



Régulation de la perméabilité intestinale au cours du syndrome de l'intestin irritable: rôle du système ubiquitine-protéasome et impact de l'obésité

Wafa Bahlouli

► To cite this version:

Wafa Bahlouli. Régulation de la perméabilité intestinale au cours du syndrome de l'intestin irritable: rôle du système ubiquitine-protéasome et impact de l'obésité. Sciences agricoles. Normandie Université, 2019. Français. NNT: 2019NORMR047 . tel-03353307

HAL Id: tel-03353307

<https://theses.hal.science/tel-03353307>

Submitted on 24 Sep 2021

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.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Préparée au sein de « L'université de Rouen Normandie »

Régulation de la perméabilité intestinale au cours du syndrome de l'intestin irritable : rôle du protéasome et impact de l'obésité.

**Présentée et soutenue par
Wafa BAHLOULI**

**Thèse soutenue publiquement le 23 Septembre 2019
devant le jury composé de**

Mme Hélène EUTAMENE	PR (Université Toulouse-III)	Rapporteur
Mr Didier QUILLIOT	PU-PH (Université Nancy-I)	Rapporteur
Mme Véronique DOUARD	CR (INRA - AgroParisTech, UMR 1319 MICALIS)	Examineur
Mr Pierre DECHELOTTE	PU-PH (Université de Rouen Normandie)	Examineur
Mr Moïse COEFFIER	MCU-PH (Université de Rouen Normandie)	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Moïse COEFFIER, UMR-1073 INSERM / ADEN : Nutrition, Inflammation et Dysfonction de l'Axe Intestin-Cerveau - Université de Rouen Normandie

“ La liberté commence où l’ignorance finit ”

Victor Hugo

REMERCIEMENTS



“Projet cofinancé par l’Union Européenne et la Région Normandie.
L’Europe s’engage en Normandie avec les Fonds Européens de
Développement Régional (FEDER)”



Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères au professeur Pierre Déchelotte de m’avoir accueilli dans son unité de recherche et fait confiance. Je vous remercie pour votre tolérance, ouverture d’esprit et surtout pour votre humanité. J’estime que l’unité de recherche INSERM-UMR 1073 est très chanceuse de vous avoir comme directeur.

Je remercie du fond du cœur mon directeur de thèse Moïse Coëffier de m’avoir fait confiance lors de notre première entrevue pour le stage de master 1 et pour m’avoir donné ma chance dans le monde de la recherche. Je n’ai pas eu d’autres encadrants depuis que je suis en France, mais je peux me permettre de dire que tu es le meilleur « Chef » et je pense que des personnes comme toi, aussi bien vaillantes, se font rares aujourd’hui. Ton humour (l’exemple du CHAMEAU qui illustre toutes les expressions françaises difficiles pour moi), ta sympathie et ton humanité m’ont encouragé à continuer avec toi en thèse. Au-delà des qualités humaines, tes qualités scientifiques, ta rigueur et tes connaissances dans le milieu de la recherche sont impressionnantes et je te souhaite encore plus d’évolution dans ta carrière professionnelle. Sache que je n’oublierai jamais ton soutien et tes encouragements quand je déprimais durant ma thèse. Grâce à toi, à ta présence j’ai pu réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier Madame Hélène Eutamène, Madame Véronique Douard et Monsieur Didier Quilliot de me faire l’honneur d’évaluer et juger mon travail. Merci à vous d’avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier les membres du jury de mon comité de suivi individuel, Madame Marie-Pascale Prud’homme, Monsieur François Blachier et Monsieur Laurent Ferrier et mon cher ami Ibrahima qui m’ont accompagné durant ma formation de thèse et qui m’ont été de bons conseils.

Mes chères Sylvie et Sabine, le cœur qui fait vivre notre unité de recherche. Vous êtes à la hauteur. Votre bonne humeur votre gentillesse et bienveillance font de vous des personnes exceptionnelles. Je vous aime énormément.

Rachelle, je te remercie pour ta bonne humeur pour tes conseils pour m’avoir toujours encouragé et fait des compliments à la fin des présentations orales, toujours là pour me tirer vers le haut. Je te remercie vraiment.

David, Je te remercie de nous avoir transmis ta passion pour la microbiologie mais j'attends toujours les recettes culinaires. Je m'estime heureuse d'avoir croisé un grand chercheur que vous êtes dans mon parcours doctoral.

Liliana, ma chère Liliana, toujours si gentille si tendre, je peux te dire que ton départ du labo je l'ai vraiment senti tu m'avais manqué énormément mais je souhaite que tu puisses t'épanouir dans ce que tu fais loin de la pression et du stress et que tu puisses profiter avec ta petite famille.

Alexis, je te remercie pour le beau travail que tu as réalisé et dans lequel j'ai participé. Bonne continuation dans le monde de la recherche.

Christine, je te remercie pour ton aide précieuse quand j'ai eu besoin de toi, et même pour tes réflexions directes parfois qui font rire tellement inattendu ! Tu es une personne qui a le sens de responsabilité et un bon cœur. Merci pour tout.

Charlène, je te remercie pour tous les bons conseils que tu m'as donnés pour me réconforter, ta maturité et ton ouverture d'esprit. Je te souhaite une vie heureuse avec ta petite famille.

Je tiens à remercier Romain pour son aide dans mes débuts dans le laboratoire, tu m'as fait aimer l'expérimentation animale même si ce n'est plus le cas aujourd'hui ! Merci pour votre humour toi et Nicolas, un peu spécial pour ne pas dire raciste car c'est loin d'être le cas.

Jonathan, Séverine, je vous remercie pour votre patience et votre aide dans la rédaction des mails et surtout les bonnes « expressions de politesse » qu'il faut employer. Je te remercie Jonathan de transmettre ton savoir-faire dans la recherche avec pédagogie et gentillesse.

Manon et Marie mes chères, je ne pourrai vous dire à quel point j'admire votre courage et maturité. Je vous adore. Merci pour votre gentillesse et votre générosité.

Karim, merci pour ta gentillesse ton aide si précieuse dans ma vie professionnelle et personnelle. Je te souhaite une vie heureuse avec ta petite famille.

Maximilien, merci pour tous les bons moments passés avec toi, tu es une personne avec qui on ne s'ennuie jamais. Merci pour ta modestie, ta sympathie et garde toujours ta joie de vivre.

Fabien, j'ai bien galéré pour le Zotero ! je te remercie pour ton aide et promis je te mangerai plus tes « speculoos ».

Clément, Emmeline, Marine et Pauline dotés d'une culture générale qui me fascine, je trouve la discussion avec vous agréable et enrichissante. Merci à vous.

Je tiens à remercier Mauranne pour son aide, tu es venu en stage de master 2 et grâce à toi j'ai pu me libérer pour rédiger ma thèse. Je te souhaite de réussir dans la voie que tu as choisie.

Merci à tous les master 1, master 2 et toutes les personnes que j'ai croisé à l'U-1073 : Zoé, Floriane, Colin, Robin, Arthur, Mathilde L, Mathilde P, Charlotte, Gaëlle, Annabelle, Alexandre, Andrzej, Alice, Camille, Chloé, Justine, Paul, Mathieu, Ludovic, Caroline, Naouel.

Je tiens à remercier Mouna pour ses encouragements lors du concours de thèse. Grâce à toi j'ai repris confiance en moi et j'ai su défendre ma place. J'ai aussi pris des kilos avec tout ce que tu me faisais à manger « lahrissa tunisienne » oulààà ça pique. Merci à toi Mouna

Je remercie également Ibtissem pour tous les bons moments passés dans le laboratoire et en dehors de celui-ci, des moments partagés avec Saida et Najate. Je tiens à te remercier Najate de nous avoir invité et bien accueilli chez toi malgré le peu de temps libre dont tu disposes. Imène, une belle rencontre ! merci à toi pour m'avoir accompagnée lors des doctoriales mais aussi dans la découverte de la jolie ville d'Amsterdam, des moments inoubliables.

Chaïma, tu es une bouffée d'air frais, arrivée au bon moment. J'espère que tu garderas ta bonne humeur et ton rire si agréable à entendre toute ta vie. Tes petites attentions et ta gentillesse font de toi une personne exceptionnelle. Je t'adore « Chaïmoum ».

Sabine, je te remercie pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble depuis notre arrivée en France. Quand on se retrouve, on parle, on rigole on s'arrête plus, que de la bonne humeur. Merci pour tes encouragements et de trouver toujours des solutions. Je t'aime fort babyyyy

Sameh, ma copine laa3iza, tellement fusionnelles. Je n'oublierai jamais ton soutien jamais. Même la distance n'a rien changé en notre amitié. Entre nous ce sont des actes qui expriment la sincérité de notre amitié. Je t'aime très fort et te souhaite du bonheur dans ta vie avec Ghaith.

Asma ma chérie, je n'oublierai pas nos bons moments, ni nos faux-rire avec Karim « ah non je ne peux pas j'ai un train à prendre ». La SNCF. Tes parents tes sœurs m'ont chéri comme si j'étais de la famille, ils ont même organisé mon premier anniversaire en famille ici en France. Je les aime beaucoup et toi encore plus. Merci pour ton amour pour ton soutien indéfectible dans ma vie professionnelle mais aussi personnelle, je ne saurai comment te rendre tout ça. Je t'aime énormément et tu comptes beaucoup pour moi « Assouma ».

Oumayma, je t'adore tu as toujours été là pour moi, toujours à trouver les solutions même quand il n'y a pas, la « positive attitude ». Je ne te remercierai jamais assez, jusqu'au bout avec moi dans toutes mes démarches « ma cousine te3 bessif love you »

Mama, après la perte de mon père tu as été les deux parents pour nous, six filles à éduquer toute seule, pas facile dans une communauté comme la nôtre. Tu as su surmonter les difficultés et tu as réussi ta mission Mama. Tu es une brave femme, mon exemple. Que dieu te préserve pour nous en bonne santé. Merci pour ton soutien indéfectible qui m'a porté jusqu'ici. Merci Mama je t'aime très très fort.

Mes sœurs, Sarah, Hassiba, Lilia, Souhila, vous êtes pour moi les êtres les plus chers au monde. Dans deux continents différents mais vous avez toujours été là pour moi, à l'écoute à m'encourager à m'aimer sans cesse. Je vous aime énormément, vous êtes dans mon cœur. Merci à mes beaux frères Adlen, Badro, Hassen, Mehdi et Marian.

Daya, ma chère sœur et confidente, je t'écis avec beaucoup d'émotions. Tu as fait beaucoup de sacrifices pour nous, énormément, depuis ton plus jeune âge. Dieu t'a récompensé et t'a donné un mari exceptionnel et des enfants magnifiques. Si je suis là aujourd'hui, sache que c'est grâce à toi. Je t'aime très très fort Daya et je souhaite le jour où tu verras tes enfants réussir leur vie et te rendre fière d'eux. Merci à toi Adlen pour ton soutien, tes conseils et tous tes encouragements.

