consumption of different types of food and showed the following values: 15 ml per hour on a low fiber diet, 93 ml per hour on a normal diet, 140 ml per hour after consumption of Brussels Sprouts and 176 ml per hour after pork and beans. A more recent study measured anal gas evacuation over 24 hours and showed that a normal diet containing 200 g of dry beans resulted in evacuation of 705 ml of gas, half of which was hydrogen, while a fiber-free diet was associated with an evacuation of 214 ml of gas with a very little hydrogen (45). Average volumes of hydrogen in the breath were $85 \text{ ml}\cdot\text{day}^{-1}$ on a regular diet and less than $35 \text{ ml}\cdot\text{day}^{-1}$ when fasting (44). These values are to be compared with the nitrogen load theoretically accumulated by a lean subject during a simulated dry dive with air (40-min just-decompression to 21 msw with compression and decompression paces of 15 msw/min and with a 5-min stop at 3 msw), ranging from 180-258 ml depending on the model (40). Gases generated by fermentation could contribute directly by raising the load of diluent gas during hyperbaric exposure which will then form bubbles during the decompression phase. Before the dive, they could also take part in seeding the formation of the bubbles of diluent gas that cause DCS (9). So it might be useful to think about administering compounds that promote the elimination of gas in the gut. Hypercapnia (high partial carbon dioxide pressure [PaCO_2] in the blood) is known to exacerbate the risk of DCS (19). However, we have previously shown in rats that CO_2 production—related to both rat metabolism and bacterial fermentation—was the same in animals with marked intestinal fermentation so this cannot account for the higher incidence of DCS (9). Concerning methane, people can be divided into methane producers and non-producers. Methane is produced by special bacteria (*Methanobrevibacter smithii*) from hydrogen and carbon dioxide. Statistically significant differences were observed between these two groups with lower values for CH_4 producers recorded for both fasting basal breath H_2 and breath H_2 production measured as area under the curve (8). Since we found a link

between hydrogen production and the risk of DCS, it is likely that hydrogen plays a more important role than methane.

Finally fermentation could be inhibited during a dive, temporarily by controlling food intake and, in the longer term, by changing the intestinal microbiota. Divers can be recommended avoiding fermentable foodstuffs in the 24 hours before a dive (2, 11). Unlike adapting diet before a dive, nutritional or medicinal products to change the gut microbiota might sustainably affect the fermentation rate and we do not know the long-term effects of gut fermentation on the risk of DCS. While increasing the load of diluent gas at the time of diving seems to be deleterious, the usefulness of modulating endogenous hydrogen generation before a dive remains to be demonstrated (9). Moreover, butyrate—a short-chain fatty acid generated by gut fermentation—is known to have neuroprotective effects through regulation of the expression of genes in brain to prevent neurons degeneration and stimulate their regeneration (6). So, gut fermentation could have paradoxical effects when it comes to DCS, i.e. harmful in the short term at the time of diving but beneficial in the long term.

Conclusion

This study suggests that, at the time of diving, the rate of gut fermentation might be higher in Affected Divers. Hydrogen generated in the course of fermentation diffuses throughout the body and could exacerbate the risk of DCS. We did not identify any obvious factors to explain why fermentation was stronger in the Affected Divers. It could be due to the kind of food eaten the day before the dive, asymptomatic gut disease (sugars malabsorption, short bowel syndrome, SIBO, irritable bowel syndrome) or drugs (antibiotics, laxatives, prokinetics, etc.). DCS prevention could be promoted by excluding divers exhibiting strong fermentation on the day of a dive or by the elimination of gases being produced in gut. Or measures could be implemented to modulate the gut microbiota to inhibit fermentation during a dive. Nevertheless, further studies will be required to investigate the long-term effects of fermentation before any treatment to induce sustained modification of the intestinal microbiota can be recommended.

Acknowledgments

We are very grateful to the *Espace Mer* recreational diving centre team (Hyères, France) for their excellent technical assistance.

Grants

The research was supported by the “Délégation Générale pour l’Armement” (COSSA2013). It should be attributed to the “Hôpital d’Instruction des Armées Sainte Anne” and to the “Institut de Recherches Biomédicales des Armées” laboratories (Toulon, France).

Disclosures

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SdM CD JEB. Performed the experiments: SdM EG PL. Analyzed the data: SdM NV JEB. Contributed materials/analysis tools: SdM NV. Wrote the paper: SdM JEB.

Figure and table legends

Fig. 1. Flow diagram describing the selection of Affected Divers and Unaffected Divers.

Fig. 2. Measurement of hydrogen in exhaled air after diving. *denotes $p < 0.01$ between the groups.

Tab. I. Characteristics of the divers enrolled in the study.

Tab. II. Medical history and treatments of the divers enrolled in the study.

Tab. III. Gut symptoms presented by divers.

Tab. IV. Distribution of divers according to the measurement of hydrogen in exhaled air with respect to a threshold value of 16.5 ppm.

References

1. **Altomare DF, Bonfrate L, Krawczyk M, Lammert F, Caputi-Jambrenghi O, Rizzi S, Vacca M, and Portincasa P.** The inulin hydrogen breath test predicts the quality of colonic preparation. *Surg Endosc* 28: 1579-1587, 2014.
2. **Azpiroz F, and Malagelada JR.** Abdominal bloating. *Gastroenterology* 129: 1060-1078, 2005.
3. **Bert P.** *La pression barométrique.* Masson, 1878.
4. **Blatteau JE, Gempp E, Simon O, Coulange M, Delafosse B, Souday V, Cochard G, Arvieux J, Henckes A, Lafere P, Germonpre P, Lapoussiere JM, Hugon M, Constantin P, and Barthelemy A.** Prognostic factors of spinal cord decompression sickness in recreational diving: retrospective and multicentric analysis of 279 cases. *Neurocrit Care* 15: 120-127, 2010.

5. **Blatteau JE, Souraud JB, Gempp E, and Boussuges A.** Gas nuclei, their origin, and their role in bubble formation. *Aviat Space Environ Med* 77: 1068-1076, 2006.
6. **Bourassa MW, Alim I, Bultman SJ, and Ratan RR.** Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neurosci Lett* 2016.
7. **Briet F, Flourie B, Achour L, Maurel M, Rambaud JC, and Messing B.** Bacterial adaptation in patients with short bowel and colon in continuity. *Gastroenterology* 109: 1446-1453, 1995.
8. **Cloarec D, Bornet F, Gouilloud S, Barry JL, Salim B, and Galmiche JP.** Breath hydrogen response to lactulose in healthy subjects: relationship to methane producing status. *Gut* 31: 300-304, 1990.
9. **de Maistre S, Vallee N, Gempp E, Lambrechts K, Louge P, Duchamp C, and Blatteau JE.** Colonic Fermentation Promotes Decompression sickness in Rats. *Sci Rep* 6: 20379, 2016.
10. **Di Stefano M, Strocchi A, Malservisi S, Veneto G, Ferrieri A, and Corazza GR.** Non-absorbable antibiotics for managing intestinal gas production and gas-related symptoms. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 1001-1008, 2000.
11. **Ducrotte P.** [Abdominal bloating: an up-to-date]. *Gastroenterol Clin Biol* 33: F94-100, 2009.
12. **El Oufir L, Flourie B, Bruley des Varannes S, Barry JL, Cloarec D, Bornet F, and Galmiche JP.** Relations between transit time, fermentation products, and hydrogen consuming flora in healthy humans. *Gut* 38: 870-877, 1996.
13. **Enck P, Merlin V, Erckenbrecht JF, and Wienbeck M.** Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut* 30: 455-459, 1989.
14. **Francis T, and Mitchell S.** Pathophysiology of decompression sickness. In: *The Bennett and Elliot's physiology and medicine of diving*, edited by Brubak AO, and Neuman TS. London: WB Saunders, 2003, p. 530-556.
15. **Gasbarrini A, Corazza GR, Gasbarrini G, Montalto M, Di Stefano M, Basilisco G, Parodi A, Usai-Satta P, Vernia P, Anania C, Astegiano M, Barbara G, Benini L, Bonazzi P, Capurso G, Certo M, Colecchia A, Cuoco L, Di Sario A, Festi D, Lauritano C, Miceli E, Nardone G, Perri F, Portincasa P, Risicato R, Sorge M, and Tursi A.** Methodology and indications of H₂-breath testing in gastrointestinal diseases: the Rome Consensus Conference. *Aliment Pharmacol Ther* 29 Suppl 1: 1-49, 2009.

16. **Gilat T, Ben Hur H, Gelman-Malachi E, Terdiman R, and Peled Y.** Alterations of the colonic flora and their effect on the hydrogen breath test. *Gut* 19: 602-605, 1978.
17. **Hammer HF.** Colonic hydrogen absorption: quantification of its effect on hydrogen accumulation caused by bacterial fermentation of carbohydrates. *Gut* 34: 818-822, 1993.
18. **Hartmeier SH, and Fried M.** ["Flatulences"-investigation and treatment]. *Swiss Med Forum* 20: 532-536, 2001.
19. **Hill RC, Miller CW, and Tucker A.** Influence of carbon dioxide on venous gas emboli production during altitude decompression in goats. *Aviat Space Environ Med* 65: 139-143, 1994.
20. **Kashyap PC, Marcobal A, Ursell LK, Larauche M, Duboc H, Earle KA, Sonnenburg ED, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Million M, Tache Y, Pasricha PJ, Knight R, Farrugia G, and Sonnenburg JL.** Complex interactions among diet, gastrointestinal transit, and gut microbiota in humanized mice. *Gastroenterology* 144: 967-977, 2013
21. **Kayar SR.** Biochemical Approach to Decompression. In: *The future of diving: 100 years of Haldane and beyond*, edited by Lang MA, and Brubakk AO. Washington, DC: Smithsonian Institution Scholarly Press, 2009, p. 33-39.
22. **Kayar SR, and Fahlman A.** Decompression sickness risk reduced by native intestinal flora in pigs after H₂ dives. *Undersea Hyperb Med* 28: 89-97, 2001.
23. **Kayar SR, Fahlman A, Lin WC, and Whitman WB.** Increasing activity of H(2)-metabolizing microbes lowers decompression sickness risk in pigs during H(2) dives. *J Appl Physiol (1985)* 91: 2713-2719, 2001.
24. **Kayar SR, Miller TL, Wolin MJ, Aukhert EO, Axley MJ, and Kiesow LA.** Decompression sickness risk in rats by microbial removal of dissolved gas. *Am J Physiol* 275: R677-682, 1998.
25. **King TS, Elia M, and Hunter JO.** Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 352: 1187-1189, 1998.
26. **Kumar S, Misra A, and Ghoshal UC.** Patients with irritable bowel syndrome exhale more hydrogen than healthy subjects in fasting state. *J Neurogastroenterol Motil* 16: 299-305, 2010.
27. **Le Marchand L, Wilkens LR, Harwood P, and Cooney RV.** Breath hydrogen and methane in populations at different risk for colon cancer. *Int J Cancer* 55: 887-890, 1993.

28. **Le Marchand L, Wilkens LR, Harwood P, and Cooney RV.** Use of breath hydrogen and methane as markers of colonic fermentation in epidemiologic studies: circadian patterns of excretion. *Environ Health Perspect* 98: 199-202, 1992.
29. **Levitt MD, and Ingelfinger FJ.** Hydrogen and methane production in man. *Ann N Y Acad Sci* 150: 75-81, 1968.
30. **Lin HC.** Small intestinal bacterial overgrowth: a framework for understanding irritable bowel syndrome. *JAMA* 292: 852-858, 2004.
31. **Maity C, Adak A, Halder SK, Jana A, Ghosh K, Das Mohapatra PK, Pati BR, and Mondal KC.** Analysis of alteration of gut microbial population under the exposure of graded hyperbaric pressures: application of metagenomic approach. *Indian J Exp Biol* 51: 960-968, 2013
32. **Newman A.** Breath-analysis tests in gastroenterology. *Gut* 15: 308-323, 1974.
33. **Nishi RY, Brubakk AO, and Eftedal OS.** Bubble detection. In: *The Bennett and Elliot's physiology and medicine of diving*, edited by Brubakk AO, and Neuman TS. London: WB Saunders, 2003, p. 501-529.
34. **Perman JA, and Modler S.** Glycoproteins as substrates for production of hydrogen and methane by colonic bacterial flora. *Gastroenterology* 83: 388-393, 1982.
35. **Perman JA, Modler S, Barr RG, and Rosenthal P.** Fasting breath hydrogen concentration: normal values and clinical application. *Gastroenterology* 87: 1358-1363, 1984.
36. **Rao SS, Edwards CA, Austen CJ, Bruce C, and Read NW.** Impaired colonic fermentation of carbohydrate after ampicillin. *Gastroenterology* 94: 928-932, 1988.
37. **Read NW, Al-Janabi MN, Bates TE, Holgate AM, Cann PA, Kinsman RI, McFarlane A, and Brown C.** Interpretation of the breath hydrogen profile obtained after ingesting a solid meal containing unabsorbable carbohydrate. *Gut* 26: 834-842, 1985.
38. **Sawatzky KD.** The relationship between intravascular Doppler-detected gas bubbles and decompression sickness after bounce diving in humans. Toronto: York University, 1991.
39. **Scaldeferri F, Nardone O, Lopetuso LR, Petito V, Bibbo S, Laterza L, Gerardi V, Bruno G, Scoleri I, Diroma A, Sgambato A, Gaetani E, Cammarota G, and Gasbarrini A.** Intestinal gas production and gastrointestinal symptoms: from pathogenesis to clinical implication. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17 Suppl 2: 2-10, 2013.

40. **Schellart NA, van Rees Vellinga TP, and van Hulst RA.** Body fat does not affect venous bubble formation after air dives of moderate severity: theory and experiment. *J Appl Physiol* (1985) 114: 602-610.
41. **Shah ED, Basseri RJ, Chong K, and Pimentel M.** Abnormal breath testing in IBS: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 55: 2441-2449, 2010.
42. **Sharara AI, Aoun E, Abdul-Baki H, Mounzer R, Sidani S, and Elhajj I.** A randomized double-blind placebo-controlled trial of rifaximin in patients with abdominal bloating and flatulence. *Am J Gastroenterol* 101: 326-333, 2006.
43. **Steggerda FR.** Gastrointestinal gas following food consumption. *Ann N Y Acad Sci* 150: 57-66, 1968.
44. **Tadesse K, Smith D, and Eastwod MA.** Breath hydrogen (H₂) and methane (CH₄) excretion patterns in normal man and in clinical practice. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 65: 85-97, 1980.
45. **Tomlin J, Lewis C, and Read NW.** Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. *Gut* 32: 665-669, 1991.
46. **Triantafyllou K, Sioulas AD, and Giamarellos-Bourboulis EJ.** Rifaximin: The Revolutionary Antibiotic Approach for Irritable Bowel Syndrome. *Mini Rev Med Chem* 16: 186-192, 2015
47. **Urita Y, Hike K, Torii N, Kikuchi Y, Kanda E, Sasajima M, Ariki H, and Miki K.** Hydrogen breath test as an indicator of the quality of colonic preparation for colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 57: 174-177, 2003.

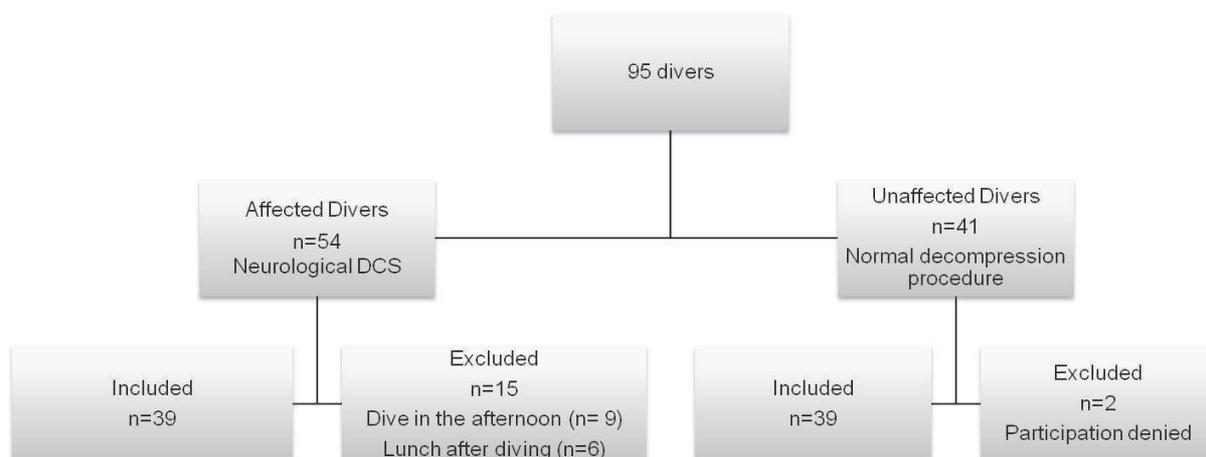


Fig. 1. Flow diagram describing the selection of Affected Divers and Unaffected Divers

Tab. I. Characteristics of the divers enrolled in the study

Characteristics	Affected Divers (n=39)	Unaffected Divers (n=39)	P-Value
Age (years)	47±13	45±12	0.40
Gender (M/F)	32/7	32/7	1.00
Weight (kg)	77±11	76±15	0.71
Height (cm)	174±9	175±9	0.68
BMI (kg.m ⁻²)	25.30±2.29	24.70±3.79	0.40
Diving depth (msw)	42 [36-49]	40 [25-45]	0.07
Total dive time (min)	36 [31-44]	31 [25-50]	0.17
Water exit time (hh:mm)	10:30 [10:08-11:30]	10:30 [10:15-11:15]	0.98
Time between water exit and last meal (min)	195 [158-240]	225 [173-263]	0.16

Tab. II. Medical history and treatments of the divers enrolled in the study

	Medical history	Treatments
Affected Divers with medical history (n=8)	Shoulder Bends	
	Treated dyslipidemia	Ézétimibe, simvastatine
	Ophthalmic migraine Treated dyslipidemia	Rosuvastatine
	Coronary heart disease Angioplasty+ stent delivery	Acetylsalicylate
	Treated hypertension	Isosartan
	Shoulder Bends	
	Hypertension Dyslipidemia	
	Hypertension Dyslipidemia	
Unaffected Divers with medical history (n=5)	Immersion pulmonary edema	
	Dyslipidemia	
	Treated gastroesophageal reflux	Pantoprazole
	Aortic valve replacement	
	Treated type 2 diabetes Dyslipidemia	Répaglinide, liraglutide, sitagliptine, metformine

Tab. III. Gut symptoms presented by divers

Gut symptoms	Affected Divers (n=3)			Unaffected Divers (n=6)					
Flatulence		X	X				X	X	
Bloating	X	X		X	X	X	X		X
Constipation					X		X		

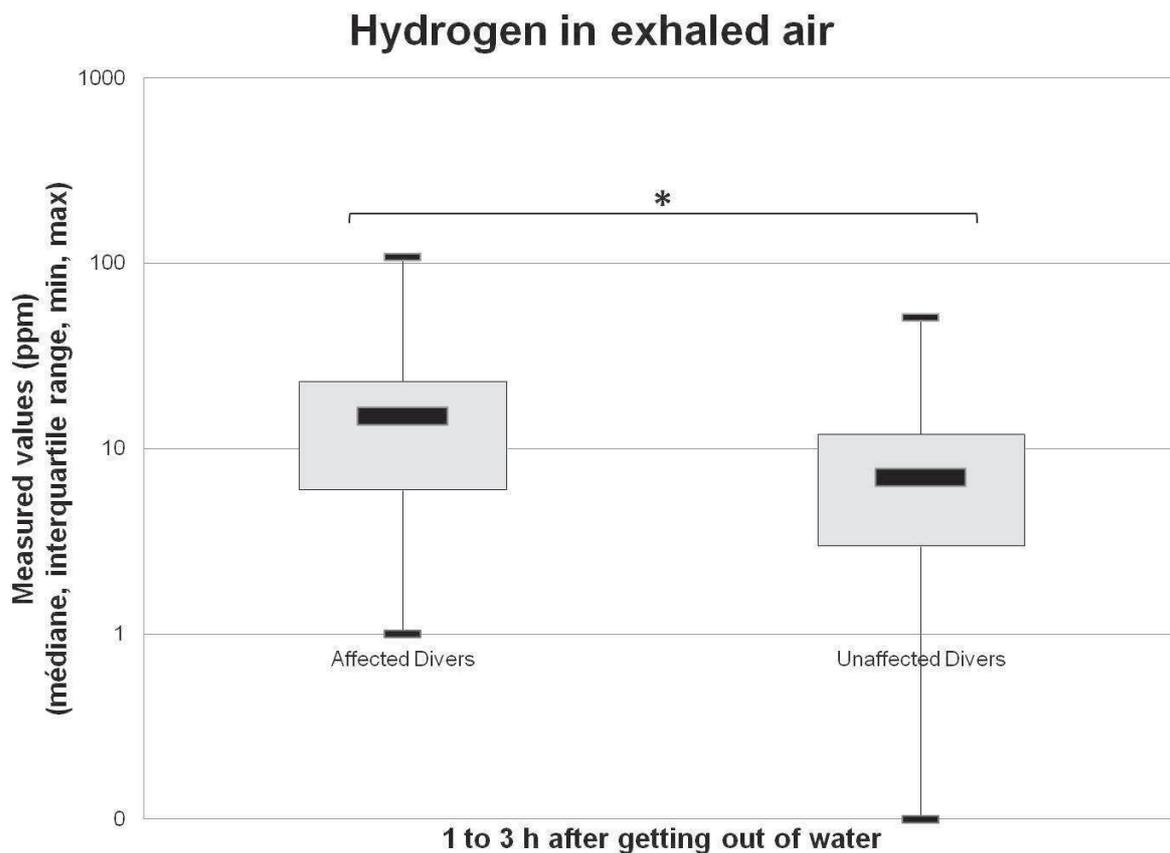


Fig. 2. Measurement of hydrogen in exhaled air after diving. *denotes $p < 0.01$ between the groups

Tab. IV. Distribution of divers according to the measurement of hydrogen in exhaled air with respect to a threshold value of 16.5 ppm

Status	Affected Divers	Unaffected Divers	Total
Hydrogen in exhaled air			
> 16.5 ppm	17	5	22
< 16.5 ppm	22	34	56
Total	39	39	78

3 Présentation de notre troisième étude (à soumettre)

de Maistre S, Vallee N, Gempp E, et al. Stimulating fermentation by the prolonged acceleration of gut transit protects against decompression sickness.

3.1 Hypothèses de l'étude

Nous avons montré, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, que la fermentation bactérienne de sucres non digérés, au moment de la plongée, s'accompagne d'une plus grande incidence des accidents de désaturation (de Maistre et coll. 2016a, de Maistre et coll. 2016b).

Chez l'homme comme chez l'animal, des auteurs ont démontré que le temps de transit intestinal était inversement proportionnel à la concentration d'hydrogène dans l'air expiré, qui est un reflet de la fermentation (El Oufir et coll. 1996, Lewis et Heaton 1997, rat pour Bustos et coll. 1991). Administrés par voie orale, les polyéthylènes glycol s'accompagnent d'une accélération du transit intestinal, aussi bien au niveau du grêle (Basit et coll. 2001, Schulze et coll. 2003, Coremans et coll. 2005, Ito et coll. 2012) que du côlon (Gremse et coll. 2002).

Aussi, l'ingestion prolongée de polyéthylène glycol pourrait augmenter le niveau de fermentation intestinale et avoir un impact sur le risque d'accident de désaturation

3.2 Objectifs de l'étude

Le but de notre étude était d'évaluer si la stimulation chronique de la fermentation par l'accélération du transit intestinal, dans le cadre particulier d'une ingestion prolongée de polyéthylène glycol pendant une semaine avant plongée, pouvait favoriser la survenue d'un accident de désaturation chez le rat.

3.3 Principaux résultats de l'étude

Nous avons montré, chez des rats recevant une alimentation standard, que l'ingestion de polyéthylène glycol, durant les 7 jours précédant une plongée, s'accompagnait d'une accélération du transit intestinal et d'une augmentation significative de la fermentation intestinale. De manière concomitante, contrairement à ce qu'on attendait, on a constaté une diminution significative de l'incidence des accidents de désaturation, aussi bien sur des critères cliniques (décès) que sur des critères biologiques (diminution des plaquettes sanguines et des globules blancs, cytokines inflammatoires circulantes).

STIMULATING FERMENTATION BY THE PROLONGED ACCELERATION OF GUT TRANSIT PROTECTS AGAINST DECOMPRESSION SICKNESS

Authors : de MAISTRE¹ Sébastien, VALLEE² Nicolas, GEMPP¹ Emmanuel, LOUGE¹ Pierre, DUCHAMP³ Claude, BLATTEAU¹ Jean-Eric.

Conceived and designed the experiments: SdM NV CD JEB. Performed the experiments: SdM NV JEB. Analyzed the data: SdM EG JEB. Contributed reagents/materials/analysis tools: SdM NV. Wrote the paper: SdM JEB.

Affiliation :

¹ Service de Médecine Hyperbare et Expertise Plongée, HIA Sainte-Anne, BP600, Toulon Cedex 9, France

² Équipe Résidente de Recherche Subaquatique Opérationnelle, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, BP 600, Toulon Cedex 9, France

³ LEHNA, UMR 5023-CNRS/UCBL, Université Claude Bernard Lyon 1, 43 Bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne Cedex, France

Abbreviated title: Gut transit, fermentation and DCS.

Corresponding author:

Sébastien de Maistre

sebastien.de-maistre@intradef.gouv.fr

Phone : +33 483162326

Fax number : +33 483162705

Service de Médecine Hyperbare et Expertise Plongée, HIA Ste Anne, BCRM TOULON, BP600, 83800 Toulon Cedex 9, France

Abstract

Introduction

Decompression sickness (DCS) is a diving accident caused by the formation of bubbles of inert gas inside the body that can leave neurological sequelae. We previously showed that bacterial fermentation in the gut at the time of a dive exacerbates the risk of DCS in rats on a standard diet, an effect due to endogenous hydrogen production. The aim of the experiments reported here was to see if long-term stimulation of fermentation as a result of the acceleration of bowel transit by the prolonged administration of polyethylene glycol (PEG) before diving exacerbates DCS in rats.

Materials and methods

Before the beginning of the experiments, 60 rats were raised through 12 weeks (Batch 1, 36 rats, target weight > 350 g) or 10 weeks (Batch 2, 24 rats, target weight < 350 g). Seven days before a dry dive in a hyperbaric chamber, both groups of rats were randomly assigned to one of two groups, i.e. an experimental group treated with PEG and an untreated control group. Before the dive, measurements were made of the amounts of CO₂ and H₂ in the air being exhaled by the rats, the latter giving a measure of the rate of bacterial fermentation in the gut. Batch 1 was observed for signs of DCS on removal from the hyperbaric chamber, i.e. motor deficit, difficulty moving around or death. In Batch 2, blood counts were done before and after the dive. After anaesthetisation, arterial blood was drawn to assay inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6) and markers of oxidative stress (TBARS, glutathione peroxidase).

Results

PEG accelerated bowel transit and led to a significant increase in exhaled H₂ (35 ppm [10-73] compared with 7 ppm [2-15]; p=0.0011). Opposite to what was expected, there were fewer deaths among the PEG-treated rats (17% [95%CI 4-41] compared with 50% [95%CI 26-74]; p=0.0339). In parallel, the drop in platelet count was significantly smaller in the PEG Group (-6.0% [-9.6;-0.8] compared with -15.4% [-19.6;-8.5]; p=0.0256), and levels of inflammatory markers were lower. Antioxidant activity of glutathione peroxidase was significantly higher in the PEG Group (525.417 \pm 92.867 U.l⁻¹ versus 378.495 \pm 74.385 U.l⁻¹; p=0.0010).

Discussion and conclusions

Long-term stimulation of fermentation by decreasing bowel transit time between dives seems to reduce the risk of DCS in rats. Our findings point to a two-edged effect of gut fermentation on decompression: although deleterious in the short term, i.e. at the time of diving, longer-term gut fermentation between dives might have a positive effect by preventing the

occurrence of DCS and limiting its severity. H₂ which has antioxidant properties and butyrate, a short-chain fatty acid, are both by-products of the fermentation of carbohydrate and both have neuroprotective activity. These could play a positive role when it comes to treating DCS.