Nizar, Sara, mes neveux adorés, petits vous n'arrêtez pas de me poser des questions sur mon travail, je ne savais pas comment vous l'expliquer et rester prudente à la fois. Vous aurez enfin une réponse dans quelques années en lisant le résumé de ma thèse. Et je ne vous ai pas menti je vous ai protégé. Je vous aime énormément mes chers neveux.

Papa, mon cher Papa, tu as quitté ce monde très tôt, tu nous as laissé toutes jeunes. Petite, j'avais besoin de toi, 17 ans après et j'ai toujours besoin de toi. J'aurai tellement aimé que tu nous regarde réussir dans notre vie, que tu sois présent pour ma thèse que je puisse te rendre fière, toi qui aimais les études. Me voilà aujourd'hui au bout du chemin. Je te dédie tout mon travail à toi mon cher. Je t'aime énormément Papa. Allah yerrahmek.

Enfin, merci à Dieu de m'avoir donné la patience et la force de surmonter les difficultés que j'ai dû affronter tout au long de ces années. « Hamdoullah »

Table des matières

TABLES DES FIGURES ET TABLEAUX	7
ABREVIATIONS.....	8
PREAMBULE	12
INTRODUCTION	16
I. BARRIERE INTESTINALE :	16
1. Généralité sur l'appareil digestif :	16
2. L'épithélium gastro-intestinal :	17
3. La barrière épithéliale intestinale :.....	18
4. Les protéines de jonctions serrées :.....	24
A. <i>Zonula Occludens</i> (ZO).....	24
B. Occludine	24
C. Claudines	26
5. Evaluation de la perméabilité intestinale :.....	28
A. <i>In vitro</i> :.....	28
B. <i>Ex vivo</i> :.....	29
C. <i>In vivo</i> :	30
D. <i>In situ</i> :.....	32
6. Facteurs impliqués dans la modification de la perméabilité intestinale :.....	32
A. Inflammation intestinale et perméabilité intestinale :	32
B. Microbiote intestinal et perméabilité intestinale :	34
C. Obésité et perméabilité intestinale :	37
D. Stress et perméabilité intestinale :.....	38
E. Les micro-ARN (miR) et perméabilité intestinale :.....	39
F. Le protéasome « ubiquitination » :.....	40
II. MALADIES ASSOCIEES AU DYSFONCTIONNEMENT DE LA BARRIERE INTESTINALE :....	47
1. Le syndrome de l'intestin irritable :	47
A. Définition et épidémiologie :.....	47
B. Physiopathologie du SII :	49
2. L'obésité :	61
A. Définition et épidémiologie :.....	61
B. Physiopathologie intestinale de l'obésité :	62
III. MODELES ANIMAUX :	68
1. Modèles animaux utilisés dans l'étude du SII :	68
A. Le modèle post-inflammatoire (SII-PI) ou post-TNBS :.....	68

B. Le modèle de stress dû à l'évitement de l'eau (Water-Avoidance stress (WAS)) :	70
2. Modèles animaux utilisés dans l'étude de l'obésité :	72
A. Les modèles monogéniques :	74
B. Les modèles environnementaux :	75
OBJECTIF DE L'ETUDE	77
RESULTATS	80
I. ARTICLE 1.....	80
II. ARTICLE 2.....	94
III. MANUSCRIT 1.....	111
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	144
REFERENCES	156
ANNEXES	182

TABLES DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 : Les différentes couches de la paroi digestive de l'intestin grêle. **P17**

Figure 2 : Schéma représentatif des différents compartiments de la barrière intestinale. **P21**

Figure 3 : Vue d'ensemble des complexes jonctionnels épithéliaux intestinaux. **P23**

Figure 4 : Représentation schématique des protéines de jonctions serrées et de leur localisation. **P25**

Figure 5 : Composition et concentrations lumineales des espèces microbiennes dominantes dans diverses régions du TGI. **P35**

Figure 6 : Vue d'ensemble du système ubiquitine-protéasome. **P42**

Figure 7 : Mise en place des sous-unités inductibles de l'immunoprotéasome en présence de TNF- α et d'IFN- γ . **P44**

TABLEAUX

Tableau 1 : Classification fonctionnelle de la famille des protéines Claudines et de leur schéma d'expression spécifique dans l'intestin. **P27**

Tableau 2 : Critères de diagnostic du SII (ROME IV). **P48**

Tableau 3 : La classification des différents types d'obésité suivant l'IMC. **P61**

Tableau 4 : Les modèles SII-Like. **P69**

ABBREVIATIONS

AGCC :	Acides Gras à Chaîne Courte
AgRP :	Agouti-Related Protein
AMP :	Adenosine MonoPhosphate
ARC :	Noyaux arqué
ARNm :	ARN messagers
BSFS :	Bristol Stool Form Scale
BTZ :	BorTéZomib
CAF :	CAFétéria diet
CART :	Andamphetamine Related Transcript
CD8 $\alpha\beta$:	Cluster de Différenciation
CEI :	Cellules Epithéliales Intestinales
CMH-I :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CPA :	Cellules Présentatrices d'Antigène
CRF :	Corticotropin-Releasing Factor
DA :	Dermatite Atopique
DIO :	Diet-Induced Obesity
E :	Enzyme
ERK:	Extracellular signal Regulated Kinase
FDA:	Food and Drug Association
GABA :	Gamma-AminoButyric Acid
GLP-2 :	Glucagon-Like Peptide-2
H3K9 :	Methylation de l'histone H3 en lysine 9
HDAC :	Histone DésACétylase
HFD :	High Fat Diet
HPA :	Hypothalamic–Pituitary–Adrenal axis
ICC :	Interstitial Cells of <i>Cajal</i>
IFN- γ :	InterFéroN- γ
IgAs :	Immunoglobuline A sécrétoire

IGF1 :	Insulin-like Growth Factor-1
IGFBP3 :	Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3
IL :	InterLeukine
IMC :	Indice de Masse Corporel
JA :	Jonctions Adhérentes
JAM-A :	Junctional Adhesion Molecule-A
JS :	Jonctions Serrées
LBP :	Lipopolysaccharide-Binding Protein
LC :	Locus Coeruleus
LFD :	Low-Fat Diet
LMP2 :	Large Multifunctional Protease 2
LMP7 :	Large Multifunctional Protease 7
LPS :	Lypopolysaccharides
MC3R :	MelanoCortin 3 Receptor
MCP-1 :	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MECL1 :	Multicatalytic Endopeptidase Complex subunit 1
MICI :	Maladies Inflammatoire Chroniques Intestinales
miR :	micro-ARN
MLC :	Myosin Light Chain
MLCK :	Myosin Light-Chain Kinase
MUC2 :	Mucin 2
Mv :	Microvillosités
NF-kB :	Nuclear Factor-kappa B
NK :	Naturel Killer
NLRP6 :	Nod Like Receptor family Pyrin domain contaning 6
NOD :	Nucleotide Oligomerization Domain
NOX :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate OXydase
NPY :	NeuroPeptide Y
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé

PAF :	Platelet-Activating Factor
PAR :	Protease-Activated Receptors
PE-2 :	Prostaglandine E2
PEG :	PolyEthylèneGlycols
POMC :	ProOpioMélanoCortine
PPAR :	Peroxisome Proliferator–Activated Receptor
PVN :	ParaVentricular Nucleus
SIBO :	Small Intestinal Bacterial Overgrowth
SII :	Syndrome de l’Intestin Irritable
SII-C :	SII avec constipation prédominante
SII-D :	SII avec diarrhée prédominante
SII-M :	SII avec alternance de diarrhée et constipation (mixte)
SII-PI :	SII post-infectieux ou appelé aussi SII post-inflammatoire
SNA :	Système Nerveux Autonome
SNC :	Système Nerveux Central
SNE :	Système Nerveux Entérique
SNP :	Système Nerveux Parasymphatique
SNS :	Système Nerveux Sympathique
TEER :	TransEpithelial Electrical Resistance
TEM :	Microscope Electronique à Transmission
TFI :	Troubles Fonctionnels Intestinaux
TGF- β :	Transforming Growth Factor-beta
TGI :	Tractus Gastro-Intestinal
TLR :	Toll-Like Receptor
TNBS :	TriNitroBenzene Sulfonique acid
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor- alpha
Treg :	Lymphocytes T régulateurs
TRPV1 :	Transient Receptor Potential Vanilloide 1
Ub :	Uubiquitine

VH :	Visceral Hypersensitivity
WAS :	Water-Avoidance Stress
ZO :	<i>Zonula Occludens</i>
α -MSH :	Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone

PREAMBULE

L'intestin constitue un organe vital, doté de fonctions majeures d'absorption des nutriments essentiels pour l'organisme, tout en étant une véritable barrière à la fois chimique et physique, contre de potentielles agressions de l'environnement luminal.

Plusieurs études suggèrent un défaut dans cette barrière comme facteur commun dans l'apparition de diverses maladies digestives, locales et systémiques de nature inflammatoire, auto-immune, métabolique ou fonctionnelle. Le syndrome de l'intestin irritable (SII) a fait l'objet de plusieurs études sur l'hyperperméabilité intestinale. Une maladie caractérisée par une physiopathologie multifactorielle impliquant une hypersensibilité viscérale, un dysfonctionnement de l'axe intestin-cerveau, des altérations immunitaires ainsi qu'une dysbiose intestinale. Ces troubles ont également été impliqués dans la physiopathologie de l'obésité, qui a longtemps été associée à la génétique aux habitudes alimentaires et à la sédentarité. L'intestin pourrait donc être à l'origine de l'obésité et serait impliqué dans les complications métaboliques qui en résultent.

Récemment, un lien étroit a été suggéré entre l'obésité et le SII. En effet, la prévalence du SII est fortement augmentée chez les patients ayant une obésité massive. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans cette association ne sont pas encore clairs et restent donc à élucider. Fait intéressant, une rupture de la barrière intestinale a été rapportée au cours du SII et de l'obésité, caractérisée par une diminution de l'expression des protéines de JS et par conséquent une hyperperméabilité intestinale. L'expression de ces protéines pourrait être influencée par différents acteurs tels que le microbiote et le système immunitaire intestinal mais pourrait également être régulée par le protéasome.

Le protéasome est une machinerie protéolytique majeure impliquée dans la régulation de diverses fonctions telle que le cycle cellulaire, l'apoptose et la réponse inflammatoire. Cette composante a été une cible thérapeutique dans plusieurs maladies tels que les MICI, utilisant des inhibiteurs spécifiques aux activités protéolytiques du protéasome. L'utilisation de ces inhibiteurs pharmacologiques avait engendré des effets secondaires importants, ce qui laisse penser au développement d'inhibiteurs pharmacologiques « tissu-spécifique ».

De plus, il a été montré une interaction significative entre les nutriments, le métabolisme protéique et la fonction de barrière intestinale. En effet, les interventions nutritionnelles par les probiotiques, les vitamines, les acides gras ou encore les acides aminés, sont aujourd'hui favorisées afin de prévenir l'hyperperméabilité intestinale. Dans la première partie de ce manuscrit, nous décrirons brièvement l'appareil digestif, la fonction de barrière intestinale, les différentes techniques d'évaluation de la perméabilité intestinale puis les acteurs régulant la perméabilité intestinale. Nous entamerons ensuite successivement la physiopathologie intestinale du SII et de l'obésité et enfin nous terminerons cette partie bibliographique par la description des modèles animaux dit « SII-Like » ainsi que divers modèles d'obésité.

Dans la deuxième partie de ce manuscrit, nous décrirons les résultats obtenus sur nos projets de recherche, sous la forme de trois articles scientifiques :

Dans la première étude, l'objectif était de valider les modèles WAS et post-TNBS dit « SII-Like », qui miment plusieurs symptômes retrouvés chez les patients SII. Ensuite, étudier l'impact d'une inhibition du protéasome dans ces deux modèles SII-Like.

Dans la deuxième étude, le but était d'abord de valider l'implication du protéasome dans la physiopathologie du SII chez l'Homme et l'animal et de mieux comprendre les voies impliquées par une étude protéomique.

Une association significative entre le SII et l'obésité a été décrite par plusieurs études. Notre objectif dans ce troisième et dernier travail était donc de rechercher les mécanismes impliqués dans ce lien entre l'obésité et le SII *via* deux modèles d'obésité (génétique et induite par l'alimentation) en réponse au stress.

Enfin, dans la dernière partie de ce manuscrit, les résultats seront synthétisés et discutés, afin de mettre en lumière des perspectives pour de futurs projets dans le laboratoire.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. BARRIERE INTESTINALE :

1. Généralité sur l'appareil digestif :

L'appareil digestif constitue un organe vital, permettant de subvenir aux besoins énergétiques indispensables au bon fonctionnement des cellules de l'organisme. Il comprend le tractus gastro-intestinal (TGI) ainsi que les glandes et organes annexes nécessaires à la digestion, tels que les glandes salivaires, le pancréas, le foie et la vésicule biliaire. Le TGI forme un long tube d'environ 8m de longueur chez l'homme. Ininterrompu, Il s'étend de la cavité buccale à l'anus comprenant le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon), et le gros intestin (cæcum et appendice, colon ascendant, colon transverse ; colon descendant, colon sigmoïde et rectum). Il permet le transit des aliments ingérés dans la lumière intestinale ainsi que leur digestion (par des phénomènes chimiques, enzymatiques et mécaniques) tout au long du TGI. De ce fait, son rôle majeur est d'absorber les nutriments dont l'organisme a besoin (glucides, lipides, protéines, minéraux et vitamines), l'eau et les électrolytes apportés par les aliments ingérés. Cependant, il possède d'autres fonctions telles que la protection de l'organisme contre des agents potentiellement pathogènes infiltrés dans sa lumière intestinale mais aussi un rôle dans la surveillance immunitaire *via* le tissu lymphoïde associé au tube digestif. Ces différentes fonctions sont régulées par des systèmes endocriniens et nerveux intrinsèques situés au niveau de la paroi digestive. Celle-ci est composée de quatre tuniques qui sont, de la lumière intestinale vers le milieu interne : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et séreuse (ou adventice) (**Figure 1**).

La muqueuse est constituée de cellules épithéliales qui sécrètent du mucus sous forme de fluide protecteur épais. Les principales fonctions de la muqueuse sont d'absorber et de transporter les nutriments, de garder les tissus humides et de protéger le corps contre les agents pathogènes et les particules étrangères. La sous-muqueuse est une matrice extracellulaire, riche en collagène, qui soutient et relie la muqueuse à la couche musculaire. La couche musculaire est responsable des mouvements intestinaux tels que le péristaltisme. L'adventice est une membrane tissulaire lisse composée d'une membrane viscérale et d'une couche pariétale. L'adventice sécrète un liquide séreux.

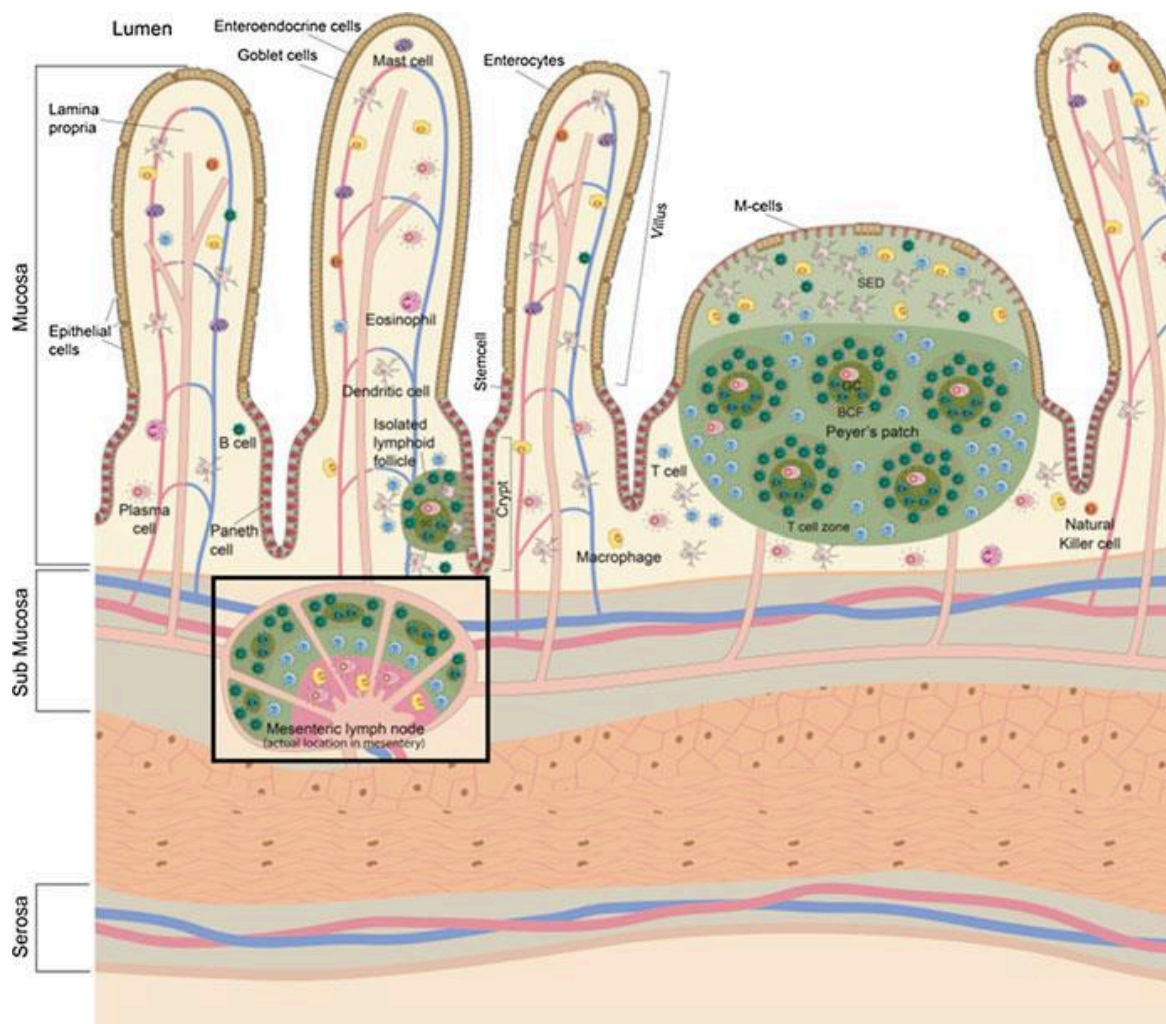


Figure 1 : Les différentes couches de la paroi digestive de l'intestin grêle.

D'après Swiatecka et Mackie 2015 (1)

2. L'épithélium gastro-intestinal :

La paroi digestive est recouverte par une couche de cellules épithéliales qui constitue l'épithélium gastro-intestinal. Les cellules épithéliales intestinales (CEI) sont remplacées en permanence tous les 4 à 5 jours par un processus de renouvellement et de migration. Les nouvelles CEI sont produites par des cellules souches qui donnent naissance d'abord à des progéniteurs qui se différencient en CEI matures au fur et à mesure qu'ils migrent vers le haut dans l'axe des cryptes-villosités. Les CEI âgées sont exposées à un phénomène d'apoptose et sont libérées dans la lumière intestinale. Plusieurs types de cellules sont présents dans l'épithélium

intestinal, notamment les entérocytes, les cellules de Paneth, les cellules caliciformes et les cellules neuroendocrines.

Les entérocytes sont le principal type de cellules de l'épithélium intestinal, jouent un rôle important dans l'absorption des nutriments (par exemple, les ions, l'eau, le sucre, les peptides et les lipides) et dans la sécrétion d'immunoglobulines. Les cellules caliciformes sécrètent du mucus, qui lubrifie le passage des aliments dans les intestins et protège la paroi intestinale des enzymes digestives. Les cellules de Paneth synthétisent et sécrètent des peptides antimicrobiens et jouent donc un rôle dans la défense de la barrière muqueuse intestinale. Les cellules neuroendocrines peuvent libérer des hormones intestinales ou des peptides dans le sang lors de la stimulation afin d'activer les réponses nerveuses (2). Les cellules neuroendocrines sont également connues pour agir en tant que chimiorécepteurs, initiant des actions digestives, détectant des antigènes et initiant des réponses protectrices (3).

3. La barrière épithéliale intestinale :

L'épithélium intestinal est confronté à la tâche complexe de fournir une barrière tout en permettant l'absorption des nutriments et de l'eau. La muqueuse intestinale a une charge beaucoup plus difficile : elle doit trouver un équilibre entre la nécessité d'une barrière contre un environnement défavorable et la nécessité d'assurer les différents échanges nécessaires par transport actif et passif. Au cours de la dernière décennie, il a été suggéré qu'un défaut de barrière est un facteur commun dans l'apparition de diverses maladies locales et systémiques de nature inflammatoire, auto-immune, métabolique ou fonctionnelle, telles que les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), la maladie cœliaque, le syndrome de l'intestin irritable (SII), le diabète de type 1 et la sclérose en plaques ainsi que l'obésité (4,5). Une barrière intestinale fonctionnelle est donc essentielle au maintien d'une stabilité physiologique et à la prévention de la maladie.