Keywords

Decompression sickness, Fermentation, Gut transit, Hydrogen, Butyrate.

New & Noteworthy

Introduction

Diving is a dangerous activity that can lead to bubble formation in peripheral tissues as a result of dissolved gas changing phase during decompression. When too many bubbles are generated in bloodstream and tissues, signs and symptoms referred to decompression sickness (DCS) can occur (Bert 1978). It is generally accepted that these bubbles form from pre-existing gaseous nuclei attached to vessel walls (Blatteau *et al.* 2006) and that the amount of venous gas emboli is linked to the risk of DCS (Sawatzky 1991, Nishi *et al.* 2003). Neurological damage due to involvement of the brain and spinal cord is responsible for the most serious and commonest symptoms seen in DCS (Francis & Mitchell 2003). Even after standard treatment with hyperbaric oxygen, 20-30% of victims suffer sequelae after neurological DCS (Blatteau *et al.* 2010). Identifying and managing new factors that might exacerbate the risk of DCS is therefore an important issue.

It has been shown that the digestive tract can affect the risk of DCS through activity of the gut microbiota (Kayar *et al.* 1998, Kayar *et al.* 2001, Kayar 2009). In the course of simulated dives with hydrogen as the diluent gas, metabolism of this gas by the native microbiota in pigs protects against DCS by decreasing the amount of H₂ in the body (Kayar & Fahlman 2001). In contrast, we have shown that in rats diving with air, bacterial fermentation of undigested sugars present at the time of diving is accompanied by a rise in the incidence of DCS (de Maistre *et al.* 2016). A fraction of the H₂ generated by such fermentation in the gut diffuses across the gut wall and disperses throughout the body and this could have a harmful effect in the course of DCS by directly raising the quantity of inert gas present during hyperbaric exposure and contributing to bubble formation during decompression. Before the dive, it could also help to seed the initial formation of inert gas bubbles from nuclei—the micro-bubbles that are at the origin of desaturation events (Blatteau *et al.* 2006).

It has been solidly demonstrated that bowel transit time affects the gut microbiota and fermentation: in both humans and animals, bowel transit time is inversely proportional to faecal mass as well as the concentration of H₂ in exhaled air (which gives a measure of fermentation rate) (El Oufir *et al.* 1996, Lewis & Heaton 1997, Bustos *et al.* 1991).

Bowel transit time is reduced in some conditions, e.g. in patients with short bowel syndrome oro-caecal transit is accelerated and fermentation capacity is increased (Briet *et al.* 1995), and stress too is accompanied by accelerated transit throughout the digestive tract (Enck *et al.* 1989). Bowel transit can also be accelerated in normal circumstances, e.g. as a result of

aerobic physical exercise (Enck *et al.* 1989) or following the consumption of unfermentable cellulose (Kashyap *et al.* 2013).

The aim of these experiments was to investigate if long-term stimulation of fermentation by decreasing bowel transit time—by feeding rats polyethylene glycol (PEG) for a week before a dive—raises the risk of DCS.

High molecular weight PEG is a long linear polymer of monomers of ethylene glycol which binds water molecules through hydrogen bonds. PEG cannot be either digested or fermented and, when administered orally, it increases the volume of fluid present in the gut which underlies the solution's laxative activity.

PEG speeds up bowel transit in both the small intestine (Basit *et al.* 2001, Schulze *et al.* 2003, Coremans *et al.* 2005, Ito *et al.* 2012) and colon (Gremse *et al.* 2002).

In the framework of preparation for colonoscopy, bolus PEG administration significantly cuts down the amount of H₂ in exhaled air in both fasting patients (Mann *et al.* 2003) and after inulin ingestion (Altomare *et al.* 2014) indicating a reduced capacity for gut fermentation. In contrast, in non-fasting humanised mice (germ-free mice inoculated with human faecal microorganisms), it has been shown that long-term PEG administration speeds up transit, induces changes in the composition of the gut microbiota similar to those observed on a diet based on unfermentable cellulose, and increases fermentation capacity (Kashyap *et al.* 2013).

For these experiments, rats were fed PEG to stimulate gut fermentation. The impact of this treatment on DCS was assessed by clinical monitoring and laboratory testing (platelets, leukocytes, inflammatory cytokines in the bloodstream) after hyperbaric exposure followed by explosive decompression.

Materials and Methods

Study Population

All procedures involving laboratory animals were in line with European Union rules (Directive n°86/609) and French legislation (Decret n°87/848). This study was approved by the Ethics Committee of the *Institut de Recherche Biomédicale des Armées*. The Investigator is accredited (#83.6) by the Health and Safety Directorate of our Department, as required by French law (Articles R.214-93, R-214-99 and R.214-102 of the Rural Code).

Male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratory, France) were used exclusively to preclude fluctuations related to female hormone cycles. The rats were kept in a special room at a temperature of 22±1°C with a day/night cycle of 12 hours each (light turned on at 7 a.m.).

Before the experiments, the rats were fed a standard diet (12 mm granules from Global Diet 2018, Harlan, Italy) and water. We received two batches of rats: Batch 1 (36 rats) was raised through 12 weeks for a target weight of over 350 grams and Batch 2 (24 rats) was kept through 10 weeks for a target weight of under 350 grams.

In previous experiments in rats, it had been shown that bubble formation and the incidence of DCS are highly dependent on body weight (Berghage *et al.* 1979, Montcalm-Smith *et al.* 2008). Protocols using rats with a body weight of over 350 g give severe DCS with clear neurological involvement and death. In this study, the aim was to obtain clear neurological signs and deaths in Batch 1 and, to investigate DCS-related changes in laboratory test results, to induce non-fatal manifestations that would not necessarily be detectable in a physical examination in Batch 2.

In all, 60 rats were subjected to hyperbaric exposure followed by decompression in order to induce bubble formation and DCS. Each batch was randomly divided into two equal groups: one experimental group treated with PEG for seven days before pressurisation and an untreated control group (Fig. 1). The treated rats were given water supplemented with Fortrans® (IPSEN Pharma, France): one sachet per litre, i.e. 64 g PEG 4000 per litre. The water given to the control rats contained the same additives as Fortrans® apart from the PEG. Throughout the treatment phase, the rats were housed in individual cages and their food intake was controlled to keep their weight constant (16 g granules a day).

The experimental protocol is outlined in Fig. 2.

Hyperbaric procedure

Batches of 8 rats, free to move around and split between two cages (4 per cage) were subjected to a compression/decompression protocol in a 200-litre hyperbaric chamber with three observation ports. Each batch contained both treated (PEG) and control rats.

Decompression was staged which, in rats, tends to induce ischaemic damage to the spinal cord of variable intensity (Pontier *et al.* 2008, Blatteau *et al.* 2013), mimicking DCS in humans. In practice, medullary DCS is common in leisure diving, occurring in most cases without incorrect decompression or over-rapid ascent (Blatteau *et al.* 2010).

The rats were subject to air pressurisation at a rate of 10 kPa.min⁻¹ up to 100 kPa, then at a rate of 100 kPa.min⁻¹ up to 1.000 kPa (90 msw) which was maintained for 45 minutes. At the end of the exposure period, the rats were decompressed to 200 kPa at a rate of 100 kPa.min⁻¹ with a 5-minute stop at 200 kPa, a 5-minute stop at 160 kPa, and a 10-minute stop at 130 kPa. Decompression between 200 kPa and surface was conducted at a rate of 10 kPa.min⁻¹.

Decompression rate was controlled automatically by a computer connected to an analogue/digital converter (NIUSB-6211®, National Instrument, USA) which was in turn connected to a solenoid valve (Belino LR24A-SR®, Switzerland) and a pressure sensor (Pressure Transmitter 8314, Burket Fluid Control System, Germany). The software used to regulate the decompression rate was coded by our engineer using DasyLab (DasyLab®, National Instrument, USA).

Compressed air was generated using a diving compressor (Mini Verticus III, Bauer Comp, Germany) connected to a 100-litre buffer bottle at 3.10^4 kPa. The oxygen analyzer was based on a MicroFuel electrochemical cell (G18007 Teledyne Electronic Technologies/Analytical Instruments, USA). Water vapour and CO₂ produced by the animals were respectively captured with Seccagel (relative humidity: 40-60%) and soda lime (CO₂ < 300 ppm). Gases were mixed by an electric fan. The day-night cycle was respected throughout. The temperature inside the hyperbaric chamber was measured using a platinum resistance temperature probe (Pt 100, Eurotherm, France). All these variables were controlled by a dedicated computer.

Fluid consumed and stools produced

How much the rat had drunk over 7 days was estimated by measuring the volume of liquid remaining the rat's bottle on the day of pressurisation. Consumption was normalised to each rat's body weight.

Over the 48 hours before pressurisation, the weight of faeces produced by each rat was measured: the litter was replaced two days before pressurisation and then, on the day itself, it was sieved to harvest all the stools emitted over the last two days. These were then weighed, dried in an oven at 60°C for 24 hours, and then weighed again to determine their dry weight.

Hydrogen and carbon dioxide in exhaled air

The amount of H₂ measured in exhaled air gives a measure of the rate of H₂ production resulting from bacterial fermentation of carbohydrate in the gut (and thence diffusing throughout the body via the bloodstream). The amount of CO₂ in exhaled air depends on both the host's metabolic activity and bacterial fermentation in the digestive tract (which diffuses across the gut wall).

To measure H₂ and CO₂ in exhaled air, we considered that breathing rate in rats is constant over time with a mean rate of 225 ml.min⁻¹. The literature gives a resting value of 27.27 ± 2.39 ml.min⁻¹.100g⁻¹ (mean \pm standard deviation) for Sprague-Dawley rats (Strohl *et al.* 1997). The

mean weight of the rats we studied was 389 ± 24 g (mean \pm standard deviation) but, taking into account the stress induced by the measurement process, we used a breathing rate double that of the literature value for unstressed, resting rats.

For each measurement, each rat was placed in a clean, dry polyvinyl chloride (PVC) cylinder (internal diameter 75 mm, length 200 mm, i.e. an internal volume of 883 ml). Both ends were hermetically sealed with plastic discs with holes in the middle allowing air in at one end and the collection of gases at the other. Air was circulated by a special aerator (Rena Air 200®, France) set to a constant flow rate of $225 \text{ ml ml} \cdot \text{min}^{-1}$, controlled by the rise of a soap bubble in an inverted 100 ml test-tube, pierced at the bottom (Fig. 3).

After 5 minutes (to allow time for the gases to mix inside the cylinder, taking stock of the dead space, i.e. that not occupied by the animal), successive measurements were made of H_2 (ppm) and then CO_2 (percentage) in the air coming out of the cylinder by means of a three-way tap.

H_2 was measured using a mobile exhaled H_2 analyser (Gastrolyser®, Respur International, France) and CO_2 was measured using a mobile gas exchange test system (Cosmed® K4b², Italie). Results were recorded one hour before pressurisation.

Clinical observation

At the end of decompression, Batch 1 rats were transferred into individual cages and observed at will for 30 minutes by trained observers who were unaware of the treatment. The following were considered as signs of DCS: motor deficit or difficulty moving around (including limping, failure to maintain balance, sideways gait, falling, difficulty getting up after a fall) and death. Motor deficit was considered as anything below Level 4 on Gale's "Motor Score" scale (Gale *et al.* 1985). The time at which any sign was observed was recorded. Possible neurological damage was also assessed at higher resolution by means of a beam walk test: seven 110 cm-long wooden planks of different widths (7.7-1.7 cm) raised 110 cm above the floor. The rats were first placed on the broadest plank and their ability to cross the plank without slipping was observed twice. This was repeated with successively smaller planks and the test was scored as the narrowest plank that the rat could cross, yielding a score of between 0 (dead) and 7 (von Euler *et al.* 1996).

Blood cell counts

Counts were made on an automatic analyser (ABCvet®, SCIL, France) in samples taken four hours before pressurisation and then 30 minutes after removal from the hyperbaric chamber in

Batch 2 rats. Red blood cells, haematocrit, leukocytes and platelets were counted in 20 μl samples taken from the tip of the tail and diluted in an equivalent volume of 2 mmol.l^{-1} EDTA (Sigma, France).

Samples taken after anaesthetisation

Thirty minutes after removal from the hyperbaric chamber, the rats were anaesthetised with an intraperitoneal injection of a mixture of 10 mg.kg^{-1} xylazine (Rompum® 2%, Bayer Pharma, Germany), 100 mg.kg^{-1} ketamine (Imalgène®1000, Merial, France) and 1.65 mg.kg^{-1} acepromazine (Calmivet®, Vetoquinal, France).

At the end of the study, the rats were sacrificed by means of an intraperitoneal injection of pentobarbital (200 mg.kg^{-1} , Sanofi Santé, France).

Inflammatory cytokines and markers of oxidative stress in the blood

Immediately after anaesthetisation, blood samples were taken from Batch 2 rats by direct intra-aortic puncture for assays of IL-1 β , IL-6, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and glutathione peroxidase. Blood was collected into sterile 4 ml tubes containing lithium heparin (BD Vacutainer®, BD-Plymouth, UK) and, within 30 minutes, plasma was separated out by simple centrifugation at 1200 g and 4°C for 15 minutes. The supernatant was kept at -80°C until testing. For the TBARS test, protein was removed from the plasma before storage: 100 μl of plasma was transferred into a 1.5 ml Eppendorf tube and 200 μl iced 10% TCA was added. After 5 minutes of incubation, the tube was spun at 14.000 RPM for 5 minutes. This supernatant too was stored at -80°C until testing.

Inflammatory cytokines and markers of oxidative stress were assayed using a Bioplex100 (BioradInc, CA, USA) and a series of kits: Rat IL-1 β ELISA Kit, Rat IL-6 ELISA Kit (Sigma-Aldrich, MO, USA), QuantiChrom TBARS Assay Kit and EnzyChrom Glutathione Peroxidase Assay Kit (BioAssay Systems, CA, USA). Samples, standards and quality controls were all run in duplicate. All standards and quality controls were made up as recommended by the supplier.

Sampling the caecum

Just before sacrifice, the caecum was separated away from the rest of the digestive tract after ligation. It was weighed and then opened up using a scalpel.

Statistical analysis

Numerical data were expressed as mean \pm standard deviation or median [interquartile interval] for quantitative variables, and as percentage [95% confidence interval] for binary variables. A contingency table was used for independence and association tests, coupled with an exact Fisher or Chi ² test. Student's t test or a Mann-Whitney test was used to analyse differences between unpaired groups, and a Wilcoxon test was used for comparisons within paired groups. Spearman's test was used to investigate correlations. Differences were considered as significant if the p-value was below 0.05. Statistical calculations were carried out using XLSTAT-Pro® software (Addinsoft, Paris, France).

Results

Body weight/fluid taken in/stools/caecum

On the day of pressurisation, there was no difference in weight between the polyethylene (PEG) and control groups in either Batch 1 (408 \pm 22 g versus 398 \pm 18 g; p=0.1659) or Batch 2 (366 \pm 12 g versus 369 \pm 12 g; p=0.5304).

The volume of fluid taken in was the same in both groups (303 ml [275-348] compared with 290 ml [248-346]; p=0.3790; Batches 1 and 2 taken together).

The weight of stools collected over two days was significantly greater in the PEG group (14.73 g [12.41-16.92] compared with 8.44 g [7.81-9.30]; p=0.0001; Batches 1 and 2 taken together) (Fig. 4). The same was true of weight of water (4.62 g [2.73-5.23] compared with 1.67 g [1.23-2.43]; p=0.0001) and dry weight (10.33 g [8.47-11.87] compared with 6.79 g [5.94-7.43]; p=0.0001). Caecum weight too was significantly greater in the PEG group (11.65 g [10.60-13.20] compared with 6.93 g [6.10-8.10]; p=0.0001).

Hydrogen and carbon dioxide in exhaled air

One hour before pressurisation, there was significantly more H₂ in the air being exhaled by PEG Group rats (35 ppm [10-73] compared with 7 ppm [2-15]; p=0.0011; Batches 1 and 2 taken together) (Fig. 5). A Spearman test detected a positive correlation between H₂ in exhaled air and the weight of stools collected over two days (Batches 1 and 2 taken together, Spearman_{H₂/stools}: n=59, α =0.05, p=0.001). In contrast, no more CO₂ was being produced one hour before pressurisation in the PEG Group (9.2 ml.min⁻¹ [7.0-10.6] compared with 9.9 ml.min⁻¹ [7.2-10.6]; p=0.8140; Batches 1 and 2 taken together).

Clinical observation

In Batch 1, there were significantly fewer deaths if the PEG Group (17% [95%CI 4-41] compared with 50% [95%CI 26-74]; $p=0.0339$) (Fig. 6) and they scored somewhat better in the beam walk test (7.0 [3.5-7.0] compared with 0.5 [0.0-7.0]; $p=0.0941$).

Also in Batch 1, whether the rats had been treated with PEG or not, the weight of stools collected over two days was significantly higher in those which survived than in those which died (13.00 g [9.09-14.91] compared with 8.38 g [8.08-9.31]; $p=0.0056$) and there was also somewhat more H₂ in the air they were exhaling one hour before pressurisation (22 ppm [6-59] compared with 7 ppm [3-16]; $p=0.0777$). A Spearman test detected a positive correlation between beam walk score and the weight of stools collected over two days (lot 1, Spearman_{beam/stools}: $n=36$, $\alpha=0.05$, $p=0.009$).

Laboratory tests

Only one Batch 2 rat died and this had been treated with PEG but one rat from each group showed objective signs of neurological damage.

Blood counts

In Batch 2, there was a significantly smaller drop in platelet count after hyperbaric exposure in the PEG Group (-6.0% [-9.6;-0.8] compared with -15.4% [-19.6;-8.5]; $p=0.0256$) (Fig. 7). Similarly, although there was only a tendency towards a drop in leukocyte count on removal from the hyperbaric chamber in the PEG Group (-27.6% [-37.4;-14.2]; $p=0.0611$), the drop was significant in the untreated group (-32.1% [-47.4;-23.6]; $p=0.0051$).

In Batch 2, no significant difference was observed between the two groups in haematocrit four hours before pressurisation (46.6% [44.8-48.6] compared with 48.0% [45.8-51.4]; $p=0.4415$).

Inflammatory cytokines and markers of oxidative stress in the blood

In Batch 2, the levels of inflammatory cytokines in arterial blood after anaesthesia were significantly lower in the PEG Group: IL-1 β (39.298 \pm 4.954 pg.ml⁻¹ versus 59.944 \pm 14.659 pg.ml⁻¹; $p=0.0005$) and IL-6 (1159.77 \pm 38.42 pg.ml⁻¹ versus 1264.86 \pm 121.51 pg.ml⁻¹; $p=0.0178$) (Fig. 8). Moreover, glutathione peroxidase activity was significantly higher in the PEG Group (525.417 \pm 92.867 U.l⁻¹ versus 378.495 \pm 74.385 U.l⁻¹; $p=0.0010$) (Fig. 9). A Spearman test revealed a tendency towards positive correlation between glutathione peroxidase activity and the amount of H₂ in the exhaled air (lot 2, Spearman_{GPX/H2}: $n=20$, $\alpha=0.05$, $p=0.087$). In contrast, no significant difference emerged with respect to TBARS

($0.617 \pm 0.183 \mu\text{mol.l}^{-1}$ malondialdehyde (MDA) equivalents versus $0.577 \pm 0.195 \mu\text{mol.l}^{-1}$; $p=0.6423$).

Discussion

In rats being fed a standard diet, we have shown that the ingestion of PEG for 7 days before a dive results in shorter bowel transit time and a significant increase in the rate of gut fermentation. At the same time and exactly the opposite of what was expected, this resulted in a significant reduction in the incidence of DCS according to both clinical criteria (lower mortality) and laboratory test results (smaller drops in platelet and red blood cell counts and lower levels of inflammatory cytokines in the bloodstream).

Effects of prolonged acceleration of bowel transit

Various experts have shown that faecal weight correlates with the rate of bowel transit in both rats (Bustos *et al.* 1991) and humans (El Oufir *et al.* 1996, Lewis & Heaton 1997). A positive correlation was detected between bowel transit time and both the incidence and severity of DCS. So it seems that faster bowel transit cuts down the risk of DCS in rats. Further experiments will be required to investigate the various factors that can accelerate bowel transit with the aim of preventing DCS.

An association between modification of the gut microbiota and increased fermentation has already been demonstrated in a number of cases, as with prokinetic agents like cisapride in humans (El Oufir *et al.* 1996) and bisacodyl in rats (Bustos *et al.* 1991).

For other molecules, an increase in fermentation rate is expected from the inversely proportional relationship between bowel transit time and the amount of H_2 in exhaled air (El Oufir *et al.* 1996, Lewis & Heaton 1997, Bustos *et al.* 1991). This is what happens with certain antiemetic agents such as metoclopramide and domperidone which affect oro-caecal transit time (Staniforth 1987). Regular physical exercise can also stimulate fermentation by accelerating oro-caecal transit (Enck *et al.* 1989) and experiments on humanised mice (i.e. germ-free mice inoculated with human faecal microbiota) have shown that a diet based on unfermentable cellulose speeds up gastrointestinal transit and induces changes in the gut microbiota similar to those observed after the administration of PEG (Kashyap *et al.* 2013). In turn, short-chain fatty acids—which result from gut fermentation—could also stimulate fermentation by speeding up transit through the small intestine (Richardson *et al.* 1991), and H_2 produced in the colon could accelerate transit in this part of the gut, especially the proximal colon (Jouët *et al.* 2008, Jahng *et al.* 2012).

Effects of long-term stimulation of gut fermentation

These experiments point to a negative correlation between bowel transit time and the amount of H₂ being exhaled which gives a measure of the rate of gut fermentation. The absence of any difference in weight or haematocrit after 7 days of treatment with PEG does not support the idea that it is the level of hydration that determines the risk of DCS. It could therefore be that the beneficial effect of accelerated bowel transit cannot be dissociated from long-term stimulation of fermentation.

We observed a tendency towards positive correlation between exhaled H₂ and the activity of glutathione peroxidase, an enzyme with antioxidant properties. In a previous study, we showed that endogenous H₂ production as a result of bacterial fermentation could help prevent DCS (de Maistre *et al.* 2016). Intraperitoneal administration of H₂-enriched normal saline over the 24 hours before a high-risk dive can prevent DCS in rats (Ni *et al.* 2011). It was recently shown in humans that successive deep dives have a negative effect on endothelial function and induce oxidative stress (Obad *et al.* 2010). It has been shown that H₂ can act as an antioxidant by selectively reducing the hydroxyl radical (OH[•]) and peroxynitrite anion (ONOO⁻); however, H₂ does not react with other biologically active reactive oxygen intermediates (Ohsawa *et al.* 2007). The same group have shown that inhaling H₂ gas attenuates brain damage following focal ischaemia/reperfusion injury in rats by neutralising the effects of oxidative stress. The mechanism of action underlying this phenomenon involves both anti-inflammatory and anti-apoptotic effects (Liu *et al.* 2011, Ji *et al.* 2011, Wei *et al.* 2015). H₂ could also limit broaching of the blood-brain barrier by reducing reactive oxygen intermediates and inhibiting the activity of matrix metalloproteinase-9 (Takeuchi *et al.* 2015). Others have shown that inhaled H₂ can have a positive effect on medullary ischaemia-reperfusion lesions in rabbits (Huang *et al.* 2010). Finally, endogenous H₂ produced by fermentation after the ingestion of lactulose exerts neuroprotective effects with respect to ischaemia-reperfusion lesions in the rat brain (Zhai *et al.* X, 2013); the same could apply to DCS.

However, gut gases are not the only metabolites generated by bacterial fermentation of undigestible carbohydrates. Quantitative analyses of products of *in vitro* fermentation of lactulose have shown that the main non-gaseous metabolites are acetic, lactic and butyric acids which are all typically produced by *Clostridium* spp. (Sahota *et al.* 1982). And butyrate, a short-chain fatty acid, is known for its neuroprotective activity. As an inhibitor of histone deacetylase, butyrate has antioxidant (Sun *et al.* 2015), anti-inflammatory and anti-apoptotic

effects (Kim & Chuang 2014, Sun *et al.* 2015, Sun *et al.* 2016a). The activation of microglial cells and macrophages/monocytes induced by definitive ablation of the middle cerebral artery—which damages white matter—is inhibited by butyrate (Kim & Chuang 2014). A cell survival signalling pathway based on phospho kinase B and BDNF underlies the inhibition of apoptosis (Sun *et al.* 2015). Inhibition of the 81 receptor coupled to a G Protein through 3-hydroxybutyrate also significantly reduces cell death and brain damage after obstruction of the middle cerebral artery (Shen *et al.* 2015). Moreover, butyrate seems to be able to repair the blood-brain barrier by stimulating the expression of proteins found in tight junctions (occludin and zonula occludens-1) (Li *et al.* 2016).

Why stimulate gut fermentation

To prevent decompression sickness

On first glance, the findings reported here might seem to contradict our previous results (de Maistre *et al.* 2006) whereas in both cases the aim was to stimulate gut fermentation.

It can be seen that the levels of H₂ measured in exhaled air one hour before a dive were significantly lower than those reported previously (35 ppm [10-73] compared with 119 ppm [76-166]; p=0.0003) (de Maistre *et al.* 2006). Thus, it can be assumed that the surplus load of inert gas in the form of H₂ generated by bacterial fermentation in the course of hyperbaric exposure was insufficient to induce a significant increase in bubble formation during decompression. So it seems that that not enough H₂ was generated inside the body to exacerbate the risk of DCS in rats.

In addition, while previously we stimulated fermentation by administering a bolus dose of mannitol four hours before the dive (de Maistre *et al.* 2016), this time we undertook long-term stimulation of bowel transit for fully 7 days before the dive: it may be that some time is required before the neuroprotective effects of endogenous H₂ and butyrate are expressed which would explain why no such effect was observed in the previous experiments (de Maistre *et al.* 2016).

Our findings point to a two-edged effect of gut fermentation on decompression: although deleterious in the short term, i.e. at the time of diving, longer-term gut fermentation between dives might have a positive effect by preventing the occurrence of DCS and limiting its severity (Fig. 10). So it might seem wise to cut out foodstuffs with high fermentation potential the day before a dive. In addition, any factor that might affect the gut microbiota and stimulate fermentation (prebiotic and probiotic products) could be tested to investigate its potential in protecting against DCS.

To treat decompression sickness

Due to lack of control of the gastrointestinal system by the central nervous system, many people with spinal cord damage suffer from impaired gut function with effects on bowel transit time. And specifically, the density of butyrate-producing bacteria is lower in people with spinal cord damage than in healthy subjects (Gungor *et al.* 2016). By inhibiting histone deacetylase, butyrate also stimulates neurogenesis and could come into play in the later stages of neurovascular recovery (Kim & Chuang 2014). Cell proliferation, migration and differentiation induced by the inhibition of histone deacetylase involves brain-derived neurotrophic factor and its receptor, tropomyosin receptor kinase B (Kim & Chuang 2014). Butyrate is a potent stimulant for vascular endothelial growth factor which plays central roles in neurogenesis, angiogenesis and functional recovery after ischaemic stroke (Kim & Chuang 2014). So replenishing butyrate-producing bacteria could also be effective in the management of neurological DCS.

Finally, H₂ can be an effective anti-oxidant treatment: because it readily crosses membranes, it can reach and neutralise cytotoxic reactive oxygen intermediates, thereby protecting against oxidative damage (Ohsawa *et al.* 2007). It could be used in the early stages of tissue damage which are characterised by cell death, inflammation and compromise of the blood-brain barrier.

Conclusion

Our findings suggest that, in contrast to what was expected, long-term stimulation of fermentation by decreasing bowel transit time between dives seems to reduce the risk of DCS in rats. Our findings point to a two-edged effect of gut fermentation on decompression: although deleterious in the short term, i.e. at the time of diving, longer-term gut fermentation between dives might have a positive effect by preventing the occurrence of DCS and limiting its severity. H₂ which has antioxidant properties and butyrate, a short-chain fatty acid, are both by-products of the fermentation of carbohydrate and both have neuroprotective activity. These could play a positive role when it comes to treating DCS.

Acknowledgments

We are very grateful to Myriam Dalous for her excellent technical assistance, and to Bruno Schmid, our Research & Development engineer for his valuable contribution.

Grants

The research was supported by the “Délégation Générale pour l’Armement” (COSSA2015). It should be attributed to the “Institut de Recherches Biomédicales des Armées” laboratories (Toulon, France).