La surface luminale du TGI de l'estomac au rectum est recouverte d'une couche unique de cellules épithéliales. Ces CEI, avec leurs contours en brosse bien ordonnés, constituent une grande surface qui est multipliée à la fois par les caractéristiques macroscopiques des valvules conniventes et par les structures microscopiques des villosités en forme de doigt. Une surface luminale d'environ 400 m² représente la plus grande surface du corps humain séparant l'environnement externe du milieu interne. La vaste surface intérieure de la muqueuse

intestinale permet une absorption efficace des nutriments pour l'individu. D'autre part, cette grande surface doit également tolérer le contenu luminal de l'intestin et constituer un mécanisme de barrière et / ou de défense compétent face à une charge massive de substances antigéniques et de microbes. Il convient de noter que cet étonnant équilibre entre absorption et exclusion est géré par les CEI avec un renouvellement dynamique. Les taux de renouvellement des CEI (entérocytes) sont régis par la prolifération des cellules cryptiques et l'excrétion villosités / cellules de surface. Les cellules souches nouvellement proliférées dans les régions des cryptes se différencient en cellules épithéliales avec une expression élevée des enzymes de bordure en brosse et des transporteurs, et migrent simultanément vers le sommet des villosités où l'apoptose et le détachement de cellules se produisent au niveau de la zone appelée «zone d'extrusion». Ces cellules souches se différencient également en cellules de Paneth qui migrent vers le bas de la crypte, ainsi qu'en cellules entéro-endocrines de la couche épithéliale qui migrent vers le haut aux extrémités des villosités. L'axe apoptose et le dépouillement des cellules sur les extrémités des villosités est encore en discussion, mais l'accumulation de preuves indique que la cascade de signalisation apoptotique se poursuit parallèlement à la poursuite d'extrusion cellulaire (7).

Au cours du processus de différenciation et de migration, des protéines de jonctions serrées se forment au niveau des CEI aux sites de contact cellule-cellule. La barrière physique constituée par ces cellules épithéliales étroitement liées est le facteur limitant qui détermine la perméabilité intestinale. L'apoptose épithéliale physiologique et l'extrusion aux extrémités des villosités ne compromettent pas la fonction de barrière (8). De nombreuses études ont montré que des protéines de jonctions serrées sont présentes à la base des membranes basolatérales entre deux entérocytes voisins encadrant les cellules en cours d'extrusion et que les fonctions de barrière sont donc maintenues aux extrémités des villosités (8). Néanmoins, une mort excessive des cellules épithéliales causée par des microbes pathogènes, un stress métabolique, des anti-inflammatoires non stéroïdiens, des agents acides ou enzymatiques, peut entraîner une dénudation de la surface des villosités et une hyperperméabilité intestinale si la prolifération des cryptes et la migration entérocytaire n'étaient pas suffisantes pour couvrir la zone affectée. Inversement, il est connu que des taux élevés de prolifération cellulaire et de résistance à l'apoptose cellulaire sont deux facteurs tout aussi importants au cours des premiers stades de la carcinogenèse colorectale (13). L'équilibre entre ces deux événements, à savoir la mort cellulaire et la prolifération de CEI, est maintenant reconnu comme un facteur déterminant important de l'homéostasie intestinale.

La barrière épithéliale intestinale constitue une membrane de l'intestin qui contient plusieurs types de cellules épithéliales formant ainsi des couches aux rôles différentes afin d'assurer sa fonction de barrière. Sous la couche épithéliale, se trouve une fine couche de tissu conjonctif, la *lamina propria*, qui joue un rôle crucial dans la promotion d'une communication saine entre le microbiome et les cellules immunitaires. Le système épithélial intestinal abrite également des cellules immunitaires, notamment des cellules dendritiques, des cellules T, des cellules B et des macrophages, qui fonctionnent en étroite relation avec les CEI pour maintenir l'homéostasie intestinale. Le microbiote intestinal, constitué de centaines de milliards de bactéries et de virus, est essentiel au maintien d'une relation symbiotique avec les cellules immunitaires. Des études récentes ont rapporté des preuves irréfutables des rôles métaboliques, immunologiques et physiologiques attribués au microbiote intestinal. Cependant, la première couche de défense dans l'épithélium de l'intestin est formée par une couche de mucus, ce qui est essentiel pour limiter l'exposition des cellules épithéliales au microbiome (**Figure 2**) (14).

La couche de mucus est une barrière chimique qui se compose principalement d'eau (~ 95%) et de glycoprotéines (1 à 10%), ainsi que d'électrolytes, d'anticorps et d'acides nucléiques (15). Elle contient également des défensines ou des peptides antimicrobiens qui sont sécrétés par les cellules de Paneth. Cette couche de protéines de mucine hautement glycosylées forme une structure de tamis semblable à un gel recouvrant l'épithélium intestinal. Au niveau de l'intestin grêle et du colon, la mucine 2 (MUC2) est la protéine de mucus la plus abondante sécrétée par les cellules caliciformes.

L'expression de MUC2 est essentielle à la protection contre la maladie, car il a été démontré que les souris Muc2 knock-out (Muc2 $-/-$) développent spontanément une colite. Les CEI expriment également des mucines transmembranaires qui restent attachées à la surface apicale et forment le glycocalyx avec des glycolipides (16). De manière remarquable, l'intestin grêle ne comporte qu'une couche de gel muqueux alors que le côlon comporte deux couches : une couche externe lâche qui permet la colonisation à long terme des bactéries commensales, cruciales dans le côlon, et une couche interne dense dépourvue de bactéries.

Des régulateurs immunitaires, tels que l'adénosine monophosphate (AMP) et l'immunoglobuline A sécrétoire (IgAs), sont libérés dans le gel de mucus pour renforcer la séparation physique du microbiote sous forme de gradient, de l'épithélium à la lumière, et indiquent les concentrations les plus élevées dans l'intestin grêle, où la couche de mucus est

moins dense. La composition de la couche de mucus peut affecter le microbiote dans l'intestin, tandis que le microbiote détermine également les propriétés du gel de mucus (17). L'augmentation du nombre de bactéries commensales résidant dans le mucus, par des interventions pro- ou prébiotiques, devrait améliorer la fonction de barrière de la couche muqueuse (18).

En l'absence de cette barrière, les CEI peuvent être en contact direct avec une bactérie luminaire conduisant à une inflammation accrue de l'intestin. La quantité et la composition de la couche des cellules caliciformes reflètent un équilibre entre la sécrétion de mucus, son érosion et sa dégradation par des bactéries. L'appauvrissement de la couche de mucus, que ce soit par dégradation accrue ou par une synthèse déficiente, aura donc un effet profond sur cette couche de la barrière intestinale.

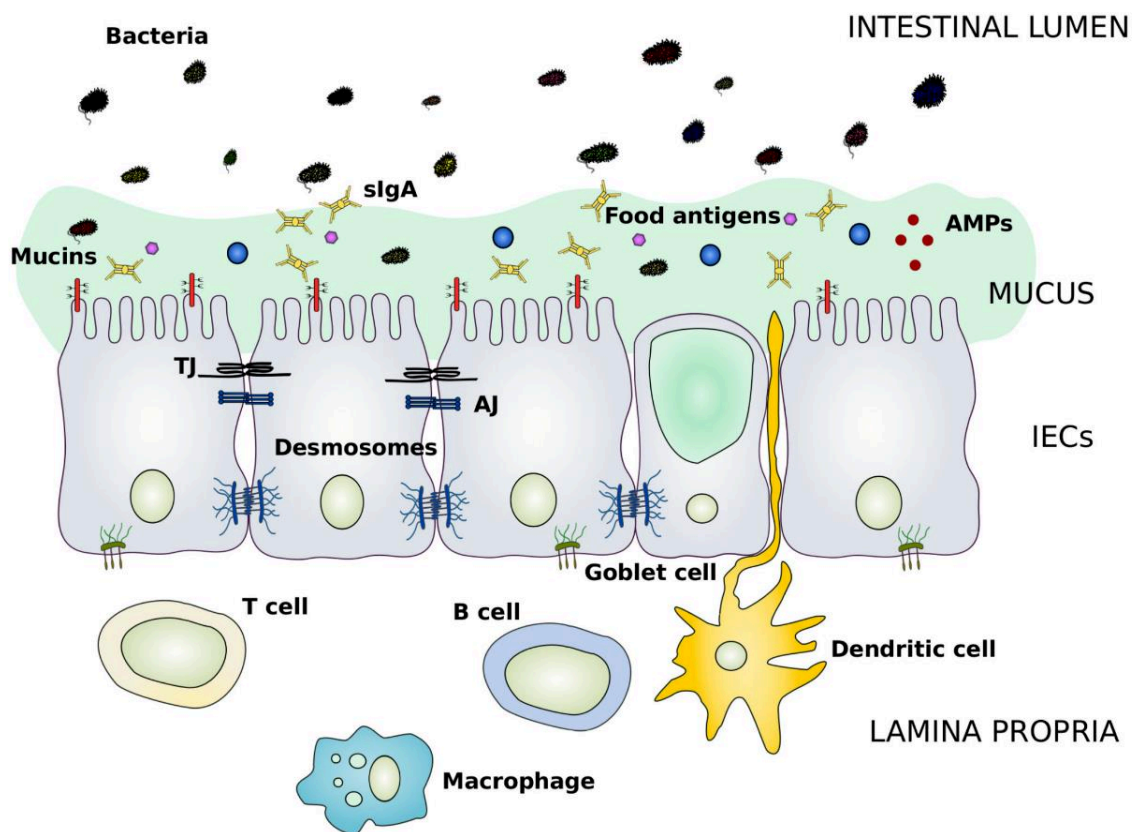


Figure 2 : Schéma représentatif des différents compartiments de la barrière intestinale.

D'après Vancamelbeke Vermeire, 2017 (14)

De manière constante, les souris Muc2 ^{-/-} ont une adhérence bactérienne accrue à l'épithélium intestinal, une susceptibilité accrue à la colite et une fonction de barrière intestinale perturbée (20). La production de mucine est affectée à la fois par l'augmentation du nombre de cellules caliciformes et par l'augmentation de l'expression génique de MUC2 au sein de ces cellules. Il a été démontré que les composants alimentaires, en particulier le type et le contenu des fibres alimentaires, affectent également la sécrétion de mucine par les cellules caliciformes (21). Dans les MICI, la couche de mucus et la production de mucine sont souvent altérées qualitativement et quantitativement. À l'aide de modèles de colite chronique chez le rat, il a été observé une diminution marquée de la teneur des mucines en thréonine associée à une diminution de la synthèse de la mucine tout au long de l'intestin, (22). La thréonine est un acide aminé essentiel, protéinogène et semble être important à la synthèse des mucines. En effet, un apport accru d'un mélange d'acides aminés, y compris la sérine, la proline, la cystéine et particulièrement la thréonine augmenterait la synthèse de mucine au cours d'une colite (23).

Sous la couche de mucus, un pool de cellules souches pluripotentes résidant dans les cryptes donne lieu à cinq types de cellules distincts, notamment les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules entéro-endocrines, les cellules de Paneth et les cellules M. Ces cellules forment ensemble une monocouche continue et polarisée qui sépare la lumière de la *lamina propria*. Cette couche de CEI représente une barrière physique constituée de 80% d'entérocytes, régulant l'absorption des nutriments via des transporteurs, des canaux et des récepteurs spécifiques (transport transcellulaire) (24). Étant donné que les membranes cellulaires sont imperméables aux solutés hydrophiles en l'absence de transporteurs spécifiques, le passage de telles molécules à travers les CEI est très limité. L'absorption de molécules (lipophiles ou de poids moléculaire important) dépend principalement de la diffusion et de l'endocytose. Le transport de molécules entre les CEI est régulé par la présence de complexes protéiques fonctionnels. Les trois complexes les plus importants sont les jonctions serrées (JS), les jonctions adhérentes (JA) et les desmosomes (**Figure 3**) (19).

Les JS sont les complexes adhésifs les plus apicaux qui scellent en grande partie l'espace intercellulaire et se composent de protéines transmembranaires (par exemple, claudines, occludine), de protéines membranaires périphériques (par exemple, *Zonula occludens* (ZO-1, ZO-2) et de protéines régulatrices.

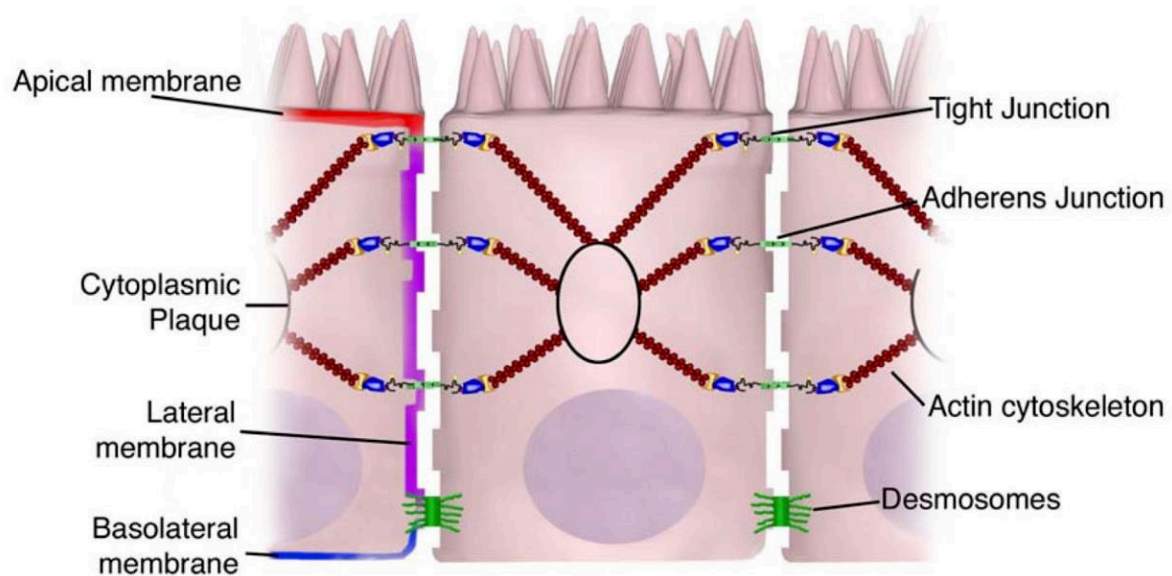


Figure 3 : Vue d'ensemble des complexes jonctionnels épithéliaux intestinaux.

L'épithélium intestinal est constitué d'une seule couche de cellules épithéliales polarisées. Les cellules adjacentes sont reliées par 3 complexes jonctionnels principaux : les JS, les JA et les desmosomes. Les desmosomes sont des plaques denses localisées qui sont connectées aux filaments de kératine. Les jonctions adhérentes et les jonctions serrées consistent toutes deux en des protéines transmembranaires connectées de manière intracellulaire *via* des protéines adaptatrices au cytosquelette d'actine.

D'après Groschwits et Hogan, 2009 (19)

Avec les desmosomes, les JA fournissent de solides liaisons adhésives pour maintenir l'intégrité de l'épithélium. Les JS et les JA sont liées à l'anneau péri-jonctionnel d'actine et de myosine qui permet la régulation des jonctions *via* le cytosquelette (19).

Enfin, une barrière immunologique qui est constituée de cellules M situées dans la couche de CEI et de cellules présentatrices d'antigène (CPA) en patrouille dans la *lamina propria*. Les cellules M prélèvent en permanence des antigènes de la lumière et les transmettent aux CPA, telles que les cellules dendritiques et les macrophages. Des antigènes inoffensifs amènent les CPA à créer un environnement tolérogène avec la production de facteurs immunosuppresseurs tels que l'interleukine-10 (IL-10), le « *transforming growth factor- β* » (TGF- β) et l'oxyde nitrique. Une tolérance supplémentaire est ainsi créée par l'induction de

lymphocytes T régulateurs (Treg) (25). Les antigènes sont également reconnus par les CPA et déclenchent l'activation de la cascade inflammatoire à partir de l'activation des cellules T.

4. Les protéines de jonctions serrées :

La perméabilité sélective paracellulaire est médiée par les JS, qui entourent l'extrémité apicale des espaces intercellulaires. Les ZO agissent comme des protéines d'échafaudage qui relient les protéines transmembranaires (Claudines et Occludine) au niveau de leurs brins cytoplasmiques C-terminaux à la F-actine, un composant du cytosquelette filamenteux. La protéine transmembranaire de la jonction des adhérences, la cadhérine épithéliale (E-cadhérine), est connectée à la F-actine *via* des protéines intracellulaires de la famille des caténines (**Figure 4**) (28).

A. Zonula Occludens (ZO)

Les protéines ZO, qui comprennent ZO-1, ZO-2 et ZO-3, ont été les premières protéines spécifiques de JS à être découvertes en 1986 (29). Les ZO, comme expliqué précédemment, relient les protéines de JS transmembranaires telles que l'occludine et la claudine-1 au cytosquelette d'actine, et ces interactions protéiques maintiennent la formation et la fonction des JS. Des études indiquent que, bien que les cellules déficientes en ZO-1 puissent maintenir la structure des JS et présenter une perméabilité normale, l'activité d'autres protéines de JS telles que l'occludine et les claudines dans l'assemblage des JS était retardée dans ces cellules (30).

D'autre part, le déficit en ZO-2 ou ZO-3 n'a pas affecté la formation des JS dans les CEI, suggérant que les protéines ZO-1 jouent un rôle plus important dans le contrôle de l'assemblage des JS par rapport à ZO -2 ou ZO-3 (31).

B. Occludine

L'occludine a été la première protéine transmembranaire des JS découverte en 1993 (32), elle a été proclamée le « Saint Graal » de la biologie des JS. L'occludine est fortement exprimée au niveau des sites de contact cellule-cellule et on pense qu'elle est importante pour l'assemblage et la maintenance des JS.

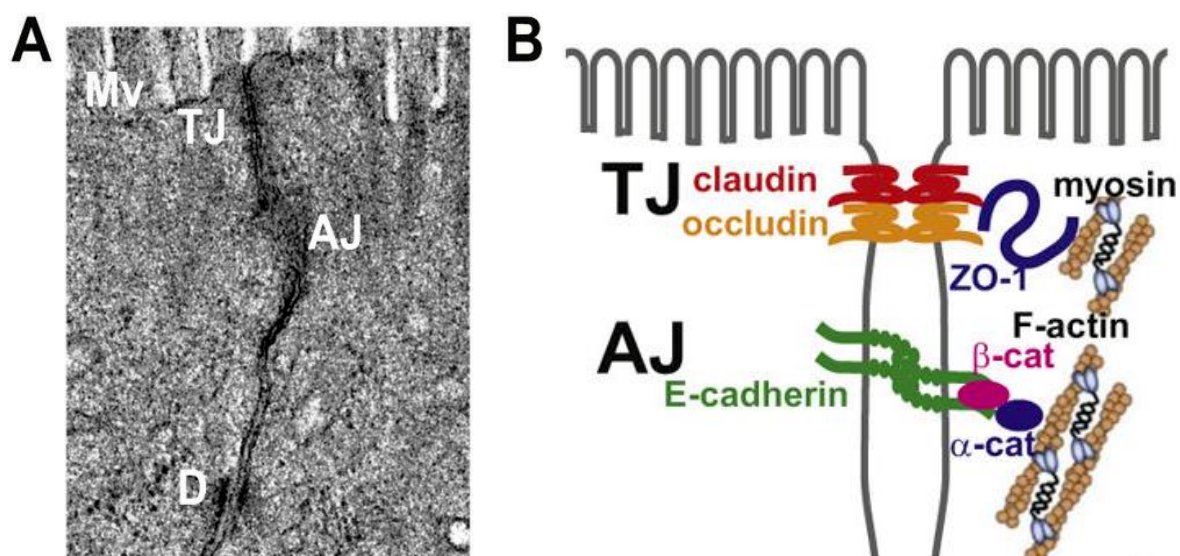


Figure 4 : Représentation schématique des protéines de jonctions serrées et de leur localisation

(A) Image au microscope électronique à transmission (TEM) de cellules épithéliales intestinales. Microvillosités (Mv), jonction serrée (TJ), jonction adhérente (AJ) et desmosomes (D). (B) Les JS sont des complexes protéiques qui s'étendent entre les cellules épithéliales pour former une barrière étanche. Ils sont constitués de protéines transmembranaires, telles que l'occludine (orange) et les claudines (rouge) et sont reliés au cytosquelette d'actine *via* les protéines ZO-1 (bleu).

D'après Choi et al, 2017 (28)

Les fonctions « occludine » semblent nécessiter l'extrémité C cytoplasmique, qui est fortement phosphorylée dans une occludine associée à une JS (33).

La phosphorylation de l'occludine est en corrélation avec la régulation de sa localisation et de sa fonction. Une occludine qui est phosphorylée au niveau de ses résidus sérine / thréonine est principalement localisée dans la membrane, alors que le cytoplasme contient une occludine moins phosphorylée. De plus, la phosphorylation de l'occludine semble contrôler son interaction avec d'autres protéines de JS telles que la ZO-1. L'interaction entre l'occludine et la ZO-1 est essentielle pour l'intégrité des JS. Par conséquent, l'occludine phosphorylée régule la stabilité et la perméabilité des JS (34). Il a également été démontré que

les souris déficientes pour l'occludine présentent une structure de JS normale, en revanche elles présentent une inflammation, une hyperplasie et un retard de croissance élevé (35). D'autre part, une expression accrue de l'occludine joue un rôle dans l'amélioration de la fonction de barrière et dans la prévention des dommages causés aux JS (36). En conséquence, il a été suggéré un rôle fonctionnel pour l'occludine plutôt que structurel. La reconnaissance du fait que l'occludine ne soit pas absolument nécessaire pour la fonction de barrière et ne puisse pas expliquer les sélectivités différentielles des JS sur différents sites a conduit à la recherche continue de protéines transmembranaires des JS. Cela a mené à la découverte de la claudine-1 et la claudine-2 (37).