Disclosures

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SdM NV CD JEB. Performed the experiments: SdM NV JEB. Analyzed the data: SdM EG JEB. Contributed reagents/materials/analysis tools: SdM NV. Wrote the paper: SdM JEB.

Figure and table legends

Fig. 1. Distribution of rats in experimental groups.

Fig. 2. Flow chart describing the experimental design.

Fig. 3. Installation used for the measurement of hydrogen and carbon dioxide in exhaled air in rats.

Fig. 4. Weight of water and dry weight of stools collected for 48 hours in rats. *denotes $p < 0.0001$ between the groups.

Fig. 5. Hydrogen in exhaled air 1 hour before pressurization in rats. *denotes $p < 0.01$ between the groups.

Fig. 6. Percents of dead rats within 30 min after surfacing in batch 1 rats. *denotes $p < 0.05$ between the groups.

Fig. 7. Percents of platelets consumption after decompression from the baseline in batch 2 rats. *denotes $p < 0.05$ between the groups.

Fig. 8. Proinflammatory cytokines arterial content in batch 2 rats. *denotes $p < 0.001$ and #denotes $p < 0,05$ between the groups.

Fig. 9. Markers of oxidative stress arterial content in batch 2 rats. *denotes $p < 0.001$ between the groups; NS, not significant.

Fig. 10. Summary of the effects of gut fermentation on the risk of decompression sickness.

References

1. **Altomare DF, Bonfrate L, Krawczyk M, Lammert F, Caputi-Jambrenghi O, Rizzi S, Vacca M, and Portincasa P.** The inulin hydrogen breath test predicts the quality of colonic preparation. *Surg Endosc* 28: 1579-1587, 2014.
2. **Basit AW, Newton JM, Short MD, Waddington WA, Ell PJ, and Lacey LF.** The effect of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit: implications for the formulation of poorly-water soluble drugs. *Pharm Res* 18: 1146-1150, 2001.
3. **Berghage TE, David TD, and Dyson CV.** Species differences in decompression. *Undersea Biomed Res* 6: 1-13, 1979.
4. **Bert P.** *La pression barométrique.* Masson, 1878.
5. **Blatteau JE, Brubakk AO, Gempp E, Castagna O, Risso JJ, and Vallee N.** Sildenafil pre-treatment promotes decompression sickness in rats. *PLoS One* 8: e60639, 2013.
6. **Blatteau JE, Gempp E, Simon O, Coulange M, Delafosse B, Souday V, Cochard G, Arvieux J, Henckes A, Lafere P, Germonpre P, Lapoussiere JM, Hugon M, Constantin P, and Barthelemy A.** Prognostic factors of spinal cord decompression sickness in recreational diving: retrospective and multicentric analysis of 279 cases. *Neurocrit Care* 15: 120-127, 2010.
7. **Blatteau JE, Souraud JB, Gempp E, and Boussuges A.** Gas nuclei, their origin, and their role in bubble formation. *Aviat Space Environ Med* 77: 1068-1076, 2006.
8. **Briet F, Flourie B, Achour L, Maurel M, Rambaud JC, and Messing B.** Bacterial adaptation in patients with short bowel and colon in continuity. *Gastroenterology* 109: 1446-1453, 1995.
9. **Bustos D, Ogawa K, Pons S, Soriano E, Bandi JC, and Bustos Fernandez L.** Effect of loperamide and bisacodyl on intestinal transit time, fecal weight and short chain fatty acid excretion in the rat. *Acta Gastroenterol Latinoam* 21: 3-9, 1991.
10. **Coremans G, Vos R, Margaritis V, Ghoois Y, and Janssens J.** Small doses of the unabsorbable substance polyethylene glycol 3350 accelerate oro-caecal transit, but slow gastric emptying in healthy subjects. *Dig Liver Dis* 37: 97-101, 2005.
11. **de Maistre S, Vallee N, Gempp E, Lambrechts K, Louge P, Duchamp C, and Blatteau JE.** Colonic Fermentation Promotes Decompression sickness in Rats. *Sci Rep* 6: 20379, 2016.
12. **El Oufir L, Flourie B, Bruley des Varannes S, Barry JL, Cloarec D, Bornet F, and Galmiche JP.** Relations between transit time, fermentation products, and hydrogen consuming flora in healthy humans. *Gut* 38: 870-877, 1996.

13. **Enck P, Merlin V, Erckenbrecht JF, and Wienbeck M.** Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut* 30: 455-459, 1989.
14. **Francis TJ, and Mitchell SJ.** Pathophysiology of decompression sickness. In: *Bennett and Elliott's Physiology and medicine of diving*, edited by Brubakk AO, and Neuman TS. London: WB Saunders, 2003, p. 530-556.
15. **Gale K, Kerasidis H, and Wrathall JR.** Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol* 88: 123-134, 1985.
16. **Gremse DA, Hixon J, and Crutchfield A.** Comparison of polyethylene glycol 3350 and lactulose for treatment of chronic constipation in children. *Clin Pediatr (Phila)* 41: 225-229, 2002.
17. **Gungor B, Adiguzel E, Gursel I, Yilmaz B, and Gursel M.** Intestinal Microbiota in Patients with Spinal Cord Injury. *PLoS One* 11: e0145878, 2016.
18. **Huang Y, Xie K, Li J, Xu N, Gong G, Wang G, Yu Y, Dong H, and Xiong L.** Beneficial effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Brain Res* 1378: 125-136, 2010.
19. **Ito M, Hirayama M, Yamai K, Goto S, Ichihara M, and Ohno K.** Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Med Gas Res* 2: 15, 2012.
20. **Jahng J, Jung IS, Choi EJ, Conklin JL, and Park H.** The effects of methane and hydrogen gases produced by enteric bacteria on ileal motility and colonic transit time. *Neurogastroenterol Motil* 24: 185-190, e192, 2012.
21. **Ji Q, Hui K, Zhang L, Sun X, Li W, and Duan M.** The effect of hydrogen-rich saline on the brain of rats with transient ischemia. *J Surg Res* 168: e95-101, 2011.
22. **Jouet P, Sabate JM, Flourie B, Cuillerier E, Gambini D, Lemann M, Jian R, and Coffin B.** Effects of therapeutic doses of lactulose vs. polyethylene glycol on isotopic colonic transit. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 988-993, 2008.
23. **Kashyap PC, Marcobal A, Ursell LK, Larauche M, Duboc H, Earle KA, Sonnenburg ED, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Million M, Tache Y, Pasricha PJ, Knight R, Farrugia G, and Sonnenburg JL.** Complex interactions among diet, gastrointestinal transit, and gut microbiota in humanized mice. *Gastroenterology* 144: 967-977, 2013.
24. **Kayar SR, and Fahlman A.** Decompression sickness risk reduced by native intestinal flora in pigs after H₂ dives. *Undersea Hyperb Med* 28: 89-97, 2001.

25. **Kayar SR, Fahlman A, Lin WC, and Whitman WB.** Increasing activity of H(2)-metabolizing microbes lowers decompression sickness risk in pigs during H(2) dives. *J Appl Physiol (1985)* 91: 2713-2719, 2001.
26. **Kayar SR, Miller TL, Wolin MJ, Aukhert EO, Axley MJ, and Kiesow LA.** Decompression sickness risk in rats by microbial removal of dissolved gas. *Am J Physiol* 275: R677-682, 1998.
27. **Kayar SR.** Biochemical Approach to Decompression. In: *The future of diving: 100 years of Haldane and beyond*, edited by Brubakk A, and Lang MA. Washington, DC: Smithsonian Institution Scholarly Press, 2009, p. 33-39.
28. **Kim HJ, and Chuang DM.** HDAC inhibitors mitigate ischemia-induced oligodendrocyte damage: potential roles of oligodendrogenesis, VEGF, and anti-inflammation. *Am J Transl Res* 6: 206-223, 2014.
29. **Lewis SJ, and Heaton KW.** Increasing butyrate concentration in the distal colon by accelerating intestinal transit. *Gut* 41: 245-251, 1997.
30. **Li H, Sun J, Wang F, Ding G, Chen W, Fang R, Yao Y, Pang M, Lu ZQ, and Liu J.** Sodium butyrate exerts neuroprotective effects by restoring the blood-brain barrier in traumatic brain injury mice. *Brain Res* 1642: 70-78, 2016.
31. **Liu Y, Liu W, Sun X, Li R, Sun Q, Cai J, Kang Z, Lv S, Zhang JH, and Zhang W.** Hydrogen saline offers neuroprotection by reducing oxidative stress in a focal cerebral ischemia-reperfusion rat model. *Med Gas Res* 1: 15, 2011.
32. **Mann NS, Condon DS, and Leung JW.** Colonic preparation correlates with fasting breath hydrogen in patients undergoing colonoscopy. *Hepatogastroenterology* 50: 85-86, 2003.
33. **Montcalm-Smith EA, Fahlman A, and Kayar SR.** Pharmacological interventions to decompression sickness in rats: comparison of five agents. *Aviat Space Environ Med* 79: 7-13, 2008.
34. **Ni XX, Cai ZY, Fan DF, Liu Y, Zhang RJ, Liu SL, Kang ZM, Liu K, Li RP, Sun XJ, and Xu WG.** Protective effect of hydrogen-rich saline on decompression sickness in rats. *Aviat Space Environ Med* 82: 604-609, 2011.
35. **Nishi RY, Brubakk AO, and Eftedal OS.** Bubble detection. In: *The Bennett and Elliot's physiology and medicine of diving* edited by Brubakk AO, and Neuman TS. London: WB Saunders, 2003, p. 501-529.

36. **Obad A, Valic Z, Palada I, Brubakk AO, Modun D, and Dujic Z.** Antioxidant pretreatment and reduced arterial endothelial dysfunction after diving. *Aviat Space Environ Med* 78: 1114-1120, 2007.
37. **Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, and Ohta S.** Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13: 688-694, 2007.
38. **Pontier JM, Blatteau JE, and Vallee N.** Blood platelet count and severity of decompression sickness in rats after a provocative dive. *Aviat Space Environ Med* 79: 761-764, 2008.
39. **Richardson A, Delbridge AT, Brown NJ, Rumsey RD, and Read NW.** Short chain fatty acids in the terminal ileum accelerate stomach to caecum transit time in the rat. *Gut* 32: 266-269, 1991.
40. **Sahota SS, Bramley PM, and Menzies IS.** The fermentation of lactulose by colonic bacteria. *J Gen Microbiol* 128: 319-325, 1982.
41. **Sawatzky KD.** The relationship between intravascular Doppler-detected gas bubbles and decompression sickness after bounce diving in humans. Toronto: York University, 1991.
42. **Schulze JD, Waddington WA, Eli PJ, Parsons GE, Coffin MD, and Basit AW.** Concentration-dependent effects of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit and drug absorption. *Pharm Res* 20: 1984-1988, 2003.
43. **Shen Z, Jiang L, Yuan Y, Deng T, Zheng YR, Zhao YY, Li WL, Wu JY, Gao JQ, Hu WW, Zhang XN, and Chen Z.** Inhibition of G protein-coupled receptor 81 (GPR81) protects against ischemic brain injury. *CNS Neurosci Ther* 21: 271-279, 2015.
44. **Staniforth DH.** Effect of drugs on oro-caecal transit time assessed by the lactulose/breath hydrogen method. *Eur J Clin Pharmacol* 33: 55-58, 1987.
45. **Strohl KP, Thomas AJ, St Jean P, Schlenker EH, Koletsky RJ, and Schork NJ.** Ventilation and metabolism among rat strains. *J Appl Physiol* 82: 317-323, 1997.
46. **Sun J, Ling Z, Wang F, Chen W, Li H, Jin J, Zhang H, Pang M, Yu J, and Liu J.** Clostridium butyricum pretreatment attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice via anti-oxidation and anti-apoptosis. *Neurosci Lett* 613: 30-35, 2016.
47. **Sun J, Wang F, Li H, Zhang H, Jin J, Chen W, Pang M, Yu J, He Y, Liu J, and Liu C.** Neuroprotective Effect of Sodium Butyrate against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Biomed Res Int* 2015: 395895, 2015.

48. **Takeuchi S, Nagatani K, Otani N, Nawashiro H, Sugawara T, Wada K, and Mori K.** Hydrogen improves neurological function through attenuation of blood-brain barrier disruption in spontaneously hypertensive stroke-prone rats. *BMC Neurosci* 16: 22, 2015.
49. **von Euler M, Akesson E, Samuelsson EB, Seiger A, and Sundstrom E.** Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 137: 242-254, 1996.
50. **Wei R, Zhang R, Xie Y, Shen L, and Chen F.** Hydrogen Suppresses Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cell Death in Hippocampal Neurons Through Reducing Oxidative Stress. *Cell Physiol Biochem* 36: 585-598, 2015.
51. **Zhai X, Chen X, Shi J, Shi D, Ye Z, Liu W, Li M, Wang Q, Kang Z, Bi H, and Sun X.** Lactulose ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inducing hydrogen by activating Nrf2 expression. *Free Radic Biol Med* 65: 731-741, 2013.

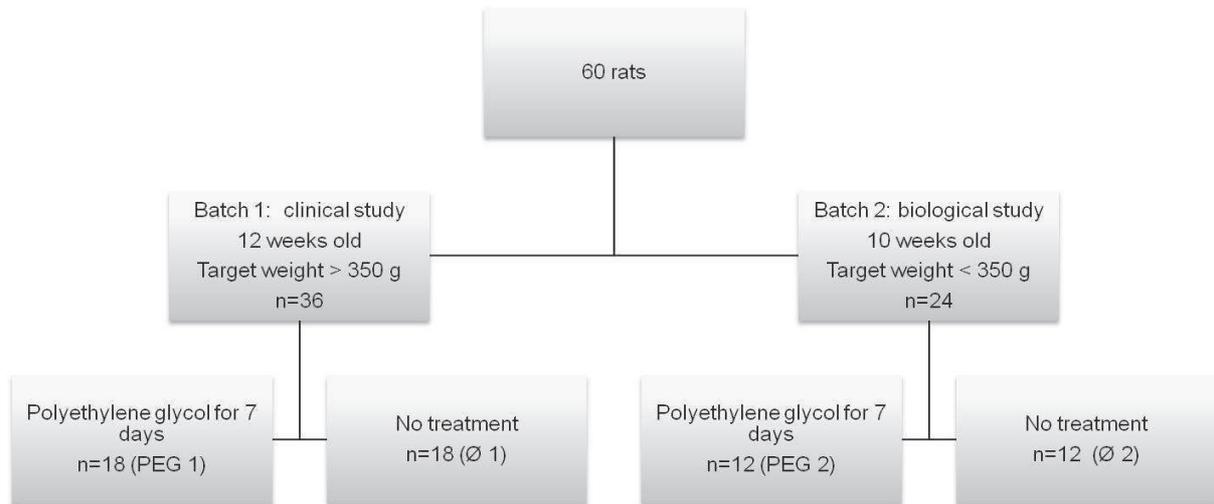


Fig. 3. Distribution of rats in experimental groups.

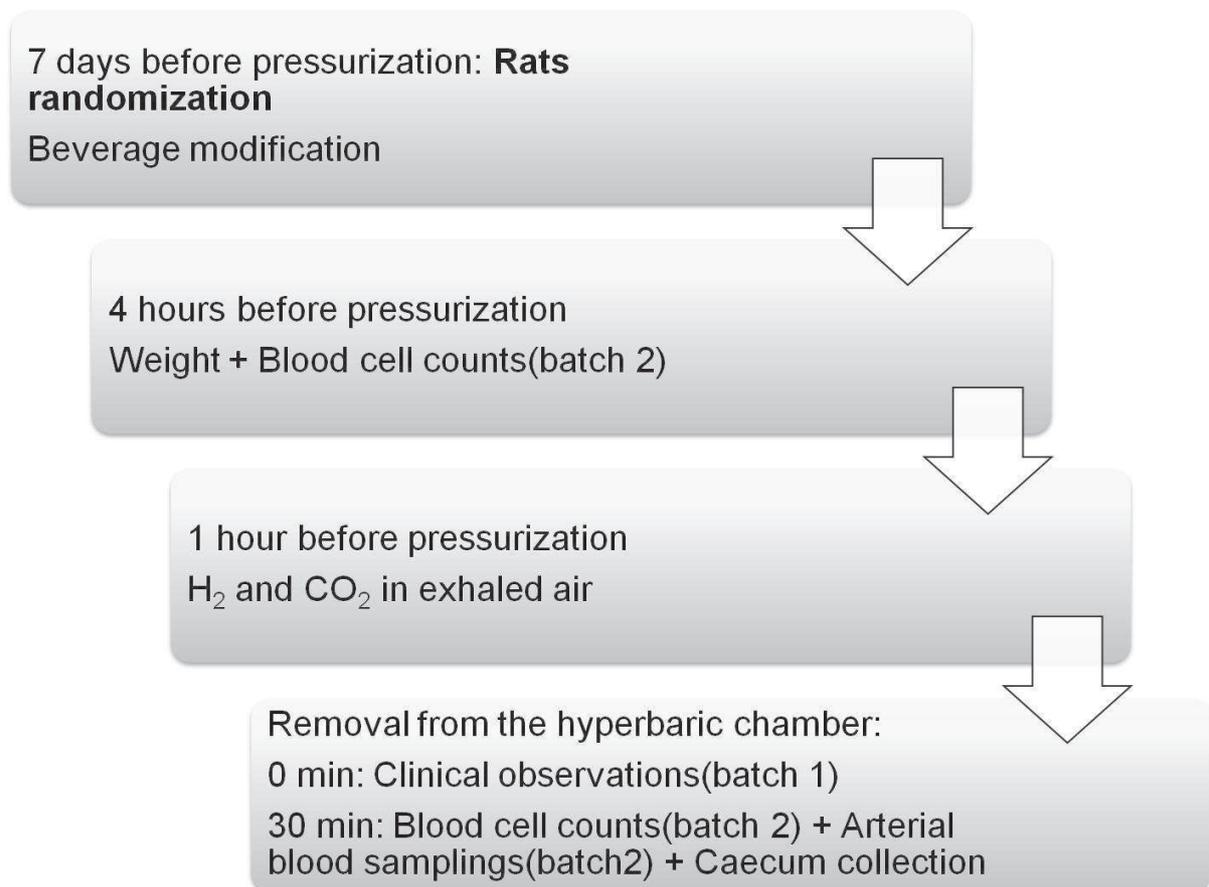


Fig. 4. Flow chart describing the experimental design.

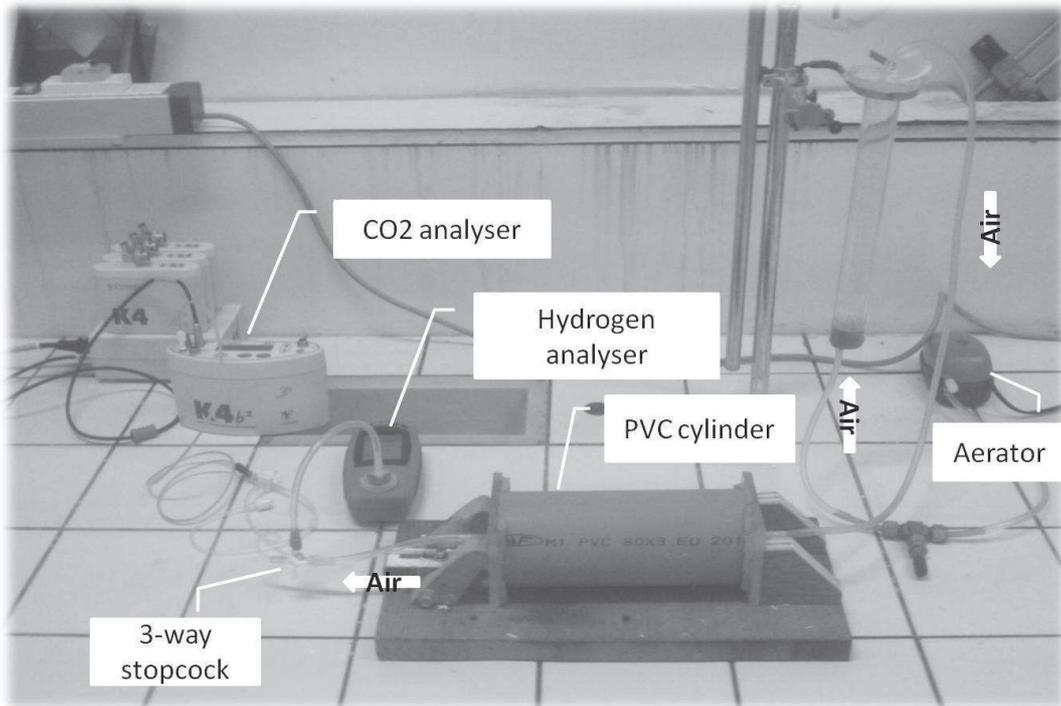


Fig. 5. Installation used for the measurement of hydrogen and carbon dioxide in exhaled air in rats.

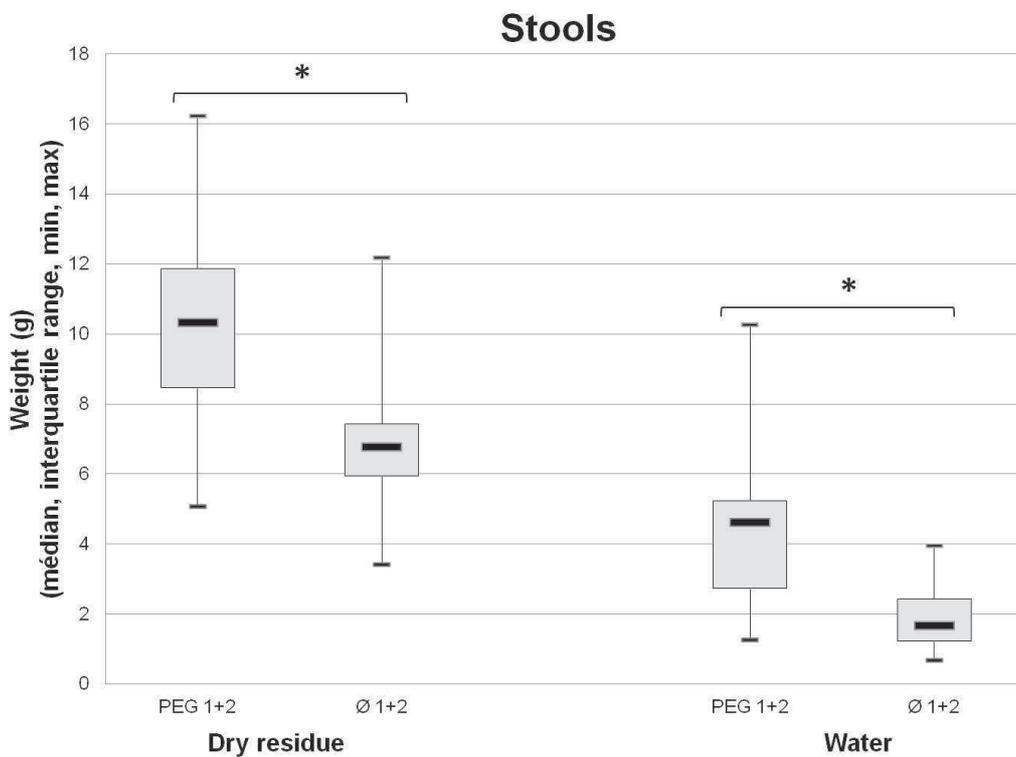


Fig. 6. Weight of water and dry weight of stools collected for 48 hours in rats. *denotes $p < 0.0001$ between the groups.

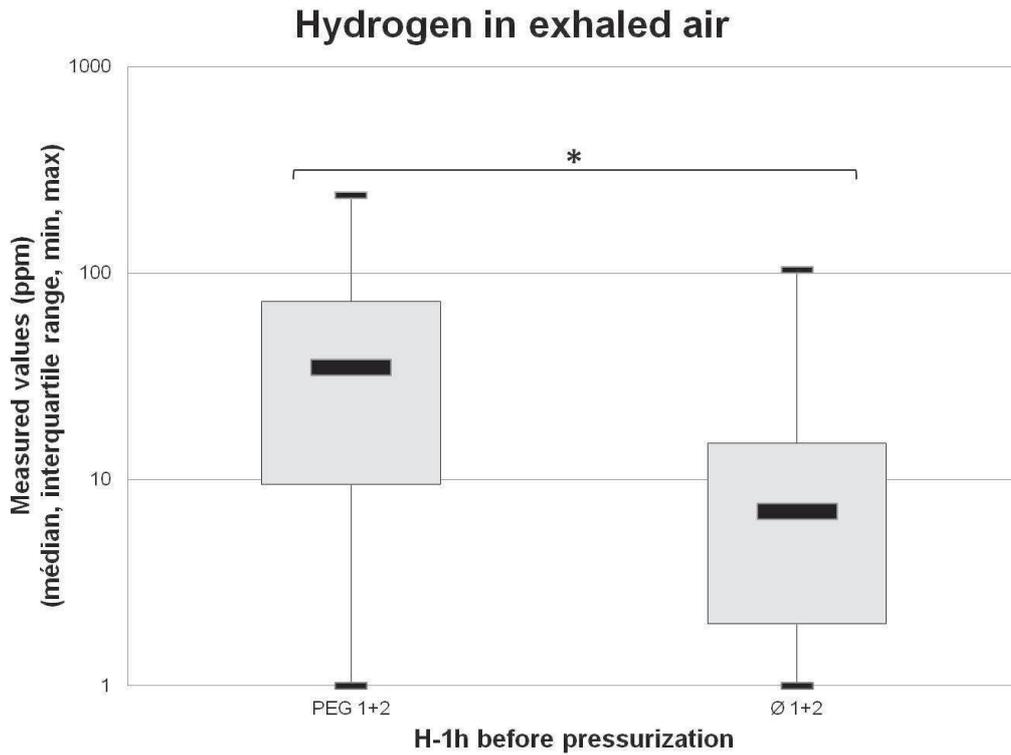


Fig. 7. Hydrogen in exhaled air 1 hour before pressurization in rats. *denotes $p < 0.01$ between the groups.

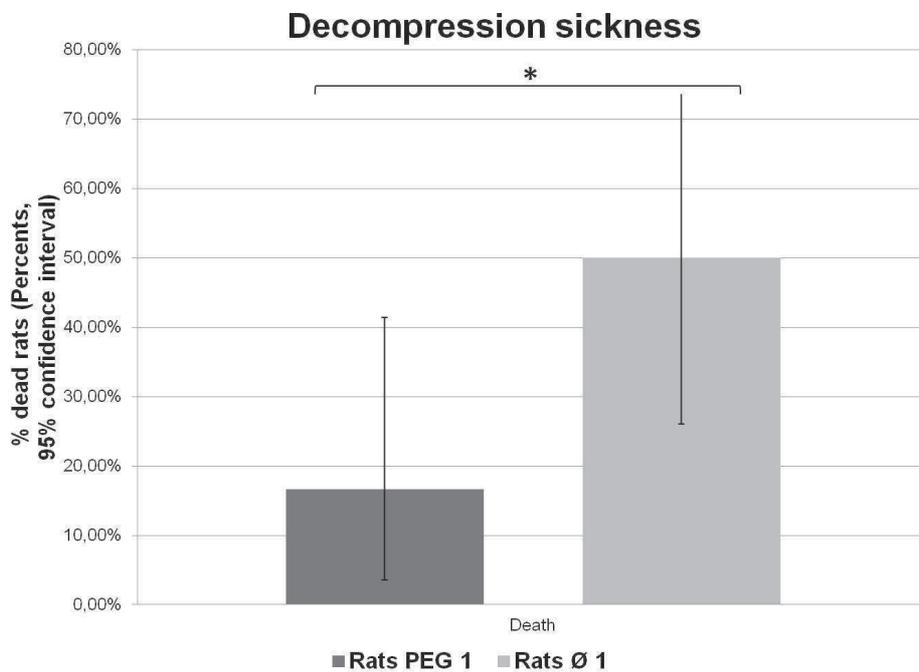


Fig. 8. Percents of dead rats within 30 min after surfacing in batch 1 rats. *denotes $p < 0.05$ between the groups.

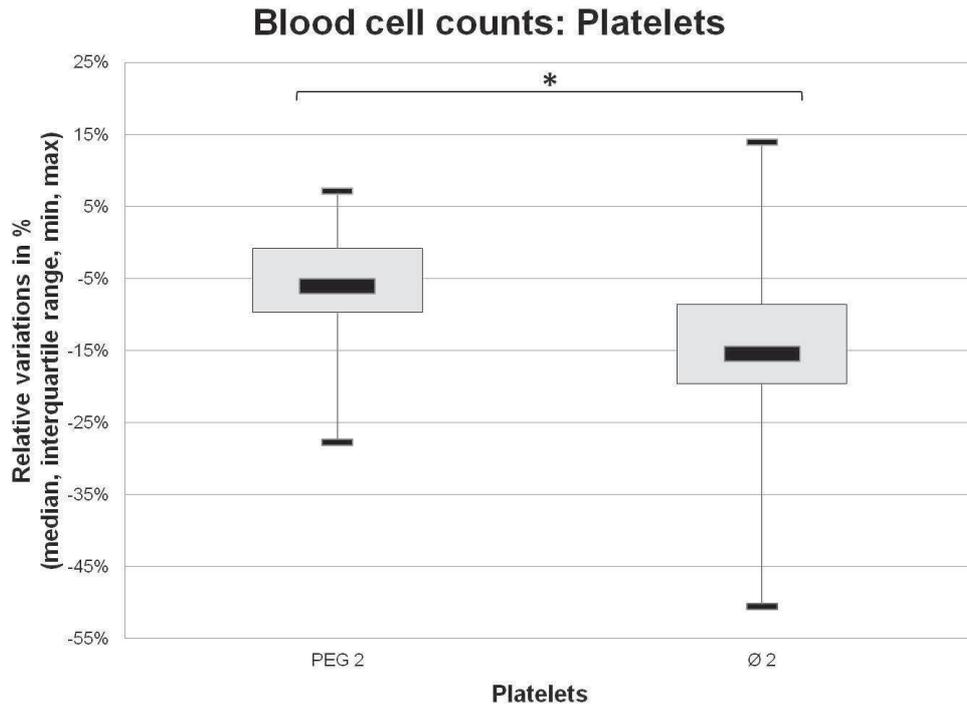


Fig. 9. Percents of platelets consumption after decompression from the baseline in batch 2 rats. *denotes $p < 0.05$ between the groups.

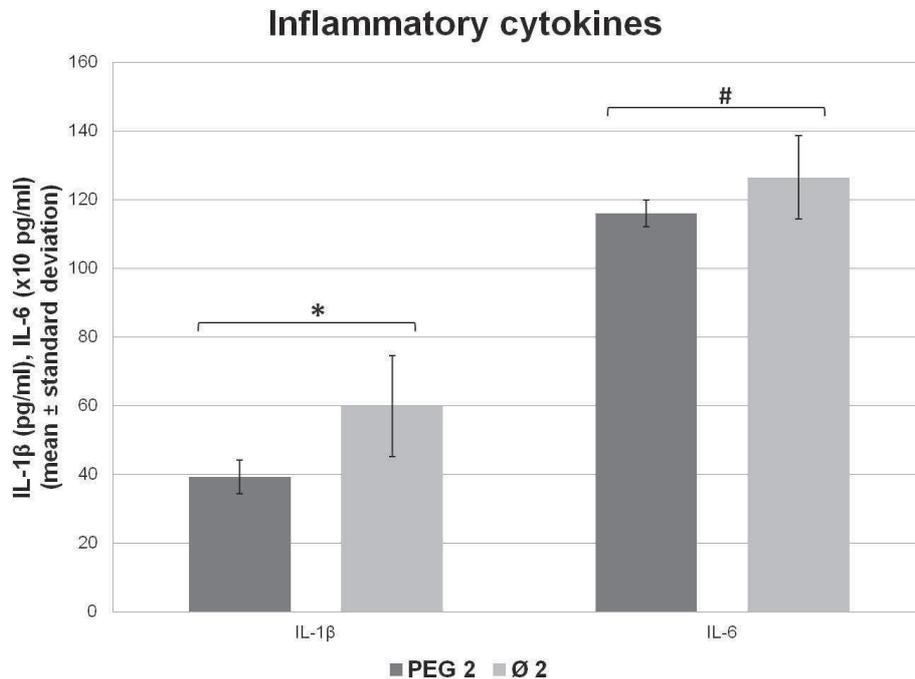


Fig. 10. Proinflammatory cytokines arterial content in batch 2 rats. *denotes $p < 0.001$ and #denotes $p < 0,05$ between the groups.

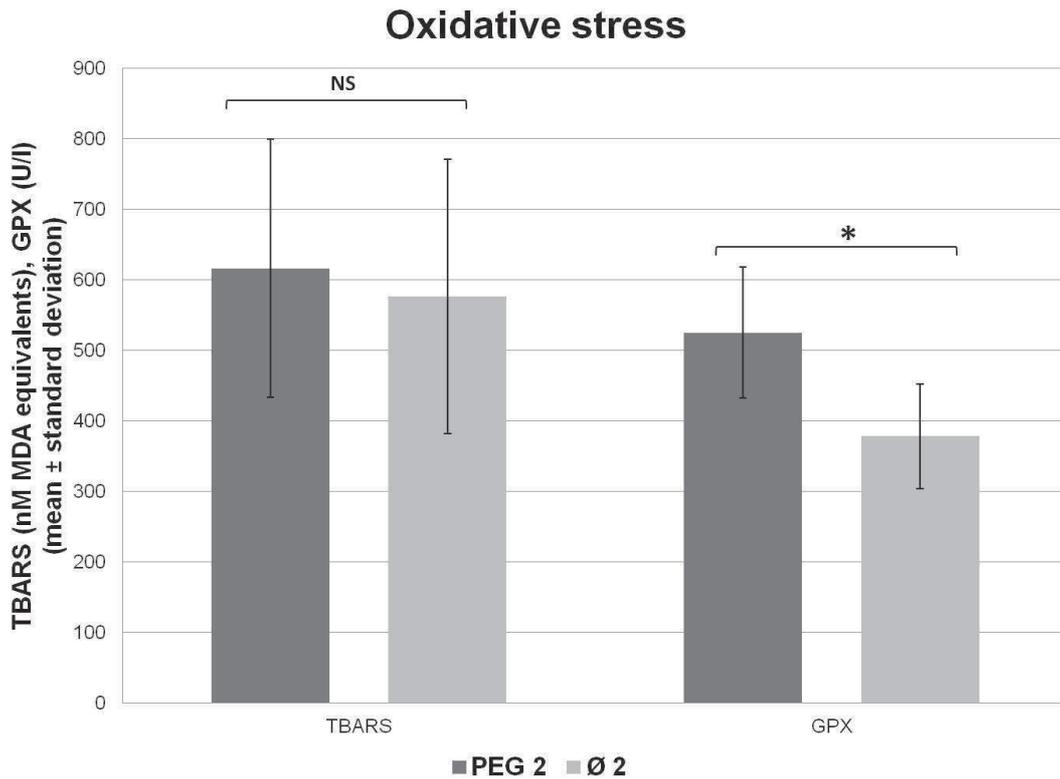


Fig. 11. Markers of oxidative stress arterial content in batch 2 rats. *denotes $p < 0.001$ between the groups; NS, not significant.

Two-edged effect of gut fermentation

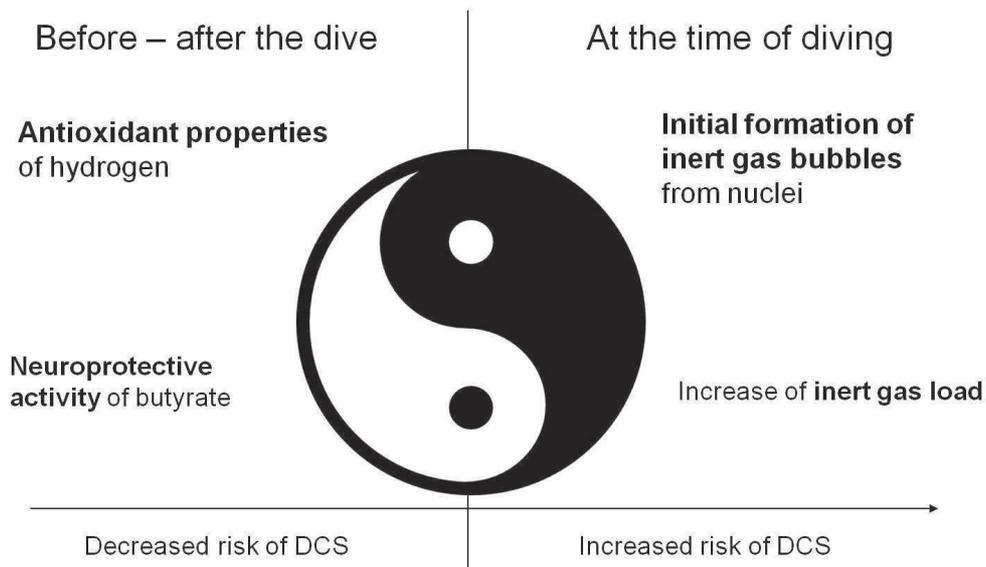


Fig. 12. Summary of the effects of intestinal fermentation on the risk of decompression sickness.

DISCUSSION

Nos résultats sont en faveur d'un effet dual de la fermentation intestinale sur la décompression (Figure 14). Délétère à court terme lors de la plongée, la fermentation intestinale prolongée pourrait être favorable en dehors de la plongée en prévenant la survenue et la sévérité d'un ADD.

1 Effet néfaste à court terme de la fermentation lors de la plongée

Nous avons montré, aussi bien chez le rat que chez l'homme, que la fermentation bactérienne de sucres non digérés lors de la plongée, s'accompagne d'une plus grande incidence des accidents de désaturation (de Maistre et coll. 2016a, de Maistre et coll. 2016b). Une partie de l'hydrogène formé par la fermentation dans l'intestin diffuse à travers la barrière intestinale dans tous l'organisme ; cet hydrogène endogène semble avoir un effet délétère dans l'ADD. Nous pensons qu'il contribue à augmenter directement la charge en gaz diluant au cours de l'exposition hyperbare, et participe ainsi à la formation de bulles pendant la phase de décompression (Figure 14).

1.1 Devenir des gaz intestinaux

La sortie des gaz résulte de l'absorption et de l'excrétion respiratoire, de la consommation bactérienne et de l'évacuation anale (Figures 7).

Les gaz intraluminaux tendent à s'équilibrer avec les gaz du sang veineux selon trois facteurs : la pression partielle de chaque gaz des deux côtés de la barrière intestinale, sa capacité de diffusion et le temps d'exposition du gaz à la surface de diffusion, qui dépend de la vitesse de son transit (Strocchi & Levitt 1998). Ainsi, des gaz fortement diffusibles présents en grandes quantités dans le tube digestif, tel que le dioxyde de carbone (CO_2), sont facilement absorbés. L'oxygène (O_2) provenant de l'air dégluti est également absorbé pour s'équilibrer avec sa pression partielle dans le sang. L'azote (N_2), provenant lui aussi de l'air dégluti, a une capacité de diffusion beaucoup plus faible.

À la différence des processus précédents, le rôle du microbiote sur le métabolisme des gaz varie de façon très importante d'un individu à l'autre et constitue, par conséquent, le facteur déterminant du devenir des gaz intraluminaux. Une partie du microbiote colique consomme les gaz intraluminaux, ce qui peut expliquer une grande partie de la disparition des gaz intraluminaux (Suarez et coll. 1997, Strocchi & Levitt 1992, Gibson et coll. 1990). De fait,

Effet dual de la fermentation intestinale

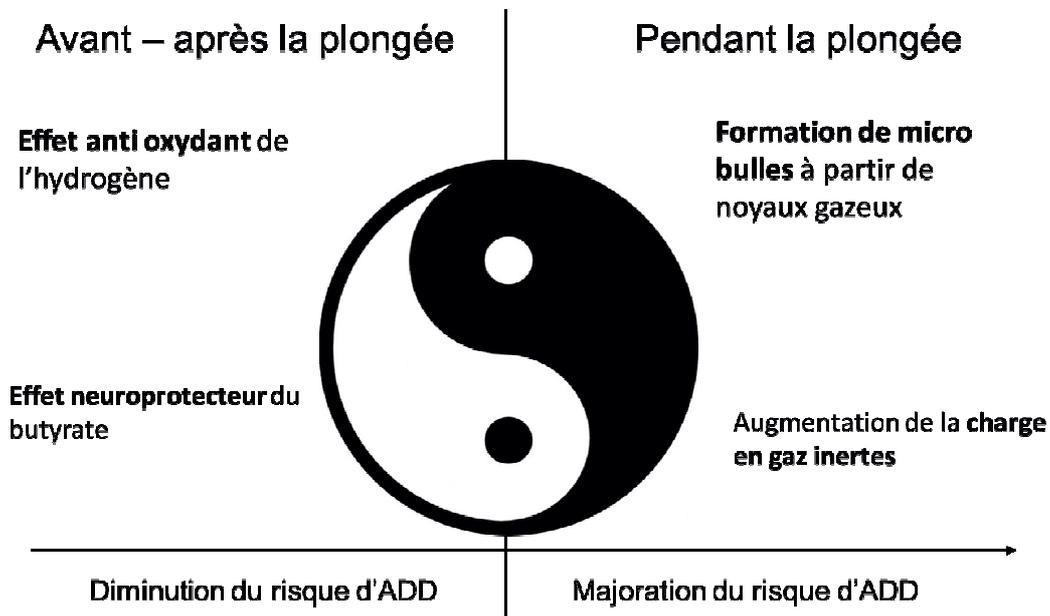


Figure 14 : Résumé des effets de la fermentation intestinale par rapport au risque d'accident de désaturation.

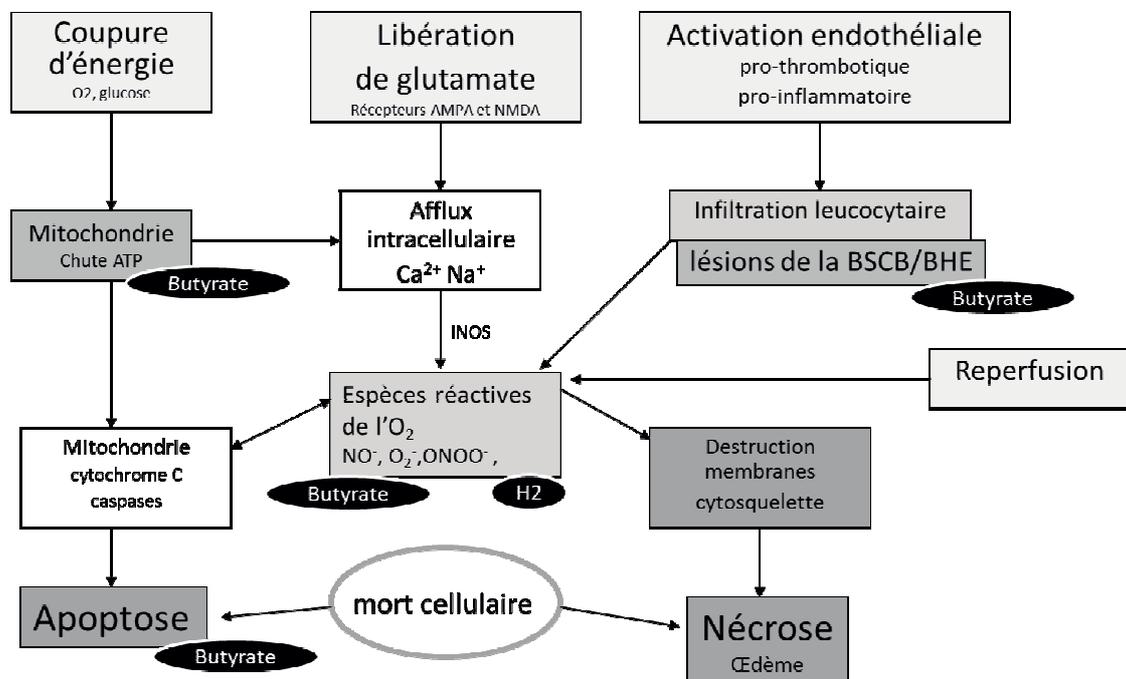


Figure 15 : Conséquences de l'ischémie focale du système nerveux central. Cibles d'action potentielles de l'H₂ et du butyrate. (BSCB: blood-spinal cord barrier; BHE: barrière hémato-encéphalique).

une partie de l'oxygène (O_2) atteignant le côlon est consommée par les bactéries aérobies coliques, réduisant ainsi le contenu intraluminal en O_2 dans le côlon et maintenant l'anaérobiose. L' H_2 , ainsi que le CO_2 , sont consommés en grandes quantités. Les bactéries acétogènes, méthanogènes et sulfato-réductrices sont en compétition vis-à-vis de l' H_2 (Strocchi et coll. 1994). Concernant le méthane (CH_4), la population mondiale peut être divisée en méthano-producteurs et en non méthano-producteurs. Le méthane est produit par des bactéries spéciales (*Méthanobrevibacter smithii*) à partir d'hydrogène et de dioxyde de carbone. Bien que *M. smithii* soit naturellement présent dans le microbiote intestinal de nombreux mammifères, il n'est habituellement pas présent chez les rats Sprague-Dawley, souche de rats que nous avons utilisés pour nos études animales (Maczulak et coll. 1989). La production de méthane chez l'homme peut être assez importante. Certaines personnes produisent jusqu'à trois litres par jour (Weaver et coll. 1986). En revanche, l'hydrogène n'est pas métabolisé par les tissus des mammifères (Kayar et coll. 1994). Une fraction des gaz produits par les bactéries coliques diffuse dans le sang et est excrétée dans la respiration où elle peut être détectée par chromatographie en phase gazeuse (Strocchi & Levitt 1998). Ce phénomène constitue la base des tests respiratoires à l' H_2 et au méthane (CH_4) (Figure 3). Chez les producteurs de méthane, les valeurs de l'hydrogène expiré à jeun d'une part, et l'excrétion d'hydrogène par voie respiratoire après ingestion de lactulose, évaluée par l'aire sous la courbe d'autre part, sont plus basses que chez les non producteurs de méthane (Cloarec et coll. 1990a). La mesure de l'hydrogène dans l'air expiré sous-estime donc vraisemblablement la fermentation intestinale chez les méthano-producteurs. La prise en compte de la production de méthane serait donc utile afin de ne pas sous-estimer la fermentation par la seule mesure de l'hydrogène dans l'air expiré (Bjørneklett & Jenssen 1982, Rumessen et coll. 1994, Kajs et coll. 1997, Vernia et coll. 2003, de Lacy Costello et coll. 2013). Les gaz restants sont éliminés par voie rectale. La composition des gaz intraluminaux varie beaucoup tout au long de l'intestin, et la composition des gaz évacués par voie rectale traduit l'équilibre entre les multiples processus se déroulant à l'intérieur de la lumière intestinale.

1.2 Augmentation de la charge en gaz diluants

1.2.1 Démonstration chez le rat

Pour cette démonstration, nous reprenons les valeurs médianes des mesures que nous avons réalisées chez le rat (de Maistre et coll. 2016a).

En première approximation, on suppose que la solubilité moyenne de N_2 dans les différents tissus d'un rat est de $0,015 \text{ ml } N_2 \cdot \text{ml}^{-1} \text{ tissu} \cdot \text{ATA}^{-1}$ (Weathersby & Homer 1980). Nous considérons par ailleurs que la production d' H_2 par les bactéries du microbiote intestinal persiste en ambiance hyperbare au même niveau qu'à la pression atmosphérique. Nous faisons également l'hypothèse que tout l'hydrogène produit au niveau de l'intestin s'accumule dans l'organisme durant l'exposition hyperbare.

Un rat avec une masse corporelle de 360 g et une température corporelle centrale de 38°C , respirant de l'air (79% N_2) à 10 ATA de pression absolue (7,9 ATA de pression partielle d'azote) contiendra 42,7 ml de N_2 à saturation. On suppose que les rats sont à saturation pour type de plongée expérimentale que nous réalisons. Durant cette plongée de 100 min, un rat chez lequel on retrouve 118 ppm d' H_2 dans l'air expiré avec une ventilation minute de $225 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ accumulera 2,7 ml de H_2 .

En admettant que nos hypothèses sont valides, cette quantité d' H_2 représente un surplus de charge en gaz diluants d'environ 6%. Cela revient approximativement à majorer la profondeur de plongée de 6%. Nous avons observé de façon concomitante une multiplication par 2 de la survenue des accidents de désaturation chez le rat (de Maistre et coll. 2016a). Inversement, Kayar et coll. avaient mis en évidence une diminution de 50% de la survenue des accidents de désaturation chez le rat en diminuant de 5% la charge en hydrogène (Kayar et coll. 1998).

1.2.2 Démonstration chez l'homme

Dans une étude ancienne, la production intestinale d'hydrogène a été mesurée de manière directe chez l'homme en utilisant un tube de polyvinyle à tripe lumière (Levitt & Ingelfinger 1968). La production d'hydrogène dans le colon était inférieure à $0,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ chez les sujets qui avaient jeuné depuis au moins 24 heures. Après injection de lactose dans l'intestin grêle, la production d'hydrogène colique s'élevait jusqu'à un pic moyen $1,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. La quantité maximale d'hydrogène produite parmi tous les sujets sur une période d'une heure était approximativement de 140 ml. L'hydrogène et le méthane sont exclusivement produits par la fermentation intestinale, les cellules de mammifères n'étant pas capables de produire ces gaz. Ainsi, la quantité d'hydrogène et de méthane produite dans l'intestin peut être estimée en faisant la somme de leur évacuation anale et de leur quantité dans l'air expiré. Une étude relativement ancienne (Steggerda 1968) a mesuré l'évacuation des gaz anale des gaz après la consommation de différents types d'aliments et a retrouvé les valeurs suivantes : 15 ml par heure pour un régime pauvre en fibre, 93 ml par heure pour un régime normal, 140 ml par heure après la consommation de choux de Bruxelles et 176 ml par heure après la

consommation de porc et de haricots. Une étude plus récente a mesurée l'évacuation anale de gaz sur une période de 24 heures et a montré qu'un régime normal contenant 200 g de haricots secs conduisait à l'évacuation de 705 ml de gaz, la moitié étant de l'hydrogène, alors qu'un régime sans fibre s'accompagnait de l'évacuation de 214 ml de gaz dont très peu d'hydrogène (Tomlin & Lowis 1991). Si sa production est inférieure à 76 ml/6h, l'hydrogène endogène est totalement absorbé (Hammer 1993). Lorsque le volume total des flatulences augmente, l'efficacité de l'absorption d'hydrogène colique décroît de 90% à 20%. Dans une autre étude, les volumes d'hydrogène expirés étaient de 85ml.jour⁻¹ pour un régime normal et de 35 ml.jour⁻¹ à jeun (Tadesse et coll. 1980). Ces valeurs sont à confronter avec la charge en azote théoriquement accumulée par des sujets maigres durant une plongée standard à l'air au sec (40 min à 21 m avec des vitesses de compression/décompression de 15 m/min⁻¹ et un palier de 5 min à 3 m), comprise entre 180 et 258 ml selon le modèle choisi (Schellart et coll. 2013).

2 Effet bénéfique à long terme de la fermentation en dehors de la plongée

2.1 Mécanismes de la mort cellulaire après ischémie du système nerveux central

Le tissu nerveux est très sensible à la diminution d'apport en O₂ et en glucose en raison d'une consommation énergétique élevée avec un métabolisme du glucose quasi exclusivement aérobie et l'absence de réserves in situ (Figure 15). Les mécanismes conduisant à la mort cellulaire (Dirnagl et coll. 1999, Deb et coll. 2010, Hossmann 2009, Moskowitz et coll. 2010) (Fig. 3) impliquent l'ensemble de l'unité neurovasculaire (neurone, astrocyte, cellule endothéliale, péricyte, membrane basale et matrice extracellulaire), les cellules musculaires lisses artériolaires, les oligodendrocytes et la microglie. L'immunité périphérique (Dirnagl 2012, Moskowitz et coll. 2010, Xing et coll. 2012, Mergenthaler et coll. 2004, Zhang et coll. 2012) joue également un rôle important en aggravant le pronostic via des infections systémiques sévères. Selon la sévérité et la durée de l'ischémie du système nerveux central, il existe une succession de dysfonctionnements correspondant à la pénombre « métabolique » puis à l'infarctus (Hossmann 2009) (Fig. 4).

2.1.1 Glutamate et excitotoxicité

L'ischémie du système nerveux central induit rapidement la libération de neurotransmetteurs inhibiteurs (acide γ -amino-butérique (GABA)) et excitateurs (glutamate), avec un dysfonctionnement de leur recapture.

L'exocytose synaptique de glutamate est liée entre autres à la surexpression de la protéine neuronale synaptique SNAP25 (*synaptosomal-associated protein 25*) et à la libération

astrocytaire dépendante du Ca^{2+} (complexe SNARE (*soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*)). Il existe également des perturbations du stockage astrocytaire du glutamate (protéines vacuolaires H^+ ATPase (V-ATPase), transporteurs vésiculaires (VGLUT)) (Deb et coll. 2010). Le glutamate, via ses récepteurs AMPA, kaïnate puis NMDA, va induire un afflux intracellulaire de Ca^{2+} et de Na^+ amplifié par l'activation de ses récepteurs métabotropiques, entraînant un stress du RE via la voie de transduction protéine G – phospholipase C – inositol triphosphate. L'excès de glutamate extracellulaire, couplé au K^+ , va également participer à la propagation de la dépolarisation péri-infarctus.

Bien que moins étudiée, l'altération de la neurotransmission inhibitrice GABA jouerait aussi un rôle non négligeable lors de l'ischémie du système nerveux central : gradient Cl^- , augmentation Ca^{2+} intracellulaire, espèces réactives de l'oxygène (Schwartz-Bloom & Sah 2001), etc.

2.1.2 Augmentation et toxicité du calcium intracellulaire

Le calcium pénètre dans le neurone par des canaux voltage-dépendants et des canaux-récepteurs au glutamate (N-méthyl-D-aspartate (NMDA)). Le maintien du gradient intra/extracellulaire du Ca^{2+} (1/10 000) est coûteux en énergie :

- stockage dans les protéines cytoplasmiques, le réticulum endoplasmique (RE), les mitochondries ;
- échanges via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et la pompe Ca^{2+} -ATPase.

Lors de l'ischémie du système nerveux central, la déplétion énergétique induit une défaillance de ces systèmes et l'augmentation du Ca^{2+} intracytoplasmique (Cross et coll. 2010) est amplifiée par l'excès de glutamate extracellulaire. L'augmentation du Ca^{2+} initie une cascade d'effets délétères : dysfonctionnement mitochondrial (dépolarisation, déficit énergétique, synthèse d'espèces réactives de l'oxygène) et dysfonctionnement du RE (inhibition de la synthèse protéique), activations enzymatiques (oxyde d'azote (NO) synthase neuronale (nNOS I), endonucléases, phospholipases, kinases, protéases).

2.1.3 Dépolarisation péri-infarctus et « spreading depression »

Au cœur de l'infarctus, il existe une dépolarisation anoxique irréversible des cellules. En périphérie, l'augmentation extracellulaire du K^+ (via notamment le dysfonctionnement de la pompe Na^+/K^+ ATPase) et du glutamate entraînent une dépolarisation neuronale et gliale (dépolarisation péri-infarctus) se propageant lentement (2–9 mm/min) de proche en proche

dans le cortex : dépolarisation « envahissante » (ou « spreading depression »). Authentifiée chez l'homme (Dohmen et coll. 2008), elle est caractérisée par un arrêt des gradients ioniques, une perte d'activité électrique, un œdème neuronal et une modification des dendrites (Dreier 2011). Elle altère la membrane basale de la barrière hématoencéphalique (BHE) via l'activation de la métalloprotéase MMP9. Elle est suivie d'une ischémie « envahissante » se propageant dans la pénombre (Strong et coll. 2007) due entre autre au blocage de la NOS endothéliale (eNOS III).