C. Claudines

Vingt-sept gènes de claudine humaine ont été identifiés, mais il n'est pas clair que tous soient exprimés sous forme de protéines. La famille des claudines semble être composée donc de plusieurs protéines membranaires intégrales. Lorsque l'expression de claudines-1–24 a été testée dans les intestins de rat et de souris, toutes les claudines à l'exception des 6, 16, 19, 22 et 24 ont été détectées par analyse PCR (39). La claudine-13 est notamment exprimée chez les rongeurs, mais est absente chez l'homme. Les propriétés de barrière et de perméabilité des JS sont définies en grande partie par l'ensemble des protéines claudines exprimées, ce qui varie entre les tissus et au sein de ceux-ci (**Tableau 1**).

Les claudines spécifiques exprimées dans le TGI varient en fonction de la localisation, du stade de développement pré et postnatal et de la présence de la maladie. Par exemple, l'expression de la claudine-8 n'est détectable que de l'iléon au côlon distal, alors que la claudine-18 est détectable dans l'estomac et le duodénum, mais pas dans l'iléon et le côlon (40). La claudine-2 est fortement exprimée dans la période néonatale à la fois par les cryptes et les villosités, ou dans la surface du côlon, par les CEI. A ces moments, l'expression de la claudine-15 est faible et limitée au niveau des cryptes. Ce schéma s'inverse au cours des 30 à 90 premiers jours de la vie chez la souris (40). Bien qu'il soit bien établi que de nombreuses protéines de la famille des claudines forment des pores pour le passage de molécules sélectives dans les voies paracellulaires (30), d'autres études sont nécessaires pour déterminer les fonctions exactes des claudines dans les JS. En outre, des études chez l'animal ont montré l'importance des claudines dans l'intégrité des JS. En effet, il a été démontré que les souris déficientes en Claudine-1 présentent une formation anormale des JS de la barrière intestinale, ce qui a pu induire le

développement de cancers et de métastases (41). De plus, des souris déficientes en claudine-2 ou en claudine-15 dans l'intestin grêle révèlent que ces protéines transmembranaires jouent un rôle essentiel dans la perméabilité sélective du canal paracellulaire transépithélial des Na⁺ extracellulaires, chez le nourrisson et l'adulte (42).

Tableau 1 : Classification fonctionnelle de la famille des protéines Claudines et de leur schéma d'expression spécifique dans l'intestin

D'après Martinez et al, 2012 (43)

Fonctions	Claudines	Intestin grêle	Gros intestin
Constructeurs de barrière	Claudine-1	Oui	Oui
	Claudine-3	Oui	Oui
	Claudine-4	Oui	Oui
	Claudine-5	Oui	Oui
	Claudine-8	—	Oui
	Claudine-11	—	Non détectable
	Claudine-14	—	Non détectable
	Claudine-19	—	—
Médiateurs de perméabilité	Claudine-2	Oui	Limitée aux cryptes
	Claudine-10	—	—
Fonctions ambiguës	Claudine-7	Oui	Oui
	Claudine-12	—	Non détectable
	Claudine-15	Oui	Non détectable
	Claudine-16	Non détectable	Non détectable

Enfin, l'intégrité des JS semble être régulée dynamiquement, l'ouverture des espaces intercellulaires est réalisée par contraction des microfilaments d'actine. La myosine est une protéine motrice qui co-localise avec la F-actine et convertit l'énergie chimique de l'adénosine triphosphate en énergie mécanique. Une étape cruciale dans l'induction de cette machinerie contractile mécano-chimique est la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC),

composante régulatrice de la myosine, par la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). Le statut de phosphorylation de la chaîne légère de la myosine induit un changement de la structure tertiaire de la myosine. Cela provoque la « marche » de la myosine le long des filaments d'actine, augmentant la contraction au cytosquelette, ce qui peut entraîner à une cassure mécanique des JS, une perturbation et une migration cytosolique des protéines de JS (44). Il en résulte une altération de la fonction barrière intestinale. Des bactéries luminales potentiellement pathogènes peuvent alors migrer vers le tissu muqueux sous-jacent et provoquer une réponse pro-inflammatoire aux sites de lésions épithéliales.

5. Evaluation de la perméabilité intestinale :

Il existe différentes techniques pour évaluer la fonction de la barrière intestinale. La plupart des tests disponibles mesurent activement la perméabilité intestinale, ce qui doit être interprété au sens strict du terme comme le passage de molécules à travers l'épithélium intestinal. Ces essais ne représentent donc qu'un aspect de la fonction de barrière intestinale.

A. *In vitro* :

Lorsque des échantillons biologiques ne sont pas disponibles, des modèles basés sur la culture cellulaire avec des lignées de cellules intestinales immortalisées (Caco-2 ou HT-29) peuvent être utilisés pour évaluer la fonction de barrière intestinale. Les monocouches des cellules Caco-2 ont été utilisées la première fois pour modéliser l'absorption intestinale humaine à la fin des années 1980 (45). Depuis lors, ce modèle est devenu un outil standard pour la prévision de l'absorption intestinale de médicaments chez l'Homme et pour les études mécanistiques du transport de médicaments (46).

Les Caco-2 sont une lignée de cellules cancéreuses épithéliales isolées à l'origine d'un adénocarcinome du colon humain. Ces cellules subissent une différenciation entérocytaire spontanée en culture pour ressembler aux cellules épithéliales de l'intestin grêle. Elles sont généralement cultivées en monocouche, sur des surfaces de polycarbonate semi-perméables insérées dans une chambre de dosage établissant des chambres apicale et basolatérale. Ces deux chambres ne sont connectées que par la monocouche de cellules et leur substrat semi-perméable. Les chambres apicale et basolatérale représentent respectivement les côtés luminal

et lymphatique sang / mésentérique du TGI. Lorsque les cellules Caco-2 atteignent la confluence, typiquement après environ 21 jours de culture, la polarité cellulaire et les JS sont établies et plusieurs systèmes de transports actifs sont exprimés comme dans les parois de l'intestin grêle humain.

L'intégrité de la monocouche de cellules différenciées est évaluée par deux techniques principales :

a) La mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) qui permet d'évaluer la résistance de la monocouche de cellules à un courant électrique et d'indiquer donc le bon fonctionnement des JS. Typiquement, les valeurs $TEER > 300 \Omega \text{ cm}^{-2}$ indiquent une intégrité adéquate de la monocouche. La perméabilité de la monocouche est d'autant plus élevée que la résistance est faible.

b) La diffusion des molécules de marqueur fluorescent (un traceur dont le poids moléculaire peut être variable) à travers la monocouche de cellules détermine également l'intégrité de la barrière intestinale. Les molécules sont ajoutées du côté apical et après une incubation des cellules de différentes durées, le passage de ces molécules à travers la monocouche est mesuré au niveau du compartiment basolatéral. L'altération des JS de la monocouche est corrélée à la rapidité du flux du traceur (appelé coefficient de perméabilité apparente) vers le côté basolatéral.

Du fait des propriétés favorables qu'acquièrent les cellules Caco-2 cultivées, le test monocouche de cellules Caco-2 est devenu un modèle *in vitro* standard pour évaluer la perméabilité intestinale ainsi que le transport de candidats-médicaments et de composés principaux.

B. *Ex vivo* :

Le système de chambre Ussing doit son nom au zoologiste danois Hans Henriksen Ussing, qui a inventé le dispositif en 1951-1952 pour mesurer le passage des ions sodium à travers la peau de grenouille (47). Les chambres de Ussing représentent un test alternatif mais fiable pour mesurer le transport des ions et des molécules à travers des échantillons de tissu épithélial frais. Pour les études de perméabilité intestinale, des biopsies intestinales ou des résections chirurgicales de tout segment intestinal, d'êtres humains ou d'animaux, peuvent être

utilisées mais aussi dans une monocouche de cellules développées sur des supports semi-perméables.

La configuration classique d'une chambre de Ussing repose sur deux compartiments capables de séparer la membrane muqueuse du côté basolatéral du tissu. Ces deux compartiments sont fermés et reliés par une ouverture de diamètre défini. Une biopsie intestinale est alors placée entre ces deux compartiments contenant un liquide physiologique oxygéné (Ringer ou Hank's) et maintenu à 37°C. Dans la plupart des expériences, des molécules fluorescentes sont ajoutées, comme marqueurs, à la moitié de la chambre apicale (côté muqueux de la biopsie), après quoi des échantillons de la chambre basolatérale (côté séreux de la biopsie) sont prélevés au fil du temps pour évaluer le passage à travers le tissu. De la même façon, pour déterminer la perméabilité de l'épithélium vis-à-vis de micro-organismes et la capacité de translocation des bactéries à travers une muqueuse intestinale, il est possible de placer des bactéries du côté muqueux de la biopsie et de les dénombrer à différents temps dans le côté séreux. En outre, le système de mesure de la TEER utilisé *in vitro* a été adapté aux chambres de Ussing et permet donc de suivre la résistance électrique au cours du temps ainsi que la fonction de différents traitements. Le flux paracellulaire de petites molécules de marqueur sera souvent reflété par des modifications similaires du TEER.

C. *In vivo* :

La méthode la plus courante d'évaluation *in vivo* de la perméabilité intestinale est la récupération urinaire des molécules administrées. Ces molécules sont des marqueurs non toxiques, non chargés et solubles dans l'eau. En milieu clinique, ces molécules sont administrées par voie orale, ne doivent pas être stockées par l'organisme, doivent être éliminées par le rein et être facilement quantifiables dans les urines. Les marqueurs typiques comprennent l'EDTA marqué au chrome (51Cr-EDTA), les polyéthylèneglycols (PEG) ou les sucres non métabolisables (par exemple, le lactulose, le saccharose, le rhamnose...).

Le 51Cr-EDTA, les molécules de PEG ou le sucralose restent stables dans tout le TGI, tandis que les sucres sont métabolisés dans différents segments du tube digestif, ce qui permettra de mesurer la perméabilité intestinale dans diverses régions intestinales (48). Différentes molécules peuvent être utilisées pour mesurer la perméabilité de l'intestin grêle chez l'Homme tels que le lactulose, le rhamnose et le mannitol. L'absorption au niveau de l'estomac est

négligeable étant donnée l'importance de la surface d'absorption de l'intestin grêle et par conséquent le dosage de ces sucres dans l'urine reflète directement la perméabilité de l'intestin grêle (49).