2.1.4 Œdème cellulaire (« cytotoxique »)

L'œdème cellulaire est induit par la perte des gradients ioniques (entrée de Na^+/Cl^- via la pompe Na^+/K^+ ATP dépendante et les récepteurs AMPA) et l'accumulation de lactate dans la cellule suivies par l'entrée passive d'eau (augmentation de l'osmolarité intracellulaire). Il concerne l'ensemble des cellules (neurone, cellules gliales, endothéliales, etc.) et conduit rapidement à la nécrose. L'augmentation de volume des cellules endothéliales et astrocytes va aussi aggraver l'hypoperfusion locale par compression microvasculaire. L'œdème apparaît dès les premières minutes de l'ischémie du système nerveux central et correspond à l'infarctus avec une extension limitée dans la pénombre. L'IRM de diffusion permet une bonne visualisation de l'étendue de cet œdème (chute du coefficient apparent de diffusion par restriction du volume extracellulaire) corrélée à la sévérité de la lésion finale (Rosso et coll. 2009, Baird et coll. 2001).

2.1.5 Perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE) et œdème vasogénique

La BHE capillaire est constituée d'une cellule endothéliale, de la membrane basale, de pieds astrocytaires et de péricytes contractiles. Dès la première heure de l'ischémie du système nerveux central, il existe une augmentation de sa perméabilité se prolongeant sur plusieurs semaines (Strbian et coll. 2008). Celle-ci est induite par le dysfonctionnement de la cellule endothéliale (altération des récepteurs à l'endothéline, activité la pompe Na^+/K^+ ATPase due à l'excès de K^+ extracellulaire, synthèse de NO vasodilatateur) (Huang et coll. 2013) et par la destruction de la membrane basale (MMP2 et MMP9 surexprimées 1 à 3 h après l'ischémie du système nerveux central). Par gradient osmotique, un œdème tissulaire apparaît et se complique, entre 12 heures et deux jours post-ischémie du système nerveux central, par l'extravasation de protéines (albumine) conduisant à un œdème vasogénique. L'hypertension intracrânienne peut alors aggraver l'hypoperfusion et conduire à des lésions à distance par compression.

De plus, l'augmentation de la perméabilité de la BHE joue un rôle essentiel dans l'inflammation en favorisant l'infiltration leucocytaire aggravant encore la lésion de la BHE via l'expression de MMP9.

2.1.6 Stress oxydant : NO et espèces réactives de l'oxygène

Le stress oxydant provient du fort potentiel oxydant cellulaire des espèces réactives de l'oxygène en excès, ou des radicaux libres. La majeure partie du radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) produite est générée dans les mitochondries par une fuite d'électrons de la chaîne de transport d'électrons et le cycle de Krebs. $O_2^{\cdot-}$ est également produit par les oxydases métaboliques, y compris la NADPH-oxydase et la xanthine oxydase (Figure 16). La superoxyde dismutase convertit $O_2^{\cdot-}$ en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est détoxifié en H_2O par la glutathion peroxydase ou par la catalase. L'excès d'anion superoxyde réduit les ions métalliques de transition tels que Fe^{3+} et Cu^{2+} , les formes réduites pouvant à leur tour réagir avec H_2O_2 pour produire des radicaux hydroxyle (OH^{\cdot}) par la réaction de Fenton. OH^{\cdot} est la plus forte des espèces oxydantes et réagit indifféremment avec des acides nucléiques, des lipides et des protéines. Il n'y a pas de système de détoxification connu pour OH^{\cdot} ; par conséquent, la capture des OH^{\cdot} est un processus antioxydant essentiel (Figure 17).

L'ischémie du système nerveux central, en particulier en cas de reperfusion, conduit à l'activation de nombreux systèmes enzymatiques producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, etc.) avec des systèmes « antioxydants » protecteurs (α -tocophérols, vitamine C) trop lents (Moskowitz et coll. 2010). L'augmentation du Ca^{2+} cytoplasmique active la production d'ions superoxydes via notamment l'expression de la cyclo-oxygénase COX2 et l'activation des NADPH oxydases (NOX) par la protéine kinase C et le NO produit par la nNOS I. Le NO est produit également par la NOS inductible indépendante du Ca^{2+} (iNOS II) des neutrophiles, de la glie et des cellules endothéliales. Il va interagir avec l'anion superoxyde pour former du péroxynitrite.

Ces espèces réactives de l'oxygène interfèrent avec tous les composants cellulaires. De plus, ils entraînent la libération d'acides gras libres (notamment acide arachidonique) et des perturbations mitochondriales eux-mêmes sources d'espèces réactives de l'oxygène. Ils conduisent aussi à un stress du RE, une activation des poly-ADP ribose polymérase (PARP), une fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), et une constriction des péricytes (Yemisci et coll. 2009).

En parallèle, le NO a également des effets bénéfiques durant l'ischémie du système nerveux central. En effet, au niveau de la cellule endothéliale, la eNOS III génère du NO

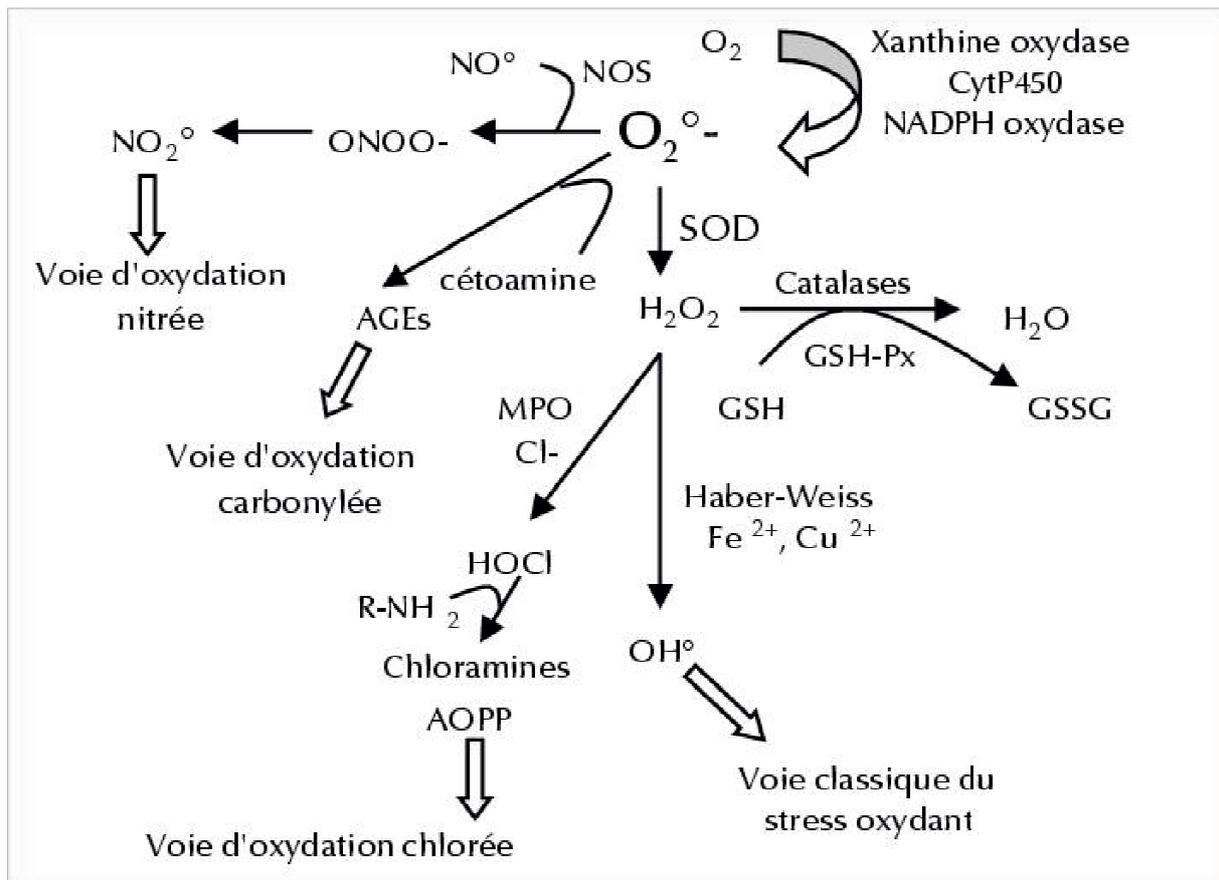


Figure 16 : Voies métaboliques oxydatives : 1) voie classique dans laquelle l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) est dismuté par la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), celui-ci étant détoxifié par les catalases ou la glutathion peroxydase (GSH-Px). En présence de traces de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{2+}), H_2O_2 est transformé en radical hydroxyl (OH°) délétère vis-à-vis des lipides, des protéines et des acides nucléiques ; 2) voie d'oxydation chlorée mettant en jeu la myéloperoxydase (MPO) qui, à partir de H_2O_2 et en présence de chlorures, génère de l'acide hypochloreux (HOCl), puissant oxydant des protéines et à l'origine de la formation des produits d'oxydation avancée des protéines AOPP ; 3) voie d'oxydation carbonylée conduisant à la formation des produits de glyco-oxydation des protéines, AGE ; 4) voie d'oxydation nitrée dans laquelle les peroxynitrites ($ONOO^-$) conduisent à la formation de nitrotyrosine.

vasodilatateur, antiagrégant, fibrinolytique et pouvant moduler la dépolarisation péri-infarctus (Petzold et coll. 2008).

2.1.7 Glycolyse et acidose

Le glucose est la source d'énergie quasi exclusive du système nerveux central (Mergenthaler et coll. 2013). Une hyperglycémie spontanée survient dans 30 à 40 % des cas lors de l'ischémie du système nerveux central et est associée à un mauvais pronostic (Luitse et coll. 2012, Won et coll. 2011). La consommation de glucose augmente avec un découplage métabolique (consommations glucose/O₂) reflétant la mise en place d'une glycolyse anaérobie (Fig. 4). Ensuite, la consommation de glucose va diminuer (en dessous de 25 ml/100 g/min de DSC) avec l'accumulation d'acide lactique et la baisse du pH intracellulaire qui active les canaux calciques acidosensibles majorant l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule. L'acidose induit également un stress du RE et l'apoptose des astrocytes en périphérie de l'infarctus (activation de la caspase 12).

À l'inverse, l'acidose pourrait avoir un rôle protecteur par le blocage des récepteurs NMDA (effet antiexcitotoxique) et par un effet antiapoptotique (Fan et coll. 2014).

2.1.8 Oligodendrocytes et substance blanche

La glie a un rôle central lors de l'ischémie du système nerveux central, notamment les astrocytes (Takano et coll. 2009). Les oligodendrocytes, produisant la gaine de myéline (substance blanche) nourricière des axones, jouent également un rôle non négligeable (Xing et coll. 2012). Le DSC normal est plus faible dans la substance blanche que dans la substance grise (Fig. 1). L'ischémie du système nerveux central conduit rapidement à un œdème de la substance blanche et active des protéases perturbant l'intégrité des axones. Les axones démyélinisés deviennent alors plus sensibles à l'ischémie du système nerveux central, notamment via la production d'espèces réactives de l'oxygène par les mitochondries axonales. De plus, avant la démyélinisation, les progéniteurs oligodendrocytaires peuvent majorer l'infiltration leucocytaire et produire de la MMP9 lésant la BHE (Seo et coll. 2013).

2.1.9 Inflammation du système nerveux central et immunodépression systémique

Les processus inflammatoires post-ischémie du système nerveux central sont ambivalents avec des conséquences délétères et bénéfiques. Ils concernent le tissu nerveux et l'immunité périphérique innée et adaptative (Dirnagl et coll. 1999, Iadecola & Anrather 2011) avec des interactions réciproques (Trakhtenberg & Goldberg 2011, Dirnagl & Schwab 2009).

Au niveau du tissu nerveux, la microglie (5 à 20 % des cellules gliales) correspond à des cellules résidentes impliquées dans la surveillance immunitaire et la plasticité (Hanisch & Kettenmann 2007). Dès les premières minutes de l'ischémie du système nerveux central, les cellules microgliales sont activées, via l'augmentation de l'ATP extracellulaire et la perte du contact neuronal, particulièrement au sein de la zone de pénombre, avec une prolifération pouvant durer plusieurs semaines. Elles assurent le nettoyage de la lésion par phagocytose des débris cellulaires. Il existe deux phénotypes de microglie activée : la microglie « inflammatoire » (M1) produisant des médiateurs inflammatoires (IL-1 β , facteur de nécrose tumorale α (TNF α), etc.), des espèces réactives de l'oxygène, des enzymes (cathepsine, MMP9, etc.), des prostanoïdes, et la microglie « anti-inflammatoire » (M2) produisant des cytokines anti-inflammatoires (facteur de croissance de transformation TGF β) et des facteurs neurotrophiques (dérivés de la glie (GDNF), du cerveau (BDNF), facteurs de croissance fibroblastique (FGF β), insuline-like (IGF1), de l'endothélium vasculaire (VEGF), etc.) (Xing et coll. 2012).

Les astrocytes jouent un rôle ambivalent avec la production de cytokines pro-inflammatoires, de MMP9, etc., mais également de facteurs protecteurs (VEGF, TGF β 1, érythropoïétine, etc.). Au niveau du neurone, l'ischémie du système nerveux central induit l'activation du complément et la synthèse de facteurs de transcription (facteur nucléaire (NF κ B), facteur inductible par hypoxie (HIF1), STAT3, etc.) de gènes pro-inflammatoires (facteur d'activation plaquettaire, TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1), etc.).

Sur la cellule endothéliale, des molécules d'adhésion (molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM1), vasculaire (VCAM1), P- et E-sélectines) sont exprimées, en plus des cytokines TNF α ou IL-1 β , permettant la migration et l'infiltration des polynucléaires neutrophiles (maximum à 2 à 3 jours post-ischémie du système nerveux central). Ceux-ci aggravent l'obstruction microvasculaire et produisent des protéases (MMP9, etc.), des molécules pro-inflammatoires et du NO cytotoxique (par iNOS II). Ils sont accompagnés par l'infiltration des mastocytes, des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques venant renforcer la production de cytokines et la phagocytose microgliale. Les macrophages périvasculaires peuvent présenter les mêmes phénotypes M1 et M2 que la microglie.

Le rôle des lymphocytes reste controversé (Iadecola & Anrather 2011) tout comme la chronologie de l'infiltration leucocytaire (Moller et coll. 2014). Bien que les lymphocytes T4 et T8 jouent un rôle délétère en infiltrant le tissu nerveux, les lymphocytes T-helpers ou T-régulateurs pourraient avoir une action d'immunomodulation et neurotrophique via la

production de IL-10 et TGF β 1. De plus, la rapidité des effets délétères des lymphocytes ne correspond pas à la mise en place plus lente (plusieurs jours) de l'immunité adaptative ciblant des antigènes cérébraux.

2.1.10 Nécrose et apoptose

La mort cellulaire par nécrose survient rapidement dans le cœur ischémique. Elle fait suite à l'œdème cellulaire et aux lésions membranaires conduisant à une désintégration de la cellule. Les débris nécrotiques, pro-inflammatoires, vont eux-mêmes avoir une cytotoxicité locale majorant la lésion.

La mort cellulaire programmée (apoptose) débute dans les heures suivant l'ischémie du système nerveux central (Fig. 5). Elle est la conséquence de processus nécessitant un apport énergétique et survient donc essentiellement dans la pénombre. L'ischémie du système nerveux central induit l'expression de gènes proapoptotiques (Trp53 ou p53, Bax, Bid, Bad, Bag, JNK, c-jun, cdk5, p38, etc.) et antiapoptotiques (Bcl2, Bcl-XL, Iap, etc.). Par une voie intrinsèque, les gènes Bad et Bax (modulés par Bcl2, Bcl-XL) vont permettre la libération du cytochrome C et du facteur d'induction d'apoptose (AIF) (Joza et coll. 2001) par la mitochondrie. Par une voie extrinsèque, le cytochrome C peut être libéré par la mitochondrie via la stimulation du récepteur Fas (CD95), exprimé sur les neurones et les cellules gliales, par le ligand FasL présent sur les neurones, la microglie, les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK (natural killers). L'interaction Fas-FasL entraîne, via le complexe de signalisation et d'induction de mort (DISC), l'activation de la caspase 8 et du facteur proapoptotique Bid. De plus, l'ischémie du système nerveux central induit l'expression du ligand inducteur d'apoptose liée au TNF (TRAIL) sur les astrocytes et la microglie. Le cytochrome C, le facteur activateur de la peptidase apoptotique (Apaf1) et la procaspase 9, en présence d'ATP, forment l'apoptosome qui va activer la caspase 9 puis la cascade des autres caspases proapoptotiques : caspase 1 impliquée dans l'inflammasome (avec IL-1, IL-6) et caspase 3 (activée par les caspases 8 et 9, inhibée par la protéine inhibitrice d'apoptose (IAP)) interférant avec les enzymes de réparation de l'ADN (PARP). L'apoptose conduit finalement à une condensation et une fragmentation de la cellule en corps apoptotiques phagocytés.

2.2 Voies d'action du microbiote intestinal sur le système nerveux central

Les facteurs bactériens du dialogue entre le microbiote intestinal et le cerveau peuvent être (i) des macromolécules de l'architecture cellulaire bactérienne, comme le lipopolysaccharide, le peptidoglycane, la flagelline ; (ii) des produits du catabolisme bactérien, tels que les acides

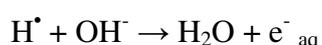
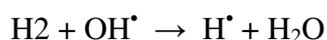
gras à chaîne courte, excrétés dans la lumière intestinale. Ces facteurs peuvent communiquer avec le cerveau par différentes voies, faisant intervenir les populations cellulaires de la muqueuse intestinale comme médiateurs (Figure 17) (Cryan & Dinan 2012) :

- Voie métabolique : absorption par les entérocytes (voie transcellulaire) ou les jonctions intercellulaires (voie paracellulaire), excrétion dans la circulation sanguine, puis passage de la barrière hémato-encéphalique ;
- Voie nerveuse : stimulation des neurones du système nerveux entérique et de la composante parasympathique du système nerveux autonome, qui projettent sur des aires intégratives cérébrales ;
- Voie immunitaire : stimulation des cellules immunitaires intestinales et modification de l'équilibre des cytokines pro- et anti-inflammatoires, connu pour affecter le fonctionnement du cerveau ;
- Voie endocrine : stimulation de la production de neuropeptides par les cellules entéro-endocrines.

Nous pensons que l'hydrogène et le butyrate sont deux métabolites bactériens qui peuvent jouer un rôle bénéfique dans le cadre d'un ADD neurologique.

2.3 Effets bénéfiques de la production endogène d'hydrogène

Nous avons évoqué que la production endogène d'hydrogène par fermentation bactérienne, en dehors de la plongée, pourrait avoir un effet bénéfique vis-à-vis de l'ADD (de Maistre et coll. 2016c). Il semble, en effet, que l'administration intra péritonéale de sérum physiologique enrichi en hydrogène durant les 24 heures précédant une plongée accidentogène a un effet préventif sur l'ADD chez le rat (Ni et coll. 2011). Récemment, il a été montré que des plongées profondes successives chez l'homme altéraient la fonction endothéliale et induisaient un stress oxydant (Obad et coll. 2010). Des auteurs ont mis en évidence que l'hydrogène agit comme un antioxydant en réduisant sélectivement le radical hydroxyle (OH^\bullet), la plus cytotoxique des espèces réactives de l'oxygène (Matheson & Rabani 1965, Bensalem et coll. 2002, Ohsawa et coll. 2007).



OH^\bullet est donc éliminé avec l'avantage qu'aucune autre espèce moléculaire n'est formée (Figure 15). En outre e^-_{aq} , électron hydraté, est un réducteur, qui peut neutraliser certains éléments de la chaîne oxydative. En revanche, l'hydrogène ne réagit pas avec les autres

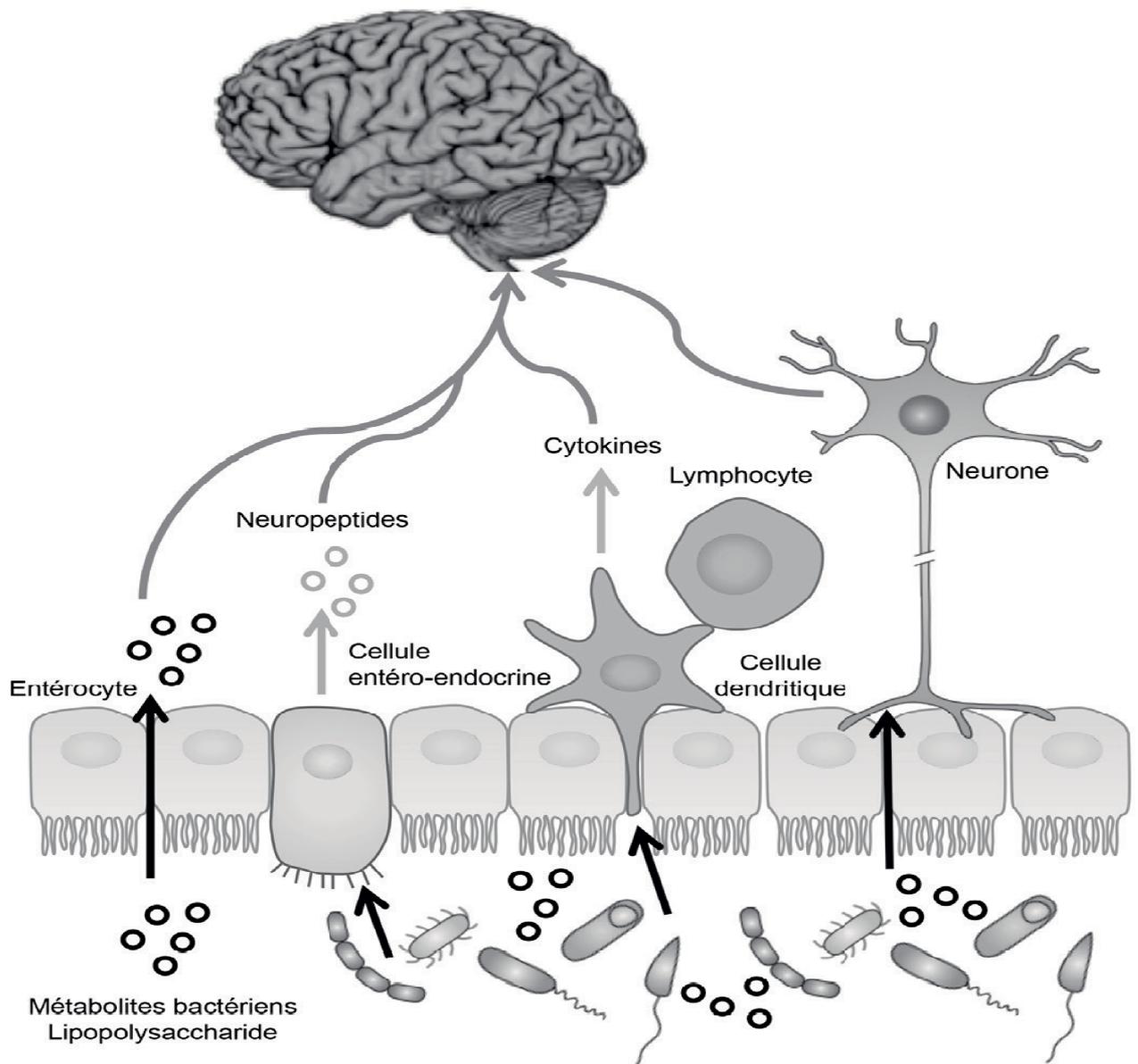


Figure 17 : Voies de communication possibles entre le microbiote intestinal et le cerveau.

Les produits bactériens actifs peuvent être des métabolites ou des macromolécules de l'architecture cellulaire (ex : lipopolysaccharide). Ils peuvent gagner le cerveau par voie sanguine, après absorption par l'épithélium intestinal ; stimuler la sécrétion de neuropeptides par les cellules entéro-endocrines ; stimuler les cellules immunitaires intestinales et la production de cytokines ; stimuler des neurones du système nerveux entérique et de la composante parasympathique du système nerveux autonome. (d'après Rabot 2015)

espèces réactives de l'oxygène qui possèdent des rôles physiologiques (Ohsawa et coll. 2007). En dépit de leurs effets cytotoxiques, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) jouent en effet des rôles physiologiques importants à faibles concentrations ; ils agissent comme des molécules de signalisation qui sont impliquées dans de nombreuses cascades de transduction du signal et régulent également les processus biologiques tels que l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire. L'oxyde nitrique (NO^{\bullet}), une autre espèce réactive de l'oxygène, fonctionne comme un neurotransmetteur et est essentiel pour la dilatation des vaisseaux sanguins. Il est probable que l'action de l'hydrogène est suffisamment modérée pour ne pas perturber les réactions métaboliques d'oxydo-réduction ou pour ne pas éliminer les espèces réactives de l'oxygène impliquées dans la signalisation cellulaire, contrairement à certains suppléments antioxydants avec une forte activité réductrice. Ohsawa a également démontré que l'inhalation d' H_2 gazeux limitait les lésions cérébrales induites par une ischémie/reperfusion focale chez le rat, en neutralisant les effets du stress oxydant (Ohsawa et coll. 2007). Le mécanisme d'action de l'hydrogène fait intervenir des processus anti-inflammatoires et anti-apoptotiques (Ji et coll. 2011, Wei et coll. 2015). L'hydrogène pourrait également limiter la rupture de la barrière hémato-encéphalique par réduction des espèces réactives de l'oxygène et suppression de l'activité de la métalloprotéase MMP9 (Takeuchi et coll. 2015). D'autres auteurs ont montré un rôle bénéfique de l'inhalation d' H_2 sur les lésions médullaires d'ischémie-reperfusion chez le lapin (Huang et coll. 2010). Enfin, la production endogène d'hydrogène, par fermentation après ingestion de lactulose, a des effets neuroprotecteurs vis-à-vis des lésions cérébrales d'ischémie-reperfusion chez le rat (Zhai et coll. 2013). Il pourrait en être de même en ce qui concerne l'ADD.

2.4 Effets bénéfiques du butyrate sur le système nerveux central

Cependant, les gaz intestinaux ne sont pas les seuls métabolites provenant de la fermentation bactérienne d'hydrates de carbones indigestibles. Des analyses quantitatives des produits de fermentation du lactulose, in vitro, ont montré que les principaux métabolites non-gazeux étaient les acides acétiques, lactiques et butyriques (Sahota et coll. 1982). Des bactéries, telles que celles des genres *Clostridium*, *Eubacterium*, et *Butyrivibrio*, sont capables de produire du butyrate dans la lumière intestinale à des niveaux de l'ordre du $mmol.l^{-1}$ (Pryde et coll. 2002, Barcenilla et coll. 2000).

Une grande partie du butyrate produit dans le côlon est utilisé comme source d'énergie par les colonocytes, mais du butyrate peut également quitter le colon par la veine porte, où le foie en absorbe une autre grande partie (Bourassa et coll. 2016). Cependant, le côlon distal n'est pas

relié à la veine porte, ce qui permet à une certaine quantité de butyrate de rejoindre directement la circulation systémique. En effet, il existe de nombreux rapports de régimes alimentaires riches en fibres augmentant les niveaux sanguins de butyrate circulant (Bourassa et coll. 2016). En plus d'être produit par fermentation bactérienne, le butyrate peut également être produit à des concentrations beaucoup plus faibles par les cellules de mammifères par l'oxydation des acides gras et le métabolisme du glucose (Pouteau et coll. 2003, Wolever et coll. 1997). Or, le butyrate, un acide gras à chaîne courte, est connu pour son effet neuroprotecteur. Pharmacologiquement, le butyrate a un effet profondément bénéfique sur les maladies du cerveau allant des maladies neurodégénératives à des troubles psychiques (Figure 18).

2.4.1 Inhibiteur de l'histone déacétylase

L'acétylation des histones est une modification post-traductionnelle de protéines épigénétiques, qui sont des protéines qui se lient à la chromatine et modifie sa structure de façon à changer la propension d'un gène à être transcrit ou réprimé. Les histones acétylées provoquent un desserrement de la structure de la chromatine en affaiblissant l'attraction électrostatique entre les histones et le squelette de l'ADN. Ce procédé permet aux facteurs de transcription et la machinerie de transcription de base de se lier et augmente la transcription. Les groupes acétyle sont ajoutés aux résidus de résidus de L-lysine à l'extrémité N-terminale par des histones acétyltransférases (HAT) et éliminées par des histones désacétylases (HDAC).

Le butyrate est un inhibiteur bien connu des HDAC qui entraîne une augmentation de l'acétylation des histones lorsqu'il est appliqué à des cellules en culture. Comme les inhibiteurs de l'HDAC influencent la transcription de nombreux gènes, il semble peu probable qu'un seul gène soit responsable des effets neurotrophiques du butyrate. Cependant, de nombreuses études ont montré qu'au moins certains de ces effets bénéfiques peuvent être attribués à la capacité du butyrate à augmenter l'acétylation autour des promoteurs des facteurs neurotrophiques tels que le BDNF, GDNF et NGF et augmentant ainsi leur transcription (Bourassa et coll. 2016). D'autres études ont démontré l'importance des gènes précoces immédiats, comprenant c-Fos et Homer1a, qui sont des gènes dépendant de l'activité impliqués dans la plasticité (Bourassa et coll. 2016). Sur la base de ces données, le butyrate est capable de réguler de manière positive un ensemble de gènes qui favorisent la survie, la plasticité et la régénération.

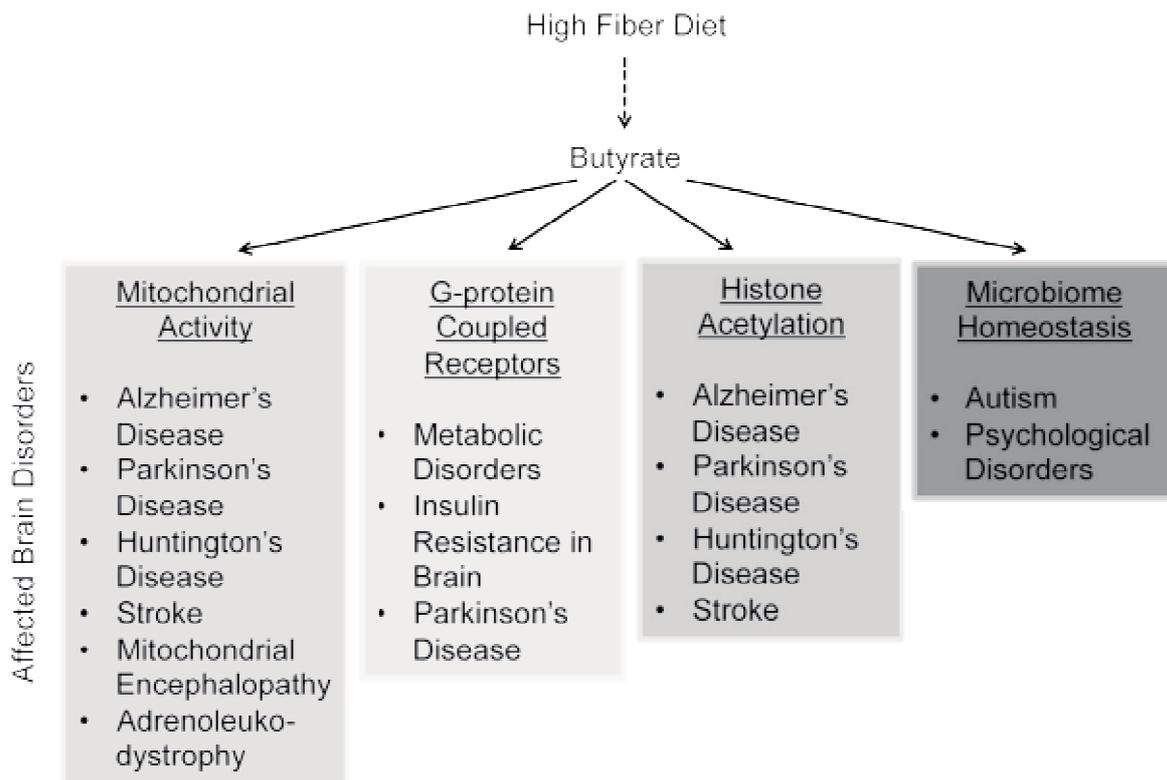


Figure 18 : Mécanismes proposés pour expliquer les effets neuroprotecteurs de butyrate et maladies pouvant bénéficier d'un traitement par butyrate ou d'une alimentation riche en fibres. (d'après Bourassa et coll. 2016)

Comme inhibiteur de l'histone déacétylase, le butyrate a été en mesure de réduire la taille de l'infarctus dans des modèles d'accident vasculaire cérébral ischémique, limitant les lésions cérébrales et améliorant les résultats comportementaux (Langley et coll. 2008, Kim & Chuang 2014). Le butyrate a des propriétés anti oxydantes (Sun et coll. 2015), anti inflammatoires et anti apoptotiques (Kim & Chuang 2014, Sun et coll. 2015, Sun et coll. 2016). L'activation de la microglie et des monocytes induite par l'oblitération permanente de l'artère cérébrale moyenne, à l'origine de lésions de la substance blanche, est inhibée par le butyrate (Kim & Chuang 2014). La voie de signalisation de la survie cellulaire faisant intervenir la phospho-kinase B et le BDNF est impliquée dans l'effet anti-apoptotique (Sun et coll. 2015). Par ailleurs, le butyrate semble en mesure de favoriser le rétablissement de la barrière hémato-encéphalique par l'augmentation de l'expression de protéines de jonctions serrées (occludin et zonula occludens-1) (Li et coll. 2016a). Une étude récente a démontré que des souris axéniques ont augmenté la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE), en comparaison avec des souris spécifiques exemptes d'agents pathogènes possédant un microbiote équilibré (Braniste et coll. 2014). L'augmentation de la perméabilité était associée à une diminution des taux de protéines de jonction serrée, claudin 5 et occludin dans le cortex frontal, l'hippocampe et le striatum. La colonisation des souris axéniques avec des bactéries productrices de butyrate, *Clostridium tyrobutyricum*, ou un gavage oral (durant 3 jours) par butyrate de sodium (NaB) a restauré la perméabilité de la BHE aux niveaux des souris exemptes d'agents pathogènes, tout en augmentant simultanément l'acétylation des histones cérébrales et l'expression de l'occludin et de la claudine 5 (Figure 15).

Il convient également de noter que les effets des inhibiteurs de l'HDAC ne sont pas limités aux seules histones. En fait, une liste croissante de plus de 1700 protéines peut être acétylée sur leurs résidus de lysine, et les inhibiteurs de l'HDAC bloquent leur déacétylation ainsi (Bourassa et coll. 2016). Ainsi, l'effet des inhibiteurs de l'HDAC sur les protéines non-histones ne doit pas être négligé. L'acétylation joue un rôle important qui influe sur l'activité enzymatique et métabolique de nombreuses protéines.

2.4.2 Métabolisme énergétique et activité mitochondriale

Bien que les processus métaboliques dans le côlon puissent apparaître déconnectés de ceux du système nerveux central, il est important de prendre en considération les besoins énergétiques immenses du système nerveux central et de la dyshoméostasie énergétique qui survient à l'occasion d'un ADD neurologique.

Le butyrate joue deux rôles majeurs dans le métabolisme et l'activité mitochondriale (Figure 15). Tout d'abord, le butyrate a une incidence directe sur le métabolisme énergétique, en agissant comme un substrat pour la bêta-oxydation mitochondriale. Ensuite, le butyrate peut réguler à la hausse les gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale (par exemple PGC1 α) – stimulant ainsi la respiration mitochondriale – par l'intermédiaire de son effet inhibiteur sélectif de l'HDAC, et par l'intermédiaire de sa capacité à affecter l'acétylation d'un grand nombre de protéines métaboliques (Bourassa et coll. 2016). Ce dernier effet du butyrate et d'autres inhibiteurs de l'HDAC sur le métabolisme a été mis en lumière par les études démontrant que presque toutes les enzymes impliquées dans la glycolyse, la néoglucogénèse, le cycle de Krebs, le métabolisme des acides gras et le métabolisme du glycogène sont acétylées (Zhao et coll. 2010).

2.4.3 Activateur de récepteur couplé aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont la famille la plus grande et la plus variée de protéines transmembranaires. Ils sont composés de 7 hélices α transmembranaires, qui réceptionnent des signaux extracellulaires, tels que les composés sensibles à la lumière, les hormones, les facteurs de croissance et les neurotransmetteurs, et qui activent des voies de signalisation à l'intérieur de la cellule, principalement les voies de signalisation de l'AMPC et du phosphatidylinositol (Vassart & Costagliola 2011). Compte tenu de leur rôle dans la détection de signaux extracellulaires, les GPCR sont essentiels pour un certain nombre de fonctions physiologiques, comprenant la régulation du système immunitaire, la régulation du système nerveux autonome, la fonction sensorielle (goût et odeur), et le maintien de l'homéostasie énergétique.

Le butyrate est la plupart du temps activateur des GPCR. Or nous n'avons pas retrouvé d'étude dans laquelle l'activation des GPCR pouvait présenter un intérêt en cas d'ischémie cérébrale. En revanche, l'inhibition du récepteur 81 couplé à la protéine G par le β -hydroxybutyrate réduit significativement la mort cellulaire et les lésions cérébrales après une occlusion expérimentale de l'artère cérébrale moyenne chez la souris (Shen et coll. 2015). Toutefois, bien que structurellement similaire au butyrate, le β -hydroxybutyrate est un corps cétonique, qui est produit dans des conditions de jeûne et de cétose, mais pas par la fermentation bactérienne. Si le butyrate présente un effet bénéfique dans l'ADD, il est peu probable qu'il passe par la voie des récepteurs couplés aux protéines G.

CONCLUSION

Chez des rats recevant une alimentation standard, il peut exister au cours de plongées expérimentales une fermentation intestinale suffisante pour accroître le risque d'ADD. De même chez l'homme, la fermentation intestinale lors de la plongée semble être plus importante chez les plongeurs accidentés. L'hydrogène produit au cours de la fermentation et diffusant dans tout l'organisme pourrait contribuer à majorer le risque d'ADD.

Nous n'avons pas trouvé de facteurs évidents pouvant expliquer la plus grande fermentation chez les plongeurs accidentés. Elle pourrait être liée à la nature de la prise alimentaire la veille de la plongée, à des pathologies intestinales asymptomatiques (malabsorption des sucres, syndrome du grêle court, pullulation microbienne intestinale, syndrome de l'intestin irritable), ou encore à la prise de certains médicaments (antibiotiques, laxatifs, prokinétiques, etc.).

La prévention des accidents de désaturation pourrait passer par une exclusion des plongeurs présentant une fermentation importante le jour de la plongée, une élimination des gaz produits au niveau de l'intestin, une modification de l'alimentation dans les 24 heures précédant une plongée, voire une modification du microbiote intestinal visant à limiter la fermentation en plongée.

Toutefois, nous avons montré qu'une stimulation chronique de la fermentation par l'accélération du transit intestinal, en dehors des phases de plongée, peut diminuer le risque d'ADD chez le rat. Nos résultats sont en faveur d'un effet dual de la fermentation intestinale sur la décompression. Délétère à court terme lors de la plongée, la fermentation intestinale prolongée pourrait être favorable en dehors de la plongée en prévenant la survenue et la sévérité d'un ADD.

Tous les facteurs susceptibles de modifier le microbiote intestinal et d'augmenter la fermentation, en dehors de la plongée, pourraient être testés en prévention de l'ADD. L'hydrogène, molécule aux propriétés antioxydantes, et le butyrate, un acide gras à chaîne courte, sont deux produits de la fermentation des hydrates de carbone qui ont des vertus neuroprotectrices. Ils pourraient jouer un rôle bénéfique dans le cadre du traitement de l'ADD.

PERSPECTIVES

Les résultats de nos études sont en faveur d'un rôle défavorable de la fermentation en plongée dans la survenue d'un ADD. Il semble donc légitime d'étudier les pistes pour limiter la fermentation en plongée, dans le cadre d'une démarche de prévention du risque.

1 Limitation de la fermentation en plongée

Une première approche serait d'identifier et d'exclure les plongeurs présentant une fermentation élevée avant plongée (Tableau I). Toutefois, nous avons mis en évidence qu'un interrogatoire bien conduit n'était pas suffisant pour dépister les plongeurs présentant une fermentation élevée. En effet, des pathologies intestinales, méconnues du plongeur car paucisymptomatiques, peuvent être à l'origine d'une fermentation importante. Par ailleurs, on ne connaît pas l'action de tous les médicaments sur la fermentation, et le temps nécessaire à la récupération du métabolisme du microbiote intestinal. Un intervalle de 4 semaines a été suggéré après l'administration de laxatifs ou d'antibiotiques (Gasbarrini et coll. 2009). La mesure de l'hydrogène dans l'air expiré juste avant la plongée pourrait être une méthode plus sûre d'estimation de la fermentation au cours de la plongée à venir. La valeur seuil d'hydrogène dans l'air expiré, déterminée par analyse ROC, significativement associée à la survenue d'un ADD est, d'après nos résultats, de 16,5 ppm. On pourrait utiliser cette valeur pour exclure les plongeurs présentant une fermentation élevée avant plongée. Toutefois, étant donné la faible incidence des accidents de désaturation, il faudrait étendre cette démarche à l'ensemble des clubs de plongée en France pour espérer diminuer la survenue des accidents de désaturation.

Une deuxième approche serait de donner des molécules per voie orale favorisant l'élimination des gaz in situ dans l'intestin. Nous pensons en effet que les gaz produits lors de la fermentation, et plus particulièrement l'hydrogène, sont en mesure de favoriser un ADD. Cependant, les molécules théoriquement utilisables, charbon actif et siméthicone, n'ont pas fait la preuve de leur efficacité pour réduire la libération d'hydrogène produit par le microbiote intestinal (Friis et coll. 1991, Potter et coll. 1985).

Enfin, on pourrait limiter la fermentation en plongée soit de manière ponctuelle en jouant sur l'alimentation du plongeur, soit de manière plus prolongée en modifiant le microbiote intestinal.

Tableau I : Moyens de moduler la fermentation envisageables chez l'homme en vue de diminuer le risque d'accident de désaturation.

Limitation de la fermentation en plongée	Stimulation de la fermentation avant la plongée
Exclusion des plongeurs présentant une valeur d'H ₂ dans l'air expiré > 16,5 ppm	Prébiotiques extractibles naturels → Oligosaccharides de soja (stachyose, raffinose)
Limitation des aliments à fort potentiel de fermentation la veille de la plongée	Prébiotiques de synthèse → Fructo-oligosaccharides → Lactulose
Lopéramide sur une courte durée chez les patients devant plonger et présentant une diarrhée infectieuse	Probiotiques → <i>Clostridium butyricum</i>

Tableau II : Résumé des proportions d'AGCC produits par fermentation à partir de différentes formes d'hydrates de carbone. (d'après Smith et coll. 1998)

Carbohydate	Proportion of SCFA energy (kJ) produced		
	Butyric acid	Propionic acid	Acetic acid
Cellulose	0.33	0.24	0.43
Gum arabic	0.17	0.28	0.56
Lactulose	0.36	0.16	0.48
Oat bran	0.38	0.24	0.38
Pectic substances	0.32	0.17	0.51
Resistant starch	0.55	0.21	0.24
Wheatbran	0.34	0.23	0.42
Xylan	0.06	0.23	0.71

Nous pensons que la variabilité de la fermentation retrouvée chez les plongeurs de notre étude, est liée à la nature de la prise alimentaire la veille de la plongée. Sur le plan diététique, il semble donc licite de limiter les aliments à fort potentiel de fermentation la veille d'une plongée (Tableau I) (Ducrotté 2009, Azpiroz F & Malagelada 2005). L'existence d'une malabsorption du fructose et/ou du sorbitol rend logique la prescription d'un régime d'exclusion (Ducrotté 2009). En l'absence de malabsorption, de petites quantités de fruits correspondant à un apport de fructose jusqu'à 25 g (= environ deux pommes) sont en général bien tolérées (King et coll. 1998). Afin d'exclure une intolérance au lactose, le lait et les produits laitiers devraient également être évités, quoique même en cas d'intolérance au lactose, des quantités modérées jusqu'à 15 g de ce produit (= environ 2,5 dl de lait) ne causent la plupart du temps aucun trouble (Suarez et coll. 1995). Le lait fermenté du fromage et des yaourts est permis. Pour circonscrire l'apport en hydrates de carbone, la part journalière d'amidon (céréales, pommes de terre) ne devrait pas dépasser 40 g. On peut compenser par le riz et les céréales sans gluten, constitués d'hydrates de carbone entièrement absorbables. Il faut être particulièrement prudent dans l'administration de fibres alimentaires destinées à la régulation des selles en cas de constipation, car les pectines et l'hémicellulose qu'elles contiennent subissent la fermentation bactérienne et peuvent donc accroître les flatulences. Pour la régulation des selles, il est préférable d'utiliser les laxatifs salins.

Des traitements sont susceptibles de modifier le microbiote intestinal et de réduire la fermentation. Un antibiotique comme le métronidazole (400 mg, trois fois par jour) est efficace sur le ballonnement avec une réduction très significative de l'excrétion respiratoire d'hydrogène (Dear et coll. 2005). La rifamixine, un dérivé non résorbable de la rifamycine, a également obtenu des résultats intéressants (Di Stefano et coll. 2000, Sharara et coll. 2006, Triantafyllou et coll. 2015). Nous avons par ailleurs montré que l'administration de métronidazole sur une courte période réduisait significativement le risque d'ADD chez le rat (de Maistre et coll. 2016a). La rifamixine pourrait également être testée en prévention de l'ADD. Toutefois, un traitement antibiotique n'a vraisemblablement pas sa place en prévention d'un ADD. Nous avons en effet affaire à des sujets sains pratiquant la plupart du temps une activité de loisir. Il n'en va pas de même pour le loperamide, un anti diarrhéique ralentisseur du transit intestinal, connu pour diminuer la fermentation intestinale (El Oufir et coll. 1996, Lewis & Heaton 1997, Bustos et coll. 1991). Le loperamide pourrait en effet être testé chez des plongeurs présentant une diarrhée infectieuse en prévention d'un ADD (Tableau I). Cette situation est en effet assez fréquente chez les plongeurs réalisant des séjours plongée sous les tropiques. Les probiotiques se définissant comme des organismes bactériens

vivants exerçant des effets bénéfiques sur l'individu qui les ingèrent pourraient également être testés. Plusieurs essais récents méthodologiquement solides ont mis en évidence, au cours du syndrome de l'intestin irritable, qu'une approche thérapeutique, basée principalement sur l'administration de différentes souches de lactobacilles ou de bifidobactéries, obtenait des résultats symptomatiques indiscutables sur le ballonnement abdominal et la fréquence des flatulosités (McFarland & Dublin 2008, O'Mahony et coll. 2005, Nobaek et coll. 2000) avec une réduction de l'hydrogène dans l'air expiré (Sen et coll. 2002). Les probiotiques ont également démontré leur capacité à diminuer la fermentation intestinale dans le cadre d'une malabsorption du lactose (Rizkalla et coll. 2000) ou d'un déficit en α -galactosidase (LeBlanc et coll. 2008). Il en va de même pour certains prébiotiques. En effet, des auteurs ont montré chez le rat que les composés non digérés d'algues comestibles modifiaient le métabolisme du microbiote intestinal, conduisant à une diminution de sa capacité de fermentation (Goñi et coll. 2001).

Toutefois, à l'inverse d'une adaptation de la prise alimentaire avant plongée, les traitements modifiant le microbiote intestinal sont susceptibles d'engendrer une perturbation durable de la fermentation. Or, la fermentation intestinale a une action duale vis-à-vis de l'ADD. Délétère à court terme au moment de la plongée, elle semble être favorable à long terme. Il serait donc préférable de préserver les capacités de fermentation intestinale.

2 Stimulation chronique de la fermentation en dehors de la plongée

Tous les facteurs susceptibles de modifier le microbiote intestinal et d'augmenter la fermentation, en dehors de la plongée, pourraient être testés en prévention de l'ADD.

2.1 Accélération prolongée du transit intestinal

Différents auteurs ont montré que la masse des selles était corrélée à la vitesse de transit intestinal, aussi bien chez le rat (Bustos et coll. 1991) que chez l'homme (El Oufir et coll. 1996, Lewis & Heaton 1997). Dans notre étude, nous avons retrouvé une corrélation entre le temps de transit intestinal d'une part, et l'incidence et la sévérité des accidents de désaturation d'autre part. Ainsi, il semble que l'accélération prolongée du transit intestinal diminue le risque d'ADD chez le rat. Des études complémentaires, testant différents facteurs susceptibles d'accélérer le transit intestinal avec pour objectif la prévention de l'ADD, sont nécessaires.

Dans un certain nombre de cas, l'association entre une modification du microbiote intestinal et une augmentation de la fermentation a déjà été démontrée. C'est le cas de certains

prokinétiques : cisapride chez l'homme (El Oufir et coll. 1996) et du bisacodyl chez le rat (Bustos et coll. 1991).

Dans d'autres études, l'augmentation de la fermentation est escomptée si l'on se base sur la relation inversement proportionnelle entre le temps de transit intestinal et l'hydrogène expiré (El Oufir et coll. 1996, Lewis & Heaton 1997, Bustos et coll. 1991). C'est le cas de certains anti émétiques, tels le metoclopramide ou la domperidone, qui modifient le temps de transit oro-caecal (Staniforth 1987).

L'évaluation de différentes molécules accélérant le transit intestinal chez l'animal permettrait de confirmer l'effet bénéfique du raccourcissement du temps de transit sur le risque d'ADD. Toutefois, ces molécules ne sont pour la plupart pas utilisables chez l'homme sain en raison des effets indésirables qu'elles engendrent.

2.2 Administration de prébiotiques

Les prébiotiques sont généralement des oligosaccharides ou des polysaccharides à courte chaîne constitués approximativement de deux à vingt unités de sucre. Ils échappent à la digestion dans l'intestin grêle et sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par les bactéries coliques. Par définition, les prébiotiques agissent comme substrat sélectif d'une ou d'un nombre restreint de souches bactériennes bénéfiques qui résident dans le côlon, et stimulent leur croissance. Les bifidobactéries et les lactobacilles sont les microorganismes du microbiote intestinal les plus fréquemment ciblés. Lorsque les prébiotiques deviennent disponibles dans le côlon, la masse bactérienne fécale augmente, ainsi que la teneur des selles en eau libre et/ou liée aux bactéries. Certains prébiotiques, stimulant la fermentation, pourraient être testés en prévention de l'ADD (Tableau I).

Des prébiotiques extractibles présents naturellement dans les fruits, les légumes ou le miel, répondent à cette exigence : oligosaccharides de soja (stachyose, raffinose) (Hayakawa et coll. 1990, Zhou et coll. 2012, Zhou et coll. 2014), isomalto-oligosaccharides (Mookiah et coll. 2013), polysaccharides fermentescibles d'algues brunes (alginate et laminarane) (An et coll. 2013), polysaccharides d'igname chinois (Kong et coll. 2009). On pourrait également tester des prébiotiques de synthèse. Parmi eux, on retient les fructo-oligosaccharides produits par hydrolyse de polysaccharides (Le Blay et coll. 2003), le lactulose produit par une réaction chimique d'isomérisation (Calik & Ergün 2015), ou encore potentiellement des trans-galacto-oligosaccharides produits en soumettant des disaccharides tels que le lactose à l'action d'enzymes comme les lactases avec des activités transférases. Des auteurs ont montré que certaines protéines non digérées pouvaient également avoir un effet prébiotique. Ces protéines

résistantes (caséine, protéines de riz, de pomme de terre ou de soja) peuvent contrôler l'efficacité de la fermentation ainsi que le profil de fermentation de l'amidon de maïs riche en amylose, peut-être en raison d'un changement du microbiote résultant d'une modification du rapport de l'amidon à l'azote dans le caecum (Morita et coll. 1998).

2.3 Administration de probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants (bactéries ou levures) qui, ajoutés comme compléments à certains produits alimentaires, auraient un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Mookiah a montré chez le poulet qu'un probiotique multi-souche (composé de 11 souches de *Lactobacillus*), augmentait significativement les bactéries caecales bénéfiques et les acides gras volatiles, qui sont des produits de la fermentation intestinale (Mookiah et coll. 2013). In vitro, des auteurs ont montré que des probiotiques avaient la capacité d'augmenter la production de butyrate et d'acétate, lors d'une fermentation colique simulée d'amidon résistant de maïs à partir d'extraits fécaux d'adultes en bonne santé (Geng & Zhao 2015). *Clostridium butyricum* exerce des effets neuroprotecteurs in vivo dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion cérébrale à travers le rétablissement du contenu cérébral en butyrate (Sun et coll. 2016) : il pourrait être évalué en prévention de l'ADD chez le rat (Tableau I).

3 Intérêt des produits de la fermentation pour le traitement de l'accident de désaturation

Les patients atteints de lésions de la moelle épinière présentent souvent un dysfonctionnement de l'intestin avec un temps de transit colique altéré, en raison de l'absence de contrôle du système gastro-intestinal par le système nerveux central. Les bactéries productrices de butyrate sont spécifiquement réduites chez les patients atteints de lésions de la moelle épinière par rapport aux sujets sains (Gungor et coll. 2016). Or, comme inhibiteur de l'histone déacétylase, le butyrate stimule également la neurogenèse et pourrait intervenir à la phase tardive de récupération neurovasculaire (Kim & Chuang 2014). La prolifération, la migration et la différenciation cellulaire induite par les inhibiteurs l'histone déacétylase font intervenir le brain-derived neurotrophic factor et son récepteur la tropomyosin receptor kinase B (Kim & Chuang 2014). Le butyrate régule fortement à la hausse le facteur de croissance vasculaire endothélial, qui joue un rôle majeur dans la neurogenèse, l'angiogenèse et la récupération fonctionnelle après un accident vasculaire cérébral ischémique (Kim & Chuang 2014). Aussi, le rétablissement des bactéries productrices de butyrate pourrait être intéressant pour le traitement des accidents de désaturation neurologiques. Par ailleurs, les sources alimentaires

de butyrate consistant en un régime alimentaire riche en fibres ou en une alimentation riche en butyrate naturel sont une approche très attrayante (Tableau II). Elles pourraient présenter une méthode simple et relativement peu risquée pour améliorer potentiellement le pronostic chez les patients souffrant d'accidents de désaturation neurologiques. Le butyrate peut être trouvé dans les huiles végétales et les graisses animales (Layden et coll. 2013). L'acide butyrique (forme acide du butyrate) est également présent dans le lait des animaux ruminants, tels que les vaches. Le beurre contient 3-4% d'acide butyrique, sous forme de tributyrine (butyryle triglycéride), ce qui en fait la plus riche source alimentaire de butyrate (Newmark et coll. 1994).

De son côté, l'hydrogène a un certain nombre d'avantages en tant que potentiel antioxydant. Il neutralise efficacement le radical hydroxyle dans les cellules vivantes, et, contrairement aux antioxydants les plus connus, qui ne sont pas en mesure d'atteindre avec succès des organelles, il a des caractéristiques de répartition favorables : il peut pénétrer les membranes biologiques et diffuser dans le cytosol, les mitochondries et le noyau. Malgré l'activité réductrice modérée de l'hydrogène, sa diffusion gazeuse rapide pourrait le rendre très efficace pour réduire les radicaux cytotoxiques (Ohsawa et coll. 2007). Il pourrait être utilisé à la phase précoce de l'ADD, caractérisée par la mort neuronale, l'inflammation, et la rupture de la barrière hémato-encéphalique.