Les tests de perméabilité intestinale les plus employés reposent sur l'absorption différentielle de deux sucres marqueurs très utilisés en clinique tels que le mannitol et le lactulose possédant chacun d'eux une masse moléculaire différente. Le mannitol, un monosaccharide, est considéré comme le marqueur de la perméabilité des petites molécules par voie transcellulaire et sa clairance urinaire reflète de la capacité absorptive de l'intestin grêle. Tandis que le lactulose, un disaccharide, est considéré comme le marqueur de la perméabilité des molécules de poids moléculaire important par voie intercellulaire (à travers les JS) et sa clairance dépend du degré de fuite inter-entérocytaire et donc, grossièrement, du degré d'inflammation de la muqueuse. Ainsi, la détermination du ratio lactulose/mannitol permet de minimiser les différences intraindividuelles provoquées par d'autres facteurs comme la vidange gastrique, le transit intestinal, les urines et la difficulté dans la collecte de l'urine.

Outre la détection dans l'urine, la plupart des marqueurs peuvent également être récupérés dans des échantillons de sang, ce qui est souvent recommandé chez les animaux pour éviter le recours à du matériel coûteux, tel que des cages métaboliques. En utilisant des modèles animaux, des tests de perméabilité avec des molécules plus grosses (par exemple, l'ovalbumine, la peroxydase de raifort, les dextrans) ou même des bactéries marquées par fluorescence sont également possibles. La récupération de ces sondes-marqueurs peut être effectuée dans des échantillons de sang (50).

Le sucre dextran 4kDa couplé au fluorochrome FITC est le plus fréquemment utilisé. Ce petit sucre, non métabolisable, est capable de diffuser entre les entérocytes *via* les pores formés par les JS pour rejoindre la circulation sanguine. Le flux de cette molécule est contrôlé par la cohésion entre les CEI. Le passage de cette molécule dans la circulation sanguine est mesuré en dosant la fluorescence dans le sérum des animaux, permettant d'évaluer l'intégrité globale de l'intestin. Cette technique est rapide et simple à mettre en œuvre mais ne permet pas de discriminer les différents segments du tube digestif impliqués comme le permettent les techniques utilisées chez l'Homme.

D. *In situ* :

Des modifications spécifiques susceptibles d'affecter la fonction de la barrière intestinale peuvent être détectées à l'aide d'approches moléculaires et histologiques sur des coupes de tissus intestinaux. À cet égard, l'épaisseur de la couche du mucus et la coloration des protéines du mucus ont fait l'objet d'une grande attention. Des analyses d'expression de gènes et de protéines jonctionnelles par Western blot, qPCR ou immunohistochimie sont également couramment utilisées. Ces approches fournissent une vision plus mécanistique de la barrière intestinale, ce qui est très pertinent du point de vue de la science fondamentale.

6. Facteurs impliqués dans la modification de la perméabilité intestinale :

La barrière intestinale physique confère la propriété de perméabilité sélective à la muqueuse intestinale, qui est étroitement régulée dans l'homéostasie (état physiologique) et perturbée au cours d'une maladie (état pathologique). L'hyperperméabilité intestinale reflète donc un dysfonctionnement de la barrière intestinale.

Dans des conditions à la fois physiologiques et pathologiques, divers médiateurs peuvent affecter la conformation des JS afin de contrôler la perméabilité paracellulaire dans les couches de cellules épithéliales et endothéliales de l'ensemble du corps. Les facteurs de croissance, les cytokines, les bactéries intestinales et les composants alimentaires sont connus pour réguler l'ouverture des JS intestinales.

A. Inflammation intestinale et perméabilité intestinale :

Les protéines de JS représentent l'un des facteurs clés permettant de maintenir l'intégrité de la barrière intestinale. Des conditions inflammatoires peuvent influencer cette régulation, entraînant des altérations de la barrière intestinale. En effet, Il a été reconnu que des troubles inflammatoires intestinaux (infections entériques, maladies auto-immunes) stimulent la production de la cytokine « *Tumor Necrosis Factor- α* » (TNF- α) qui est considérée comme un médiateur étiologique clé du dysfonctionnement de la barrière intestinale (52). Entre autres, la réduction du nombre de Treg dans les muqueuses intestinales est associée à une perturbation de la fonction de barrière intestinale (53). Il a été démontré *in vitro* que l'incubation des cellules

T84 avec les différentes cytokines telles que TNF α , IL-4, IL-6 et IL-13 augmentent également la perméabilité paracellulaire par induction des claudine-2 formant ainsi des pores, chez des modèles animaux et humains, ainsi qu'une diminution de l'expression de la « *junctional adhesion molecule-A* » (JAM-A) et l'occludine (54,55).

En effet, la muqueuse des patients atteints de MICI, est caractérisée par la présence de cytokines pro-inflammatoires, particulièrement le TNF- α et l'interféron- γ (IFN- γ), qui sont produites par une variété de cellules comprenant les macrophages, les cellules T et les cellules « *Naturel Killer* » (NK). La liaison de ces cytokines à des récepteurs spécifiques à la surface de cellules immunitaires infiltrantes initie une cascade d'événements, commençant par l'activation des voies de signalisation cellulaire du « *nuclear factor-kappa B* » (NFkB) conduisant à la production de plus de médiateurs inflammatoires, ou à l'apoptose maintenant le processus inflammatoire. Des revues approfondies ont été publiées sur la régulation des protéines de JS par les cytokines. Par exemple, il a été démontré que le TNF α était responsable de la diminution d'expression de la claudine-1 et induisait également une dégradation de l'occludine, ce qui peut entraîner une augmentation de la perméabilité paracellulaire (30). Non seulement l'expression de ces protéines de JS peut être influencée, mais leur localisation dans la cellule peut être dérégulée. Il a été observé que les claudines 3, 5 et 8, ainsi que l'occludine et la JAM-A, sont intériorisées plutôt qu'exprimées au niveau membranaire dans les biopsies de patients atteints de colite (56). Selon une étude *in vitro*, les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IFN- γ semblent réguler la perméabilité paracellulaire *via* l'activation de MLCK, entraînant une hyperphosphorylation de MLC et une ouverture des JS *in vitro* (57). L'inhibition pharmacologique de l'activité de la MLCK *in vitro* a montré une réduction rapide de la phosphorylation de la MLC et une restauration de la fonction de barrière intestinale (58). Il a déjà été montré une régulation positive de l'expression de la claudine-2 par la TNF- α augmentant ainsi le flux de la voie des pores (59). Cependant, ce processus ne s'est produit qu'après plusieurs heures de traitement par TNF- α , contrairement à la régulation rapide de la transcription de MLCK, et est donc plutôt considéré comme une phase secondaire de la régulation de la barrière induite par TNF- α qui pourrait être dans ce cas une régulation indirecte (60).

De même, il a été démontré que l'IFN- γ augmentait la perméabilité paracellulaire dans les cellules épithéliales du côlon T84, en diminuant la synthèse de la protéine ZO-1, augmentant l'internalisation des protéines de JS et en réarrangeant le cytosquelette d'actine (61). Il a également été démontré que l'IL-1 β pouvait réguler la perméabilité transépithéliale *in vitro*.

Effectivement, une augmentation progressive de la perméabilité transépithéliale dans les cellules Caco-2 a été démontrée par l'IL-1 β en fonction du temps. Cette augmentation était attribuée à l'activation rapide du NF-KB par l'IL-1 β (62). D'autre part, le rôle de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans la régulation des JS a été démontré chez des souris IL-10 $-/-$. Les souris IL-10 $-/-$ présentaient une augmentation de la perméabilité iléale et colique à l'âge de 2 semaines. Cependant, cet effet était supprimé chez des souris IL-10 $-/-$ élevées dans des conditions sans germe, suggérant un rôle du microbiote dans la perméabilité intestinale (63).

B. Microbiote intestinal et perméabilité intestinale :

Le microbiote intestinal est composé principalement de 3 phyla majeurs, à savoir *Firmicutes*, *Bacteroides* et *Actinobacteria*, suivis de 2 phyla mineurs, *Protéobactéries* et *Verrucomicrobia*. Son abondance et sa composition varient dans le TGI en fonction de l'oxygène et des gradients de pH (65). La diversité et l'abondance du microbiote sont différentes le long de l'intestin, passant de 10³ bactéries / g dans le duodénum à 10⁴ bactéries / g dans le jéjunum à 10⁷ bactéries / g dans l'iléon et à 10¹² bactéries / g dans le côlon (**Figure 5**) (66).

Le rôle du microbiote intestinal est de mieux en mieux connu. On sait désormais qu'il joue un rôle dans les fonctions digestive, métabolique, immunitaire et neurologique. L'un des rôles le plus important des bactéries intestinales est la digestion des substrats non digérés par l'hôte. Ce processus métabolique permet de fournir jusqu'à 10 % des besoins énergétiques de l'Homme (67). Les fonctions métaboliques incluent la dégradation des polysaccharides en acides gras à chaîne courte (AGCC) tels que le butyrate, le propionate et l'acétate. Les recherches actuelles démontrent que les AGCC ont des fonctions beaucoup plus raffinées que les simples micro-organismes nourrissants les entérocytes. Ils sont maintenant considérés comme des régulateurs importants de l'immunité, du métabolisme énergétique et de l'expansion du tissu adipeux. Les AGCC permettent également l'acidification de la lumière du côlon, empêchant ainsi la croissance d'agents pathogènes bactériens (68). De par leurs propriétés anti-inflammatoires et étant la principale source d'énergie des colonocytes, les AGCC semblent avoir un rôle dans le renforcement de la barrière intestinale (69). Leur absence provoque l'autophagie ou l'autolyse des colonocytes (70). Le microbiote intestinal et ses métabolites font donc partie intégrante de la fonction de barrière intestinale mais sont également capables de perturber et d'améliorer son intégrité en modulant les réponses immunitaires, le stress oxydatif, l'inflammation, la signalisation vagale et la disponibilité des éléments nutritifs.