REFERENCES

1. Addolorato G, Montalto M, Capristo E, et al. Influence of alcohol on gastrointestinal motility: lactulose breath hydrogen testing in orocecal transit time in chronic alcoholics, social drinkers and teetotaler subjects. *Hepatogastroenterology* 1997;44(16):1076-1081.
2. Altomare DF, Bonfrate L, Krawczyk M, et al. The inulin hydrogen breath test predicts the quality of colonic preparation. *Surg Endosc* 2014;28(5):1579-1587.
3. An C, Kuda T, Yazaki T, et al. FLX pyrosequencing analysis of the effects of the brown-algal fermentable polysaccharides alginate and laminaran on rat cecal microbiotas. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(3):860-866.
4. Anderson IH, Levine AS, Levitt MD. Incomplete absorption of the carbohydrate in all-purpose wheat flour. *N Engl J Med* 1981;304(15):891-892.
5. Anderson IH, Levine AS, Levitt MD. Incomplete absorption of the carbohydrate in all-purpose wheat flour. *N Engl J Med* 1981;304(15):891-892.
6. Arieli Y, Arieli R, Marx A. Hyperbaric oxygen may reduce gas bubbles in decompressed prawns by eliminating gas nuclei. *J Appl Physiol* (1985) 2002;92(6):2596-2599.
7. Azpiroz F, Malagelada JR. Abdominal bloating. *Gastroenterology* 2005;129(3):1060-1078.
8. Azpiroz F. Flore intestinale et gaz intestinaux. In: Rambaud JC, Buts JP, Corthier G, Flourie B, editors. *Flore microbienne intestinale, Physiologie et pathologie digestive*. Paris: John Libbey Eurotext; 2004. p. 81-95.
9. Baird AE, Dambrosia J, Janket S, et al. A three-item scale for the early prediction of stroke recovery. *Lancet* 2001;357(9274):2095-2099.
10. Balestra C, Germonpre P, Marroni A. Intrathoracic pressure changes after Valsalva strain and other maneuvers: implications for divers with patent foramen ovale. *Undersea Hyperb Med* 1998;25(3):171-174.
11. Bangasser SA. Medical profile of the woman scuba diver. In: NAUI, editor. *10th International Conference on Underwater Education*; 1978; Colton, California: National ASSN of Underwater Instructors; 1978. p. 31-40.
12. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, et al. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(4):1654-1661.
13. Basit AW, Newton JM, Short MD, et al. The effect of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit: implications for the formulation of poorly-water soluble drugs. *Pharm Res* 2001;18(8):1146-1150.

14. Bassett BD. Twelve year survey of the susceptibility of women to altitude decompression sickness. In: Annual Scientific Meeting, Aerospace Medical Assn; 1973; Detroit: Aerospace Medical Association; 1973. p. 261-262.
15. Bedell GN, Marshall R, Dubois AB, et al. Measurement of the volume of gas in the gastrointestinal tract; values in normal subjects and ambulatory patients. *J Clin Invest* 1956;35(3):336-345.
16. Behnke AR. Decompression sickness following exposure to high pressures. In: Fulton JF, editor. *Decompression sickness*. Philadelphia: Saunders; 1951.
17. Bensalem H, Sampol J, Bladou F, et al. Evaluation des effets biologiques de l'hydrogène gazeux sur des lignées de cellules cancéreuses (Etude de faisabilité). *Bull Medsubhyp* 2002;12(1):15-24.
18. Berghage TE, David TD, Dyson CV. Species differences in decompression. *Undersea Biomed Res* 1979;6(1):1-13.
19. Bernalier-Donadille A. Principales fonctions métaboliques de la flore intestinale de l'homme. In: Rambaud JC, Buts JP, Corthier G, Flourie B, editors. *Flore microbienne intestinale, Physiologie et pathologie digestive*. Paris: John Libbey Eurotext; 2004. p. 61-80.
20. Bernigaud E. Rôle du stress oxydatif dans la maladie de décompression. Etude expérimentale chez le lapin [Médecine]. Bordeaux: Université Bordeaux II; 1995.
21. Bert P. *La pression barométrique*: Masson; 1878.
22. Bjørneklett A, Jenssen E. Relationships between hydrogen (H₂) and methane (CH₄) production in man. *Scand J Gastroenterol* 1982;17(8):985-992.
23. Bjørneklett A, Midtvedt T. Influence of three antimicrobial agents--penicillin, metronidazole, and doxycyclin--on the intestinal microflora of healthy humans. *Scand J Gastroenterol* 1981;16(4):473-480.
24. Blatteau JE, Boussuges A, Hugon M. L'accident bullaire initial. In: Broussolle B, Meliet JL, editors. *Physiologie et médecine de la plongée*. Paris: Ellipses; 2006. p. 385-393.
25. Blatteau JE, Brubakk AO, Gempp E, et al. Sildenafil pre-treatment promotes decompression sickness in rats. *PLoS One* 2013;8(4):e60639.
26. Blatteau JE, Gempp E, Simon O, et al. Prognostic factors of spinal cord decompression sickness in recreational diving: retrospective and multicentric analysis of 279 cases. *Neurocrit Care* 2010;15(1):120-127.
27. Blatteau JE, Souraud JB, Boussuges A. Naissance des bulles: Théories des noyaux gazeux. In: Broussolle B, Meliet JL, editors. *Physiologie et médecine de la plongée*. Paris: Ellipses; 2006. p. 359-384.
28. Blatteau JE, Souraud JB, Gempp E, et al. Gas nuclei, their origin, and their role in bubble formation. *Aviat Space Environ Med* 2006;77(10):1068-1076.

29. Boivin M, Flourie B, Rizza RA, et al. Gastrointestinal and metabolic effects of amylase inhibition in diabetics. *Gastroenterology* 1988;94(2):387-394.
30. Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, et al. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J Nutr* 1999;129(1):113-116.
31. Bourassa MW, Alim I, Bultman SJ, et al. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neurosci Lett* 2016.
32. Boussuges A, Succo E, Juhan-Vague I, et al. Activation of coagulation in decompression illness. *Aviat Space Environ Med* 1998;69(2):129-132.
33. Boycott AE, Damant GCC, Haldane JS. The prevention of compressed air illness. *J Hyg Camb* 1908;8:342-443.
34. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* 2014;6(263):263ra158.
35. Briet F, Flourie B, Achour L, et al. Bacterial adaptation in patients with short bowel and colon in continuity. *Gastroenterology* 1995;109(5):1446-1453.
36. Briet F, Flourie B, Achour L, et al. Bacterial adaptation in patients with short bowel and colon in continuity. *Gastroenterology* 1995;109(5):1446-1453.
37. Broome JR, Kittel CL, Dick EJ. Failure of pre-dive hydration status to influence neurological DCI rate in pigs. *Undersea Hyperb Med* 1995;22(suppl.):52.
38. Broome JR. Climatic and environmental factors in the etiology of DCI in divers. *Undersea Biomed Res* 1992;19(suppl.):17.
39. Brugge WR, Rosenfeld MS. Impairment of starch absorption by a potent amylase inhibitor. *Am J Gastroenterol* 1987;82(8):718-722.
40. Bucquoy. De l'air comprimé. Thèse de Strasbourg; 1861.
41. Buhlmann AA. Decompression theory: Swiss practice. In: Bennett PB, Elliott DH, editors. *The physiology and medicine of diving and compressed air work*. 2ème ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1975. p. 348-365.
42. Bustos D, Ogawa K, Pons S, et al. Effect of loperamide and bisacodyl on intestinal transit time, fecal weight and short chain fatty acid excretion in the rat. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1991;21(1):3-9.
43. Butler BD, Hills BA. Role of lung surfactant in cerebral decompression sickness. *Aviat Space Environ Med* 1983;54(1):11-15.
44. Butler BD, Hills BA. The lung as a filter for microbubbles. *J Appl Physiol* 1979;47(3):537-543.

45. Buts JP, De Keyser N, De Raedemaeker L. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr Res* 1994;36(4):522-527.
46. Buttolph TB, Broome JR, Dick Jr EJ, et al. Leucocyte-mediated inflammation in a porcine model of cutaneous decompression illness. *Undersea Hyperb Med* 1996;23(suppl.):38.
47. Calik A, Ergun A. Effect of lactulose supplementation on growth performance, intestinal histomorphology, cecal microbial population, and short-chain fatty acid composition of broiler chickens. *Poult Sci* 2015;94(9):2173-2182.
48. Cappello G, Marzio L. Rifaximin in patients with lactose intolerance. *Dig Liver Dis* 2005;37(5):316-319.
49. Carturan D, Boussuges A, Burnet H, et al. Circulating venous bubbles in recreational diving: relationships with age, weight, maximal oxygen uptake and body fat percentage. *Int J Sports Med* 1999;20(6):410-414.
50. Cloarec D, Bornet F, Guilloud S, et al. Breath hydrogen response to lactulose in healthy subjects: relationship to methane producing status. *Gut* 1990;31(3):300-304.
51. Cloarec D, Flourié B, Marteau P. Les gaz digestifs : aspects physiopathologiques et thérapeutiques au cours des troubles fonctionnels. *Gastroenterol Clin Biol* 1990;14:641-650.
52. Conkin J, Gernhardt ML, Foster PP. Relationship of exercise, age, and gender on decompression sickness and venous gas emboli during 2-hour oxygen prebreathe prior to hypobaric exposure. *Undersea Hyperb Med* 2000;27(suppl.):12.
53. Conkin J, Gernhardt ML, Foster PP. Relationship of exercise, age, and gender on decompression sickness and venous gas emboli during 2-hour oxygen prebreathe prior to hypobaric exposure. *Undersea Hyperb Med* 2000;27(suppl.):12.
54. Cook GC. Hypochlorhydria and vulnerability to intestinal infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6:693-695.
55. Cook SF. Environmental factors affecting decompression sickness. Part III. Role of exercise, temperature, drugs and water balance in decompression sickness. In: Fulton JF, editor. *Decompression sickness*. Philadelphia: WB Saunders; 1951. p. 223-241.
56. Corazza GR, Stocchi A, Gasbarrini G. Fasting breath hydrogen in celiac disease. *Gastroenterology* 1987;93(1):53-58.
57. Coremans G, Vos R, Margaritis V, et al. Small doses of the unabsorbable substance polyethylene glycol 3350 accelerate oro-caecal transit, but slow gastric emptying in healthy subjects. *Dig Liver Dis* 2005;37(2):97-101.
58. Counotte GH, Prins RA, Janssen RH, et al. Role of *Megasphaera elsdenii* in the Fermentation of dl-[2-C]lactate in the Rumen of Dairy Cattle. *Appl Environ Microbiol* 1981;42(4):649-655.

59. Cross JL, Meloni BP, Bakker AJ, et al. Modes of Neuronal Calcium Entry and Homeostasis following Cerebral Ischemia. *Stroke Res Treat* 2010;2010:316862.
60. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012;13(10):701-712.
61. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 1991;70(6):443-459.
62. Curley MD, Robin GJ, Thalmann ED. Percent body fat and human decompression sickness. *Undersea Biomed Res* 1989;16(suppl.):29.
63. Daniels S, Eastaugh KC, Paton WDM, et al. Miconuclei and bubble formation: a quantitative study using the common shrimp, *Crangon crangon*. . In: Bachrach AJ, Matzen MM, editors. *Underwater Physiology VIII* Bethesda: Undersea Medical Society; 1984.
64. de Lacy Costello BP, Ledochowski M, Ratcliffe NM. The importance of methane breath testing: a review. *J Breath Res*;7(2):024001.
65. de Maistre S, Vallee N, Gempp E, et al. Colonic Fermentation Promotes Decompression sickness in Rats. *Sci Rep* 2016;6:20379.
66. de Maistre S, Vallee N, Gempp E, et al. Gut Fermentation Seems to Promote Decompression Sickness in Humans. *J Appl Physiol (1985)* 2016:jap 00503 02016.
67. de Maistre S. Implication d'un shunt circulatoire droite-gauche dans les lésions cérébrales latentes chez les plongeurs. [Thèse de médecine]. Lyon: Université Claude Bernard Lyon 1; 2004.
68. Dear KL, Elia M, Hunter JO. Do interventions which reduce colonic bacterial fermentation improve symptoms of irritable bowel syndrome? *Dig Dis Sci* 2005;50(4):758-766.
69. Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology* 2010;17(3):197-218.
70. DeGirolami U, Zivin JA. Neuropathology of experimental spinal cord ischemia in the rabbit. *J Neuropathol Exp Neurol* 1982;41(2):129-149.
71. Dehn MM, Bruce RA. Longitudinal variations in maximal oxygen intake with age and activity. *J Appl Physiol* 1972;33(6):805-807.
72. Dembert ML, Jekel JF, Mooney LW. Health risk factors for the development of decompression sickness among U.S. Navy divers. *Undersea Biomed Res* 1984;11(4):395-406.
73. Di Stefano M, Miceli E, Malservisi S, et al. Mixing of the intestinal content and variations of fermentation capacity do not affect the results of hydrogen breath test. *Am J Gastroenterol* 2003;98(7):1584-1587.

74. Di Stefano M, Miceli E, Missanelli A, et al. Fermentation of endogenous substrates is responsible for increased fasting breath hydrogen levels in celiac disease. *J Lab Clin Med* 2004;143(3):163-168.
75. Di Stefano M, Strocchi A, Malservisi S, et al. Non-absorbable antibiotics for managing intestinal gas production and gas-related symptoms. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14(8):1001-1008.
76. Di Stefano M, Strocchi A, Malservisi S, et al. Non-absorbable antibiotics for managing intestinal gas production and gas-related symptoms. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14(8):1001-1008.
77. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22(9):391-397.
78. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22(9):391-397.
79. Dirnagl U, Schwab JM. Brain-immune interactions in acute and chronic brain disorders. *Neuroscience* 2009;158(3):969-971.
80. Dixon GA, Krutz RW, Jr., Fischer JR. Decompression sickness and bubble formation in females exposed to a simulated 7.8 psia suit environment. *Aviat Space Environ Med* 1988;59(12):1146-1149.
81. Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, et al. Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 2008;63(6):720-728.
82. Doyle K, Baek PS, De Long ER. Menstruation as a risk factor for decompression illness in female scuba divers taking oral contraceptives. *Undersea Hyperb Med* 1997;24(suppl.):33.
83. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med* 2011;17(4):439-447.
84. Ducrotte P. [Abdominal bloating: an up-to-date]. *Gastroenterol Clin Biol* 2009;33(10-11 Suppl):F94-100.
85. Dunford R, Hampson NB. Gender-related risk of decompression sickness in hyperbaric chamber inside attendants: a case control study. *Undersea Biomed Res* 1992;19(suppl.):37.
86. Dunford R, Hayward J. Venous gas bubble production following cold stress during a no-decompression dive. *Undersea Biomed Res* 1981;8(1):41-49.
87. Dunford R, Huggins K, Wacholz C. Relationship of deepest dive or deepest quarter of dive to Doppler scores. *Undersea Hyperb Med* 1994;21(suppl.):88-89.
88. Eckenhoff RG, Olstad CS, Carrod G. Human dose-response relationship for decompression and endogenous bubble formation. *J Appl Physiol* 1990;69(3):914-918.

89. Eckenhoff RG, Olstad CS, Carrod GE. Venous gas emboli in humans after prolonged exposure to 1.48 ATA (16 fswg) air. *Undersea Biomed Res* 1989;16(suppl.):67-68.
90. El Oufir L, Flourie B, Bruley des Varannes S, et al. Relations between transit time, fermentation products, and hydrogen consuming flora in healthy humans. *Gut* 1996;38(6):870-877.
91. Elmer GW, Surawicz CM, McFarland LV. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA* 1996;275(11):870-876.
92. Enck P, Merlin V, Erckenbrecht JF, et al. Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut* 1989;30(4):455-459.
93. Fahlman A, Dromsky DM. Dehydration effects on the risk of severe decompression sickness in a swine model. *Aviat Space Environ Med* 2006;77(2):102-106.
94. Fahlman A, Dromsky DM. Dehydration effects on the risk of severe decompression sickness in a swine model. *Aviat Space Environ Med* 2006;77(2):102-106.
95. Fan YY, Shen Z, He P, et al. A novel neuroprotective strategy for ischemic stroke: transient mild acidosis treatment by CO₂ inhalation at reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34(2):275-283.
96. FAO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. In: Report of a Joint FAO WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; 1 - 4 October 2001; American Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina; 1 - 4 October 2001.
97. Fernandez-Banares F, Esteve-Pardo M, de Leon R, et al. Sugar malabsorption in functional bowel disease: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 1993;88(12):2044-2050.
98. Finkelstein Y, Tamir A. Formation of gas bubbles in supersaturated solutions of gases in water. *AIChE J* 1985;31(9):1409-1418.
99. Flook V. The effect of exercise on decompression bubbles. A theoretical study. In: Mekjavic IB, Tipton MJ, Eiken O, editors. XXIII Annual Scientific Meeting of the European Underwater and Baromedical Society; 1997; Bled, Slovenia: EUBS; 1997. p. 55-61.
100. Flourié B, Florent C, Etanchaud F. Fonction digestive du caecum chez l'homme normal. *Cah Nut Diét* 1988; 23: 111-115
101. Flourie B, Leblond A, Florent C, et al. Starch malabsorption and breath gas excretion in healthy humans consuming low- and high-starch diets. *Gastroenterology* 1988;95(2):356-363.
102. Flourie B, Pellier P, Florent C, et al. Site and substrates for methane production in human colon. *Am J Physiol* 1991;260(5 Pt 1):G752-757.

103. Francis T, Mitchell S. Pathophysiology of decompression sickness. In: Brubbak AO, Neuman TS, editors. *The Bennett and Elliot's physiology and medicine of diving*. 5th Ed ed. London: WB Saunders; 2003. p. 530-556.
104. Francis TJ, Dutka AJ, Flynn ET. Experimental determination of latency, severity, and outcome in CNS decompression sickness. *Undersea Biomed Res* 1988;15(6):419-427.
105. Frenkel J. *Kinetic theory of liquids*. In. New York: Dover; 1955.
106. Friis H, Bode S, Rumessen JJ, et al. Effect of simethicone on lactulose-induced H₂ production and gastrointestinal symptoms. *Digestion* 1991;49(4):227-230.
107. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991;32(4):439-442.
108. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol* 1985;88(1):123-134.
109. Gasbarrini A, Corazza GR, Gasbarrini G, et al. Methodology and indications of H₂-breath testing in gastrointestinal diseases: the Rome Consensus Conference. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29 Suppl 1:1-49.
110. Geng Q, Zhao XH. Influences of exogenous probiotics and tea polyphenols on the production of three acids during the simulated colonic fermentation of maize resistant starch. *J Food Sci Technol* 2015;52(9):5874-5881.
111. Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT, et al. Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut* 1990;31(6):679-683.
112. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125(6):1401-1412.
113. Gilat T, Ben Hur H, Gelman-Malachi E, et al. Alterations of the colonic flora and their effect on the hydrogen breath test. *Gut* 1978;19(7):602-605.
114. Giry P, Broussolle B, Cavenel P, et al. Modifications du taux de plaquettes circulantes chez l'homme après plongée itérative. *Bull Med Sub Hyp* 1977;61:57-61.
115. Golding FC, Griffiths P, Hempleman HV, et al. Decompression sickness during construction of the Dartford Tunnel. *Br J Ind Med* 1960;17:167-180.
116. Goni I, Gudiel-Urbano M, Bravo L, et al. Dietary modulation of bacterial fermentative capacity by edible seaweeds in rats. *J Agric Food Chem* 2001;49(5):2663-2668.
117. Gorman DF, Pearce A, Webb RK. Dysbaric illness treated at the Royal Adelaide Hospital 1987: A factorial analysis. *SPUMS J* 1988;18:95-101.
118. Gremse DA, Hixon J, Crutchfield A. Comparison of polyethylene glycol 3350 and lactulose for treatment of chronic constipation in children. *Clin Pediatr (Phila)* 2002;41(4):225-229.

119. Grimble G. Fibre, fermentation, flora, and flatus. *Gut* 1989;30(1):6-13.
120. Guilliod R, Cotto-Cumba C, Myers R. Constrictive postures as risk factor in decompression sickness. *Undersea Hyperb Med* 1996;23(suppl.):72.
121. Gungor B, Adiguzel E, Gursel I, et al. Intestinal Microbiota in Patients with Spinal Cord Injury. *PLoS One* 2016;11(1):e0145878.
122. Hamberg O, Rumessen JJ, Gudmand-Hoyer E. Inhibition of starch absorption by dietary fibre. A comparative study of wheat bran, sugar-beet fibre, and pea fibre. *Scand J Gastroenterol* 1989;24(1):103-109.
123. Hammer HF. Colonic hydrogen absorption: quantification of its effect on hydrogen accumulation caused by bacterial fermentation of carbohydrates. *Gut* 1993;34(6):818-822.
124. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007;10(11):1387-1394.
125. Hanson CF, Winterfeldt EA. Dietary fiber effects on passage rate and breath hydrogen. *Am J Clin Nutr* 1985;42(1):44-48.
126. Harms HK, Bertele-Harms RM, Bruer-Kleis D. Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N Engl J Med* 1987;316(21):1306-1309.
127. Harris M, Berg WE, Whitaker DM, et al. The Relation of Exercise to Bubble Formation in Animals Decompressed to Sea Level from High Barometric Pressures. *J Gen Physiol* 1945;28(3):241-251.
128. Hartemink R, Alles MS, Rombouts FM. Fermentation of selected carbohydrates by faecal inocula from volunteers on a controlled diet low in fibre. In: Hartemink R, editor. *Prebiotic effects of non-digestible oligo- and polysaccharides*. Landbouwniversiteit Wageningen; 1999.
129. Harvey EN. Physical factors in bubble formation. In: Fulton JF, editor. *Decompression sickness*. Philadelphia: Saunders; 1951.
130. Hayakawa KC, Mizutani F, Wada K, et al. Effects of Soybean Oligosaccharides on Human Faecal Flora. *Microbial Ecology in Health and Disease* 1990;3:293-303.
131. Hennessy TR. The site of origin, evolution and effects of decompression micro-bubbles. *Bull Med Sub Hyp* 2002;12:101-138.
132. Hills BA. A hydrophobic oligolamellar lining to the vascular lumen in some organs. *Undersea Biomed Res* 1992;19(2):107-120.
133. Hills BA. Decompression sickness. In: *The biophysical basis of prevention and treatment*. London: John Wiley and Sons; 1977. p. 65.

134. Hills BA. Spinal decompression sickness: hydrophobic protein and lamellar bodies in spinal tissue. *Undersea Hyperb Med* 1993;20(1):3-16.
135. Hjelde A, Bergh K, Brubakk AO, et al. Complement activation in divers after repeated air/heliox dives and its possible relevance to DCS. *J Appl Physiol* 1995;78(3):1140-1144.
136. Hjelde A, Koteng S, Brubakk AO. Surface tension and bubble formation after decompression in the pig. *Appl Cardiopulm Pathophysiol* 2000;9:1-12.
137. Hossmann KA. Pathophysiological basis of translational stroke research. *Folia Neuropathol* 2009;47(3):213-227.
138. Huang SH, Wang L, Chi F, et al. Circulating brain microvascular endothelial cells (cBMECs) as potential biomarkers of the blood-brain barrier disorders caused by microbial and non-microbial factors. *PLoS One* 2013;8(4):e62164.
139. Huang Y, Xie K, Li J, et al. Beneficial effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Brain Res* 2011;1378:125-136.
140. Hyams JS. Sorbitol intolerance: an unappreciated cause of functional gastrointestinal complaints. *Gastroenterology* 1983;84(1):30-33.
141. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011;17(7):796-808.
142. Ishiyama A. Analysis of gas composition of intravascular bubbles produced by decompression. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1983;30(2):25-35.
143. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, et al. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2 Suppl):444S-450S.
144. Ito M, Hirayama M, Yamai K, et al. Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Med Gas Res* 2012;2(1):15.
145. Jahn HU, Ullrich R, Schneider T, et al. Immunological and trophical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers. *Digestion* 1996;57(2):95-104.
146. Jahng J, Jung IS, Choi EJ, et al. The effects of methane and hydrogen gases produced by enteric bacteria on ileal motility and colonic transit time. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24(2):185-190, e192.
147. Jankowski LW, Nishi RY, Eaton DJ, et al. Exercise during decompression reduces the amount of venous gas emboli. *Undersea Hyperb Med* 1997;24(2):59-65.
148. Jauchem JR, Waligora JM, Conkin J, et al. Blood biochemical factors in humans resistant and susceptible to formation of venous gas emboli during decompression. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1986;55(1):68-73.

149. Ji Q, Hui K, Zhang L, et al. The effect of hydrogen-rich saline on the brain of rats with transient ischemia. *J Surg Res* 2011;168(1):e95-101.
150. Jouet P, Sabate JM, Flourie B, et al. Effects of therapeutic doses of lactulose vs. polyethylene glycol on isotopic colonic transit. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27(10):988-993.
151. Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001;410(6828):549-554.
152. Kajs TM, Fitzgerald JA, Buckner RY, et al. Influence of a methanogenic flora on the breath H₂ and symptom response to ingestion of sorbitol or oat fiber. *Am J Gastroenterol* 1997;92(1):89-94.
153. Kashyap PC, Marcobal A, Ursell LK, et al. Complex interactions among diet, gastrointestinal transit, and gut microbiota in humanized mice. *Gastroenterology* 2013;144(5):967-977.
154. Kayar SR, Fahlman A, Lin WC, et al. Increasing activity of H₂-metabolizing microbes lowers decompression sickness risk in pigs during H₂ dives. *J Appl Physiol* (1985) 2001;91(6):2713-2719.
155. Kayar SR, Fahlman A. Decompression sickness risk reduced by native intestinal flora in pigs after H₂ dives. *Undersea Hyperb Med* 2001;28(2):89-97.
156. Kayar SR, Miller TL, Wolin MJ, et al. Decompression sickness risk in rats by microbial removal of dissolved gas. *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 2):R677-682.
157. Kayar SR. Biochemical Approach to Decompression. In: Brubakk A, Lang MA, editors. *The future of diving: 100 years of Haldane and beyond*. Washington, DC: Smithsonian Institution Scholarly Press; 2009. p. 33-39.
158. Kim HJ, Chuang DM. HDAC inhibitors mitigate ischemia-induced oligodendrocyte damage: potential roles of oligodendrogenesis, VEGF, and anti-inflammation. *Am J Transl Res* 2014;6(3):206-223.
159. King TS, Elia M, Hunter JO. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 1998;352(9135):1187-1189.
160. King TS, Elia M, Hunter JO. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 1998;352(9135):1187-1189.
161. Kirk E. The quantity and composition of human colonic flatus. *Gastroenterology* 1949;12(5):782-794.
162. Kong XF, Zhang YZ, Wu X, et al. Fermentation characterization of chinese yam polysaccharide and its effects on the gut microbiota of rats. *Int J Microbiol* 2009;2009:598152.
163. Koteng S, Reinertsen RE, Holmen IM. The effect of reduced peripheral circulation on the formation of venous gas bubbles after decompression. *Undersea Hyperb Med* 1996;23(suppl.):38.

164. Krause KM, Pilmanis AA, Webb JT. The effect of menstruation day on decompression sickness incidence in female research subjects. *Aviat Space Environ Med* 1998;69(3):199.
165. Kumar S, Misra A, Ghoshal UC. Patients with irritable bowel syndrome exhale more hydrogen than healthy subjects in fasting state. *J Neurogastroenterol Motil* 2010;16(3):299-305.
166. Laborit H BL, Perrimond-Trouchet R. Action de l'héparine dans le traitement des accidents de décompression. *Agressologie* 1961;2:229-236.
167. Lam TH, Yau KP. Analysis of some individual risk factors for decompression sickness in Hong Kong. *Undersea Biomed Res* 1989;16(4):283-292.
168. Lang MA, Lehner CE. Findings and conclusion. In: Lang MA, Lehner CE, editors. *Reverse Dive Profiles Workshop; 2000; Washington: Smithsonian Institution; 2000.* p. 290.
169. Langley B, D'Annibale MA, Suh K, et al. Pulse inhibition of histone deacetylases induces complete resistance to oxidative death in cortical neurons without toxicity and reveals a role for cytoplasmic p21(waf1/cip1) in cell cycle-independent neuroprotection. *J Neurosci* 2008;28(1):163-176.
170. Laursen SB, Gronfeldt W, Jacobsen E. [Decompression sickness after diving and following flying]. *Ugeskr Laeger* 1999;161(30):4293-4294.
171. Layden BT, Angueira AR, Brodsky M, et al. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Transl Res* 2013;161(3):131-140.
172. Layer P, Zinsmeister AR, DiMagno EP. Effects of decreasing intraluminal amylase activity on starch digestion and postprandial gastrointestinal function in humans. *Gastroenterology* 1986;91(1):41-48.
173. Le Blay GM, Michel CD, Blottiere HM, et al. Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *J Appl Microbiol* 2003;94(2):312-320.
174. Le Marchand L, Wilkens LR, Harwood P, et al. Use of breath hydrogen and methane as markers of colonic fermentation in epidemiologic studies: circadian patterns of excretion. *Environ Health Perspect* 1992;98:199-202.
175. LeBlanc JG, Ledue-Clier F, Bensaada M, et al. Ability of *Lactobacillus fermentum* to overcome host alpha-galactosidase deficiency, as evidenced by reduction of hydrogen excretion in rats consuming soya alpha-galacto-oligosaccharides. *BMC Microbiol* 2008;8:22.
176. Lee VM, St Leger Dowse M, Bunting AJ. The menstrual cycle and decompression illness - what are the risks? *Undersea Hyperb Med* 1998;25(suppl.):11.

177. Lembcke B, Honig M, Caspary WF. Different actions of neomycin and metronidazole on breath hydrogen (H₂) exhalation. *Z Gastroenterol* 1980;18(3):155-160.
178. Levitt MD, Bond JH, Jr. Volume, composition, and source of intestinal gas. *Gastroenterology* 1970;59(6):921-929.
179. Levitt MD, Hirsh P, Fetzer CA, et al. H₂ excretion after ingestion of complex carbohydrates. *Gastroenterology* 1987;92(2):383-389.
180. Levitt MD, Ingelfinger FJ. Hydrogen and methane production in man. *Ann N Y Acad Sci* 1968;150(1):75-81.
181. Levitt MD. Intestinal gas production--recent advances in flatology. *N Engl J Med* 1980;302(26):1474-1475.
182. Levitt MD. Volume and composition of human intestinal gas determined by means of an intestinal washout technic. *N Engl J Med* 1971;284(25):1394-1398.
183. Lewis SJ, Heaton KW. Increasing butyrate concentration in the distal colon by accelerating intestinal transit. *Gut* 1997;41(2):245-251.
184. Li H, Sun J, Wang F, et al. Sodium butyrate exerts neuroprotective effects by restoring the blood-brain barrier in traumatic brain injury mice. *Brain Res* 2016;1642:70-78.
185. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* 1965;147(3659):747-748.
186. Lin HC. Small intestinal bacterial overgrowth: a framework for understanding irritable bowel syndrome. *JAMA* 2004;292(7):852-858.
187. Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, et al. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 2012;11(3):261-271.
188. Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *BMJ* 1999;318(7189):999-1003.
189. Macfarlane GT, Cummings JH. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: Phillips SF, Pemberton JH, Shorter RG, editors. *The large intestine: physiology, pathophysiology and disease*. New York: Raven Press; 1991. p. 51-92.
190. Macfarlane GT, Gibson GR. Metabolic activities of the normal colonic flora. In: Gibson SAW, editor. *Human health The contribution of microorganisms* Londres: Springer-Verlag; 1994. p. 17-52.
191. Maczulak AE, Wolin MJ, Miller TL. Increase in colonic methanogens and total anaerobes in aging rats. *Appl Environ Microbiol* 1989;55(10):2468-2473.

192. Mann NS, Condon DS, Leung JW. Colonic preparation correlates with fasting breath hydrogen in patients undergoing colonoscopy. *Hepatogastroenterology* 2003;50(49):85-86.
193. Marteau P, Flourie B, Pochart P, et al. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br J Nutr* 1990;64(1):71-79.
194. Marteau P, Flourie B. Tolerance to low-digestible carbohydrates: symptomatology and methods. *Br J Nutr* 2001;85 Suppl 1:S17-21.
195. Marteau P, Pochart P, Dore J, et al. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(10):4939-4942.
196. Marteau P, Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17(5):725-740.
197. Marteau P. Facteurs de contrôle de la flore. Définitions et modes d'action des probiotiques et prébiotiques. In: Rambaud JC, Buts JP, Corthier G, Flourie B, editors. *Flore microbienne intestinale, Physiologie et pathologie digestive*. Paris: John Libbey Eurotext; 2004. p. 38-59.
198. Marteau P. *Survie et effets de micro-organismes alimentaires non pathogènes dans le tube digestif de l'homme [Thèse de Doctorat]*. Paris: Université Paris Sud; 1994.
199. Masurel G. *Contribution à l'étude du rôle physiopathologique des bulles générées chez l'animal et chez l'homme par un séjour en atmosphère hyperbare [Sciences]*. Lyon: Université Claude Bernard Lyon 1; 1987.
200. Matheson MS, Rabani J. Pulse radiolysis of aqueous hydrogen solutions. *The journal of physical chemistry* 1965;69(4):1324-1335.
201. McFarland LV, Dublin S. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2008;14(17):2650-2661.
202. Mekjavic IB, Kakitsuba N. Effect of peripheral temperature on the formation of venous gas bubbles. *Undersea Biomed Res* 1989;16(5):391-401.
203. Méliet JL. Aspects microcirculatoires de la maladie de décompression. *Bull Med Sub Hyp* 1999;9(suppl.):51-59.
204. Meliet JL. Paramètres physiques de l'hyperbarie. In: Wattel F, Mathieu D, editors. *Traité de médecine hyperbare*. Paris: Ellipses Editions Marketing; 2002. p. 29-37.
205. Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 2004;19(3-4):151-167.

206. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, et al. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 2013;36(10):587-597.
207. Miller TL, Wolin MJ. Fermentation by saccharolytic intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr* 1979;32:164-172.
208. Moller K, Boltze J, Posel C, et al. Sterile inflammation after permanent distal MCA occlusion in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34(2):307-315.
209. Montcalm-Smith EA, Fahlman A, Kayar SR. Pharmacological interventions to decompression sickness in rats: comparison of five agents. *Aviat Space Environ Med* 2008;79(1):7-13.
210. Mookiah S, Sieo CC, Ramasamy K, et al. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *J Sci Food Agric* 2013;94(2):341-348.
211. Morita T, Kasaoka S, Ohhashi A, et al. Resistant proteins alter cecal short-chain fatty acid profiles in rats fed high amylose cornstarch. *J Nutr* 1998;128(7):1156-1164.
212. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 2010;67(2):181-198.
213. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 2010;67(2):181-198.
214. Muir P, Gruffydd-Jones TJ, Cripps PJ, et al. Breath hydrogen excretion by healthy cats after oral administration of oxytetracycline and metronidazole. *Vet Rec* 1996;138(26):635-639.
215. Newman A. Breath-analysis tests in gastroenterology. *Gut* 1974;15(4):308-323.
216. Newmark HL, Lupton JR, Young CW. Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer Lett* 1994;78(1-3):1-5.
217. Ni XX, Cai ZY, Fan DF, et al. Protective effect of hydrogen-rich saline on decompression sickness in rats. *Aviat Space Environ Med* 2011;82(6):604-609.
218. Nishi R. Doppler and ultrasonic detection. In: Bennett PB, Elliott DH, editors. *The physiology and medicine of diving*. 4th ed. London: WB Saunders; 1993. p. 443-453.
219. Nishi RY, Brubakk AO, Eftedal OS. Bubble detection. In: Brubakk AO, Neuman TS, editors. *The Bennett and Elliot's physiology and medicine of diving*. 5th Ed ed. London: WB Saunders; 2003. p. 501-529.
220. Nobaek S, Johansson ML, Molin G, et al. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000;95(5):1231-1238.

221. Nossum V, Koteng S, Brubakk AO. Endothelial damage by bubbles in the pulmonary artery of the pig. *Undersea Hyperb Med* 1999;26(1):1-8.
222. Obad A, Marinovic J, Ljubkovic M, et al. Successive deep dives impair endothelial function and enhance oxidative stress in man. *Clin Physiol Funct Imaging* 2010;30(6):432-438.
223. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007;13(6):688-694.
224. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, et al. Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005;128(3):541-551.
225. Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health* 1974;29:4-8.
226. Pekna M, Ersson A. Complement system response to decompression. *Undersea Hyperb Med* 1996;23(1):31-34.
227. Perman JA, Modler S, Barr RG, et al. Fasting breath hydrogen concentration: normal values and clinical application. *Gastroenterology* 1984;87(6):1358-1363.
228. Perman JA, Modler S. Glycoproteins as substrates for production of hydrogen and methane by colonic bacterial flora. *Gastroenterology* 1982;83(2):388-393.
229. Perman JA, Montes RG. Approach to the patient with gas and bloating. In: Yamada T, editor. *Textbook of gastroenterology*. 2nd ed. ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1995. p. 772-782.
230. Petzold GC, Haack S, von Bohlen Und Halbach O, et al. Nitric oxide modulates spreading depolarization threshold in the human and rodent cortex. *Stroke* 2008;39(4):1292-1299.
231. Philp RB, Gowdey CW. Platelets as an etiological factor in experimental decompression sickness. *J Occup Med* 1969;11(5):257-258.
232. Piche T, Dainese R. Tests respiratoires à l'hydrogène. In: EMC. Paris: Elsevier Masson SAS; 2011. p. 9-000-B-015.
233. Pimentel M, Chang C, Chua KS, et al. Antibiotic treatment of constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2000;59(6):1278-1285.
234. Pol B, Watelle TJJ. Mémoire sur les effets de la compression de l'air appliquée au creusement de puits à houille. *Ann d'hygiène publique et de médecine légale* 1854;I:241-279.
235. Pollard GW, Marsh PL, Fife CE, et al. Ascent rate, post-dive exercise, and decompression sickness in the rat. *Undersea Hyperb Med* 1995;22(4):367-376.

236. Pontier JM, Blatteau JE, Vallee N. Blood platelet count and severity of decompression sickness in rats after a provocative dive. *Aviat Space Environ Med* 2008;79(8):761-764.
237. Potter T, Ellis C, Levitt M. Activated charcoal: in vivo and in vitro studies of effect on gas formation. *Gastroenterology* 1985;88(3):620-624.
238. Powell MR, Waligora J, Norfleet W, et al. Project Argo : gas phase formation in simulated microgravity: NASA Technical Report DRAFT; 1992.
239. Powell MR. Exercise and physical fitness decrease gas phase formation during hypobaric decompression. *Undersea Biomed Res* 1991;18(suppl.):61.
240. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002;217(2):133-139.
241. Rabot S. Axe intestin-cerveau: comment le microbiote intestinal influence la réponse au stress. *Bull Acad Vét* 2015;168(3).
242. Rao SS, Edwards CA, Austen CJ, et al. Impaired colonic fermentation of carbohydrate after ampicillin. *Gastroenterology* 1988;94(4):928-932.
243. Rao SS. Belching, bloating, and flatulence. How to help patients who have troublesome abdominal gas. *Postgrad Med* 1997;101(4):263-269, 275-268.
244. Richardson A, Delbridge AT, Brown NJ, et al. Short chain fatty acids in the terminal ileum accelerate stomach to caecum transit time in the rat. *Gut* 1991;32(3):266-269.
245. Rizkalla SW, Luo J, Kabir M, et al. Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *Am J Clin Nutr* 2000;72(6):1474-1479.
246. Rosso C, Hevia-Montiel N, Deltour S, et al. Prediction of infarct growth based on apparent diffusion coefficients: penumbral assessment without intravenous contrast material. *Radiology* 2009;250(1):184-192.
247. Rudge FW. Relationship of menstrual history to altitude chamber decompression sickness. *Aviat Space Environ Med* 1990;61(7):657-659.
248. Rumessen JJ, Gudmand-Hoyer E. Functional bowel disease: malabsorption and abdominal distress after ingestion of fructose, sorbitol, and fructose-sorbitol mixtures. *Gastroenterology* 1988;95(3):694-700.
249. Rumessen JJ, Nordgaard-Andersen I, Gudmand-Hoyer E. Carbohydrate malabsorption: quantification by methane and hydrogen breath tests. *Scand J Gastroenterol* 1994;29(9):826-832.
250. Sahota SS, Bramley PM, Menzies IS. The fermentation of lactulose by colonic bacteria. *J Gen Microbiol* 1982;128(2):319-325

251. Sawatzky KD. The relationship between intravascular Doppler-detected gas bubbles and decompression sickness after bounce diving in humans [MSc thesis]. Toronto: York University; 1991.
252. Scaldaferrri F, Nardone O, Lopetuso LR, et al. Intestinal gas production and gastrointestinal symptoms: from pathogenesis to clinical implication. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17 Suppl 2:2-10.
253. Schellart NA, van Rees Vellinga TP, van Hulst RA. Body fat does not affect venous bubble formation after air dives of moderate severity: theory and experiment. *J Appl Physiol* (1985) 2013;114(5):602-610.
254. Scheppach W, Fabian C, Ahrens F, et al. Effect of starch malabsorption on colonic function and metabolism in humans. *Gastroenterology* 1988;95(6):1549-1555.
255. Schibli RA, Buhlmann AA. The influence of physical work upon decompression time after simulated oxy-helium dives. *Helv Med Acta* 1972;36(4):327-342.
256. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2 Suppl):361S-364S.
257. Schulze JD, Waddington WA, Eli PJ, et al. Concentration-dependent effects of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit and drug absorption. *Pharm Res* 2003;20(12):1984-1988.
258. Schwartz-Bloom RD, Sah R. gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem* 2001;77(2):353-371.
259. Sen S, Mullan MM, Parker TJ, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2002;47(11):2615-2620.
260. Seo JH, Miyamoto N, Hayakawa K, et al. Oligodendrocyte precursors induce early blood-brain barrier opening after white matter injury. *J Clin Invest* 2013;123(2):782-786.
261. Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Impaired transit and tolerance of intestinal gas in the irritable bowel syndrome. *Gut* 2001;48(1):14-19.
262. Shah ED, Basseri RJ, Chong K, et al. Abnormal breath testing in IBS: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2010;55(9):2441-2449.
263. Sharara AI, Aoun E, Abdul-Baki H, et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial of rifaximin in patients with abdominal bloating and flatulence. *Am J Gastroenterol* 2006;101(2):326-333.
264. Sharara AI, Aoun E, Abdul-Baki H, et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial of rifaximin in patients with abdominal bloating and flatulence. *Am J Gastroenterol* 2006;101(2):326-333.

265. Shen Z, Jiang L, Yuan Y, et al. Inhibition of G protein-coupled receptor 81 (GPR81) protects against ischemic brain injury. *CNS Neurosci Ther* 2015;21(3):271-279.
266. Staniforth DH. Effect of drugs on oro-caecal transit time assessed by the lactulose/breath hydrogen method. *Eur J Clin Pharmacol* 1987;33(1):55-58.
267. Steggerda FR, Dimmick JF. Effects of bean diets on concentration of carbon dioxide in flatus. *Am J Clin Nutr* 1966;19(2):120-124.
268. Steggerda FR. Gastrointestinal gas following food consumption. *Ann N Y Acad Sci* 1968;150(1):57-66.
269. Steidler L, Hans W, Schotte L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289(5483):1352-1355.
270. Stephen AM, Cummings JH. Mechanism of action of dietary fibre in the human colon. *Nature* 1980;284(5753):283-284.
271. Stone-Dorshow T, Levitt MD. Gaseous response to ingestion of a poorly absorbed fructo-oligosaccharide sweetener. *Am J Clin Nutr* 1987;46(1):61-65.
272. Strbian D, Durukan A, Pitkonen M, et al. The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 2008;153(1):175-181.
273. Strocchi A, Furne J, Ellis C, et al. Methanogens outcompete sulphate reducing bacteria for H₂ in the human colon. *Gut* 1994;35(8):1098-1101.
274. Strocchi A, Levitt MD. Factors affecting hydrogen production and consumption by human fecal flora. The critical roles of hydrogen tension and methanogenesis. *J Clin Invest* 1992;89(4):1304-1311.
275. Strocchi A, Levitt MD. Intestinal gas. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, editors. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology/diagnosis/management* 6th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1998. p. 153-160.
276. Strocchi A, Levitt MD. Intestinal gas. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, editors. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology/diagnosis/management* 6th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1998. p. 153-160.
277. Strohl KP, Thomas AJ, St Jean P, et al. Ventilation and metabolism among rat strains. *J Appl Physiol* 1997;82(1):317-323.
278. Strong AJ, Anderson PJ, Watts HR, et al. Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex. *Brain* 2007;130(Pt 4):995-1008.

279. Suarez F, Furne J, Springfield J, et al. Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):G1028-1033.
280. Suarez F, Furne J, Springfield J, et al. Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):G1028-1033.
281. Suarez FL, Savaiano DA, Levitt MD. A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose-hydrolyzed milk by people with self-reported severe lactose intolerance. *N Engl J Med* 1995;333(1):1-4.
282. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 2004;558(Pt 1):263-275.
283. Sun J, Ling Z, Wang F, et al. Clostridium butyricum pretreatment attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice via anti-oxidation and anti-apoptosis. *Neurosci Lett* 2016;613:30-35.
284. Sun J, Wang F, Li H, et al. Neuroprotective Effect of Sodium Butyrate against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Biomed Res Int* 2015;2015:395895.
285. Szilagy A. Review article: lactose--a potential prebiotic. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(9):1591-1602.
286. Tadesse K, Smith D, Eastwood MA. Breath hydrogen (H₂) and methane (CH₄) excretion patterns in normal man and in clinical practice. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1980;65(2):85-97.
287. Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, et al. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke* 2009;40(3 Suppl):S8-12.
288. Takeuchi S, Nagatani K, Otani N, et al. Hydrogen improves neurological function through attenuation of blood-brain barrier disruption in spontaneously hypertensive stroke-prone rats. *BMC Neurosci* 2015;16:22.
289. Taylor RH, Barker HM, Bowey EA, et al. Regulation of the absorption of dietary carbohydrate in man by two new glycosidase inhibitors. *Gut* 1986;27(12):1471-1478.
290. Tomlin J, Lewis C, Read NW. Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. *Gut* 1991;32(6):665-669.
291. Trakhtenberg EF, Goldberg JL. Immunology. Neuroimmune communication. *Science* 2011;334(6052):47-48.
292. Triantafyllou K, Sioulas AD, Giamarellos-Bourboulis EJ. Rifaximin: The Revolutionary Antibiotic Approach for Irritable Bowel Syndrome. *Mini Rev Med Chem* 2015;16(3):186-192.

293. Triantafyllou K, Sioulas AD, Giamarellos-Bourboulis EJ. Rifaximin: The Revolutionary Antibiotic Approach for Irritable Bowel Syndrome. *Mini Rev Med Chem* 2015;16(3):186-192.
294. Triger J. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences*. 1845;XX:445-449.
295. Underhill DM. Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 2003;33(7):1767-1775.
296. Urita Y, Hike K, Torii N, et al. Hydrogen breath test as an indicator of the quality of colonic preparation for colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 2003;57(2):174-177.
297. Van der Aue OE, Brinton ES, Kellar RS. Surface decompression: derivation and testing of decompression tables with safety limits for certain depths and exposures. NEDU Report. Panama City, Florida: US Navy Experimental Unit; 1945.
298. Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, et al. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br J Nutr* 1999;81(2):121-132.
299. Vann RD, Dovenbarger J, Bond J. Decompression sickness and diver carried computers: The Diver's Alert Network Perspective. In: Lang MA, Hamilton RW, editors. *Proceedings of the AAUS Workshop on Diver Carried Decompression Computers*; 1989; Costa Mesa, California: American Academy of Underwater Sciences; 1989. p. 133-143.
300. Vann RD, Gerth WA, Denoble PJ. A comparison of recent flying after diving experiments with published flying after guidelines. *Undersea Hyperb Med* 1996;23(suppl.):36.
301. Vann RD, Gerth WA, Denoble PJ. DCS and flying after diving. *Undersea Hyperb Med* 1995;22(suppl.):34.
302. Vann RD. Decompression theory and applications. In: Bennett PB, Elliott DH, editors. *The physiology and medicine of diving and compressed air work*. 3ème ed. San Pedro, California: Best Publishers; 1982. p. 352-382.
303. Vassart G, Costagliola S. G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7(6):362-372.
304. Venutolo F, Corriol JH, Grandjean B, et al. Accidents de plongée subaquatique. In: EMC. Paris: Elsevier Masson SAS; 2007.
305. Vernia P, Camillo MD, Marinaro V, et al. Effect of predominant methanogenic flora on the outcome of lactose breath test in irritable bowel syndrome patients. *Eur J Clin Nutr* 2003;57(9):1116-1119.
306. Vesa TH, Seppo LM, Marteau PR, et al. Role of irritable bowel syndrome in subjective lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1998;67(4):710-715.

307. von Euler M, Akesson E, Samuelsson EB, et al. Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 1996;137(2):242-254.
308. Wagner JR, Carson JF, Becker R, et al. Comparative flatulence activity of beans and bean fractions for man and the rat. *J Nutr* 1977;107(4):680-689.
309. Waite CL, Mazzone WF, Greenwood ME, et al. Cerebral air embolism. I. Basic Studies. Groton, Conn: US Nav Sub Med Center; 1967.
310. Ward CA, McCullough D, Fraser WD. Relation between complement activation and susceptibility to decompression sickness. *J Appl Physiol* 1987;62(3):1160-1166.
311. Ward CA, McCullough D, Fraser WD. Relation between complement activation and susceptibility to decompression sickness. *J Appl Physiol* 1987;62(3):1160-1166.
312. Weathersby PK, Homer LD. Solubility of inert gases in biological fluids and tissues: a review. *Undersea Biomed Res* 1980;7(4):277-296.
313. Weathersby PK, Survanshi SS, Nishi RY. Relative decompression risk of dry and wet chamber air dives. *Undersea Biomed Res* 1990;17:333-352.
314. Weaver GA, Krause JA, Miller TL, et al. Incidence of methanogenic bacteria in a sigmoidoscopy population: an association of methanogenic bacteria and diverticulosis. *Gut* 1986;27(6):698-704.
315. Webb JT, Pilmanis AA, Krause KM. Gender and altitude-induced decompression sickness susceptibility. In: *From the past to the future; 70th Anniversary Annual Scientific Meeting, Aerospace Medical Association; 1999; Detroit: Aerospace Medical Association; 1999.*
316. Wei R, Zhang R, Xie Y, et al. Hydrogen Suppresses Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cell Death in Hippocampal Neurons Through Reducing Oxidative Stress. *Cell Physiol Biochem* 2015;36(2):585-598.
317. Wells CH, Bond TP, Guest MM, et al. Rheologic impairment of the microcirculation during decompression sickness. *Microvasc Res* 1971;3(2):162-169.
318. Williams CM, Jackson KG. Inulin and oligofructose: effects on lipid metabolism from human studies. *Br J Nutr* 2002;87 Suppl 2:S261-264.
319. Wise DA. Constitutional Factors in Decompression Sickness. *Res Rep* 2-63. *Rep US Navy Exp Diving Unit* 1963;13:1-18.
320. Wolever TM, Robb PA. Effect of guar, pectin, psyllium, soy polysaccharide, and cellulose on breath hydrogen and methane in healthy subjects. *Am J Gastroenterol* 1992;87(3):305-310.

321. Won SJ, Tang XN, Suh SW, et al. Hyperglycemia promotes tissue plasminogen activator-induced hemorrhage by Increasing superoxide production. *Ann Neurol* 2011;70(4):583-590.
322. Wursch P, Koellreutter B, Schweizer TF. Hydrogen excretion after ingestion of five different sugar alcohols and lactulose. *Eur J Clin Nutr* 1989;43(12):819-825.
323. Xing C, Arai K, Lo EH, et al. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* 2012;7(5):378-385.
324. Xing C, Arai K, Lo EH, et al. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* 2012;7(5):378-385.
325. Xing C, Arai K, Lo EH, et al. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* 2012;7(5):378-385.
326. Yamani N, Mano Y, M. S. Driving to altitude after diving and decompression sickness. *Undersea Hyperb Med* 2000;27(suppl.):51.
327. Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Vural A, et al. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med* 2009;15(9):1031-1037.
328. Yount DE, Kunkle TD, D'Arrigo JS, et al. Stabilization of gas cavitation nuclei by surface-active compounds. *Aviat Space Environ Med* 1977;48(3):185-189.
329. Zhai X, Chen X, Shi J, et al. Lactulose ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inducing hydrogen by activating Nrf2 expression. *Free Radic Biol Med* 2013;65:731-741.
330. Zhang JH, Badaut J, Tang J, et al. The vascular neural network--a new paradigm in stroke pathophysiology. *Nat Rev Neurol* 2012;8(12):711-716.
331. Zhao S, Xu W, Jiang W, et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 2010;327(5968):1000-1004.
332. Zheng Q, Durben DJ, Wolf GH, et al. Liquids at large negative pressures: water at the homogeneous nucleation limit. *Science* 1991;254:829-832.
333. Zhou XL, Kong XF, Lian GQ, et al. Dietary supplementation with soybean oligosaccharides increases short-chain fatty acids but decreases protein-derived catabolites in the intestinal luminal content of weaned Huanjiang mini-piglets. *Nutr Res* 2014;34(9):780-788.
334. Zhou XL, Kong XF, Yang XJ, et al. Soybean oligosaccharides alter colon short-chain fatty acid production and microbial population in vitro. *J Anim Sci* 2012;90 Suppl 4:37-39.

ANNEXE 1

Questionnaire d'enquête alimentaire remis aux plongeurs

Etude fermentation intestinale et accident de désaturation

Fiche de recueil d'informations :

- pour tous les accidents de désaturation neurologiques,
- pour les plongées conformes à une procédure de décompression, sans accident associé.

Date de naissance :

Poids (kg) :

Taille (cm) :

Problèmes de santé (actuels ou passés) :

Traitements :

Etes-vous sujet :

- à des flatulences (plus de 20 épisodes de flatulosités par jour) ? O / N
- à des ballonnements abdominaux ? O / N
- à des problèmes de constipation ? O / N.

Etes-vous traité ou avez-vous été traité par des laxatifs ou des antibiotiques :

- actuellement ? O / N type et posologie :
- dans les 4 dernières semaines ? O / N type et posologie :

A quelle heure avez-vous pris votre dernier repas ?

Quels aliments avez-vous consommés le jour de la plongée/consultation ? (entourer les aliments effectivement pris)

Légumineuses (flageolets, lentilles, pois chiches, soja, autres :) O / N

Choux (chou de Bruxelles, chou-fleur, chou rouge, chou blanc) O / N

Boissons hypocaloriques (avec édulcorants artificiels) O / N

Lait en grande quantité (> 5 dl à l'exclusion des produits laitiers) O / N

Fruits à noyau (pêche, abricots, prunes, autres :) ou pommes O / N

Féculents (pommes de terre, maïs, blé, pâtes, autres :) O / N

Autres fruits et légumes O / N type :

Paramètres de plongée

Profondeur max (m) :

Paliers :

Durée totale de plongée (min) :

Heure de sortie de l'eau (hh:mm)

TITRE**INFLUENCE DE LA FERMENTATION INTESTINALE SUR LE
RISQUE D'ACCIDENT DE DESATURATION**

RESUME

L'accident de désaturation (ADD) est un accident de plongée lié à la charge en gaz diluants pendant la plongée, et à la formation de bulles dans l'organisme au cours de la décompression. Il est susceptible d'engendrer des séquelles neurologiques. Au cours de plongées utilisant l'hydrogène comme gaz diluant, la diminution de la charge tissulaire en hydrogène par l'inoculation au niveau de l'intestin de bactéries métabolisant ce gaz réduit le risque d'ADD.

L'objectif de ce travail était d'évaluer si inversement : 1) la fermentation intestinale lors de la plongée peut favoriser la survenue d'un ADD, par l'intermédiaire de la production d'hydrogène endogène ; 2) la stimulation chronique de la fermentation avant plongée majeure le risque d'ADD.

Nos résultats sont en faveur d'un effet dual de la fermentation intestinale sur la décompression. Délétère à court terme lors de la plongée, la fermentation intestinale prolongée pourrait être favorable en dehors de la plongée en prévenant la survenue et la sévérité d'un ADD. L'hydrogène, molécule aux propriétés antioxydantes, et le butyrate, un acide gras à chaîne courte, sont en effet deux produits de la fermentation des hydrates de carbone qui ont des vertus neuroprotectrices.

La prévention des accidents de désaturation pourrait passer par une exclusion des plongeurs présentant une fermentation importante le jour de la plongée, une élimination des gaz produits au niveau de l'intestin ou une modification de l'alimentation dans les 24 heures précédant une plongée. En revanche, tous les facteurs susceptibles de modifier le microbiote intestinal et d'augmenter la fermentation, en dehors de la plongée, pourraient être testés en prévention de l'ADD. En outre, l'hydrogène et le butyrate pourraient jouer un rôle bénéfique dans le cadre du traitement de l'ADD.

MOTS-CLES : accident de désaturation, microbiote intestinal, fermentation, transit intestinal, hydrogène, butyrate.

**SPECIALITE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE, BIOLOGIE,
SANTÉ**

**EQUIPE RESIDENTE DE RECHERCHE SUBAQUATIQUE
OPERATIONNELLE****INSTITUT DE RECHERCHE BIOMEDICALE DES ARMEES****BP 600****83800 TOULON CEDEX 9**