De plus, le microbiote intestinal permet le renforcement de la barrière intestinale également par la production de mucus, la sécrétion de défensines et d'IgAs ainsi que la synthèse des protéines de JS par les entérocytes (71). Comme cité avant, le microbiote intestinal contribue à diverses fonctions immunologiques. Dans la barrière intestinale, il empêche la colonisation et la croissance des microorganismes pathogènes. Il favorise également la maturation de la barrière immunitaire en stimulant à la fois la réponse immunitaire innée *via* les « *Toll-Like Receptor* » (TLRs) et les récepteurs de type « *Nucleotide Oligomerization Domain* » (NOD), des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, et une réponse immunitaire adaptative (72). En plus de son rôle majeur dans la sécrétion de mucines, de peptides antimicrobiens, de défensines et d'IgA, le microbiote intestinal est essentiel au développement et à la fonction des cellules Treg (73). Ces cellules utilisent l'IL-10 pour réguler l'inflammation provoquée par une stimulation

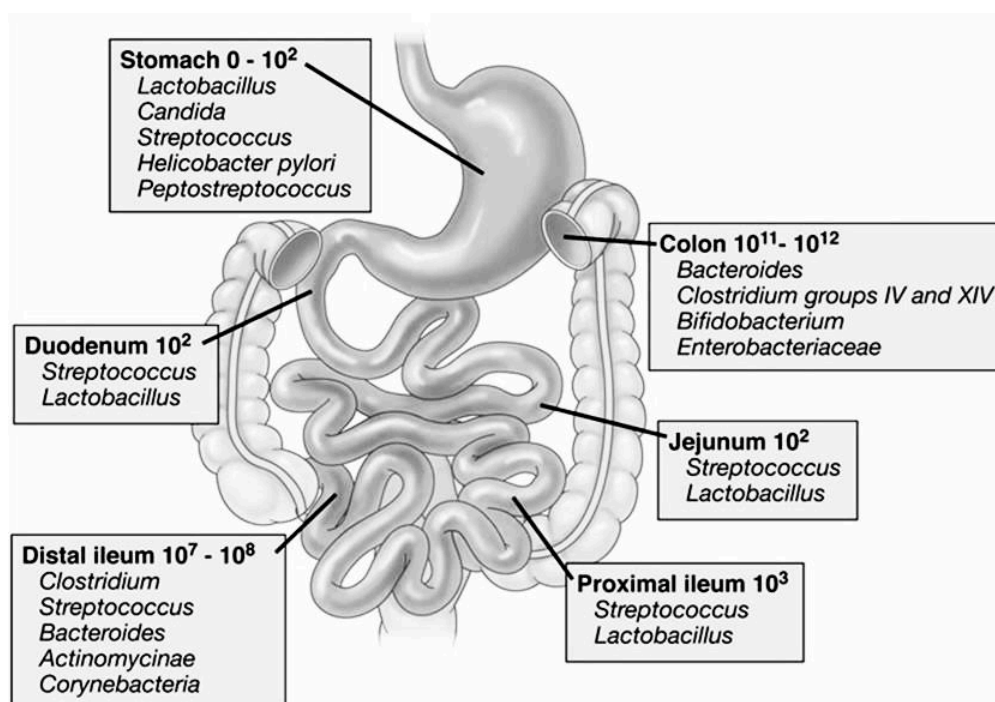


Figure 5 : Composition et concentrations lumineales des espèces microbiennes dominantes dans diverses régions du TGI.

D'après Sartor, 2008 (74)

microbienne (75). De nombreuses bactéries, notamment *Bacteroides fragilis*, ont été associées à l'induction de cellules Treg *via* leur production du polysaccharide A, ce dernier est reconnu par les TLR2 des Treg induisant ainsi leur prolifération et leur développement en cellules Treg FoxP3⁺ productrices d'IL-10. L'induction des Treg par cette bactérie participe à la prévention et à la résolution de la colite expérimentale dans des modèles animaux (76). Le butyrate semble exercer un effet anti-inflammatoire sur le système immunitaire en augmentant la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4 (77), en inhibant l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales *via* la modulation VCAM-1 (78), une protéine d'adhésion cellulaire, en inhibant la fonction de l'IFN- γ et par conséquent son activité pro-inflammatoire (79) et enfin en régulant la génération de cellules Treg et la fonction anti-inflammatoire des leucocytes (80).

En outre, il a été démontré que le microbiote affecte la fonction du Système nerveux central (SNC) chez des individus sains et malades (81). Il participe au développement du cerveau, de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, il participe également à l'expression des récepteurs de la sérotonine 5-HT₁, à l'échange de neurotransmetteurs tels que la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline; et aux changements de protéines régulant le développement et la fonction des synapses neuronales (82). Compte tenu de ce qui précède, il est entendu que le microbiote joue un rôle dans le contrôle moteur, le comportement anxieux et les fonctions cognitives liées au développement du cerveau dès les premiers stades de la vie (83). Le concept « axe intestin-cerveau » fait alors référence aux connexions afférente et efférente entre le cerveau, le système gastro-intestinal au moyen d'éléments nutritifs et de signaux neuroendocriniens et immunologiques.

Un certain nombre de facteurs peuvent modifier la composition microbienne intestinale. Ceux-ci incluent des médicaments tels que les antibiotiques, le stress psychologique et physique, les radiations, le péristaltisme altéré ainsi que l'alimentation. Cela peut entraîner des altérations du métabolisme bactérien et une prolifération de bactéries potentiellement pathogènes. Des modifications du microbiote intestinal (une dysbiose) sont maintenant associées à plusieurs maladies telles que les MICI, le syndrome de l'intestin irritable (SII) et l'obésité. Fait important, une dysbiose peut également entraîner une perturbation de la barrière épithéliale. Il a été montré qu'un microbiote intestinal altéré pouvait induire des voies de signalisations *via* les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes (PPAR) situés sur les CEI, activant ainsi la voie NF- κ B et entraînant une perturbation de l'homéostasie intestinale (84). L'activation de la voie NF- κ B augmente les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL-1 et INF γ et par conséquent augmente également la perméabilité intestinale. En effet, la dysbiose a été associée

à une augmentation de l'IL-1 β , qui montre également une augmentation de la perméabilité intestinale en diminuant l'expression de l'occludine (62).

De plus, il a été démontré qu'une dysbiose influence la production de mucine, qui à son tour influence la fonction de barrière intestinale. Les mucines intestinales peuvent inhiber l'adhésion bactérienne aux CEI, limitant les réponses immunitaires et permettant ainsi le maintien de la fonction de barrière intestinale. En effet, il a été démontré que l'abondance de la bactérie mucolytique *Ruminococcus torques*, capable de dégrader les mucines, est multipliée par 100 lors de la dysbiose observée dans les MICI (85). La diminution des couches de mucine perturbe la fonction de barrière intestinale, entraînant une augmentation de la perméabilité intestinale et la pénétration microbienne (86).

En outre, les apports alimentaires en fibres, glucides, protéines et lipides sont également importants, car il a été rapporté que les régimes pauvres en fibres, riches en protéines et riches en graisses (HFD) augmentent l'inflammation intestinale et la perméabilité intestinale en modifiant les ratios de bactéries et de métabolites modulant l'inflammation (68). Effectivement, chez des souris rendues obèses par une HFD, la dysbiose observée au cours de l'obésité est associée à une altération de la perméabilité intestinale et l'administration d'antibiotiques semble atténuer les effets du régime hyperlipidique sur la perméabilité intestinale (87).

C. Obésité et perméabilité intestinale :

L'effet de l'obésité sur la perméabilité intestinale chez l'Homme n'est pas concluant. Des études utilisant le rapport Lactulose/Mannitol, ont montré qu'il n'y a que très peu de changements de la perméabilité de l'intestin grêle dans l'obésité chez l'Homme est légèrement augmentée (88). Ceci est corroboré par une étude de Brignardello et al, qui a examiné la perméabilité intestinale chez des volontaires obèses asymptomatiques non-fumeurs et qui n'a observé aucune différence par rapport aux témoins sains (89). En revanche, une étude de Teixeira et al, a montré que les femmes obèses présentent des taux plus élevés d'excrétion de lactulose mais pas de mannitol par rapport aux témoins sains; suggérant que la perméabilité paracellulaire de l'intestin grêle peut être altérée chez les individus obèses (90).

La majorité des études sur la perméabilité intestinale associée à l'obésité ont été menées sur des modèles de rongeurs où l'augmentation de la perméabilité causée par la HFD ou l'obésité génétique était observée de manière reproductible. Les recherches sur les mécanismes à

l'origine de l'augmentation de la perméabilité intestinale chez les modèles animaux se sont focalisées sur l'étude de l'expression des protéines de JS. Dans une étude de Brun et al, utilisant des souris génétiquement obèses (ob -/-) et (db -/-), il a été rapporté que la distribution de l'occludine et de ZO-1 était profondément modifiée dans l'intestin grêle suggérant une perturbation des liaisons de JS avec le cytosquelette et par conséquent un dysfonctionnement de la barrière intestinale (91). Les modifications induites par l'obésité dans l'expression des protéines de JS sont également corroborées par des études de Cani et al. Dans ces études, l'expression des gènes de ZO-1 et d'occludine dans l'intestin grêle est réduite chez les souris nourries avec une HFD et la distribution de ces protéines de JS est également modifiée chez les souris (ob -/-). Finalement, l'expression de ces gènes a une corrélation négative significative avec la perméabilité intestinale (92,93).

La consommation de la HFD est l'un des principaux facteurs contribuant au développement de l'obésité. Des études chez l'Homme et chez l'animal ont montré que la HFD et l'obésité sont associées à une dysbiose intestinale qui, par sa communauté bactérienne, a un impact majeur sur les fonctions immunologiques et métaboliques de l'hôte (92,94). Cette dysbiose intestinale, induite par la HFD, augmenterait les niveaux luminaux de LPS bactérien, ce qui, lors de l'activation de TLR-4, déclenche des voies de signalisation inflammatoires et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans l'intestin. Cet état inflammatoire pourrait par la suite induire des altérations majeures de la production et de l'épaisseur de la couche de mucus et par conséquent augmenter la perméabilité intestinale. Cette cascade d'événements favoriserait une translocation bactérienne (notamment le LPS) de la lumière intestinale vers la circulation et vers la périphérie des tissus, tels que le tissu adipeux, déclenchant éventuellement une inflammation systémique, l'adipogenèse, la résistance à l'insuline et l'hyperglycémie (87).

D. Stress et perméabilité intestinale :

La plupart des travaux sur les effets mécanistiques du stress sur la régulation de la barrière intestinale ont été effectués sur des modèles animaux utilisant des facteurs de stress physiques et psychologiques tels que le stress sonore, le stress thermique, le stress dû au froid, le stress lié à l'entassement, la privation maternelle et le stress lié à l'évitement de l'eau (95).

Dans des modèles animaux de dépression, Ghia et al, ont mis en évidence le rôle de la dépression dans la réactivation des modifications de la fonction de barrière intestinale. En

général, l'induction d'un dysfonctionnement de la barrière intestinale est provoquée par l'activation de l'axe des mastocytes du facteur de libération de corticotropes (CRF). La libération systémique et périphérique du CRF, ainsi qu'un large éventail de médiateurs chimiques, interviennent dans les réponses au stress dans les modèles précliniques et ont des effets sur la barrière intestinale au niveau de la composition de la couche de mucus, la sécrétion d'eau et d'ions ainsi que la perméabilité intestinale (96). Les données sur le stress psychologique chez l'Homme sont limitées. Ventura et al, ont soumis des volontaires en bonne santé à un test de parole en public. En effet, les individus présentant des signaux de stress mesurés par le cortisol salivaire, présentaient une augmentation de la perméabilité de l'intestin grêle (97). Cette augmentation dépendrait du CRF et des mastocytes, car le CRF exogène induit également une perméabilité intestinale accrue, alors qu'un stabilisant des mastocytes abolit les réponses.

Dans les monocouches de HT-29, l'exposition au CRF entraîne une expression accrue de la claudine-2 (98). Des travaux récents ont également porté sur le stress induit par l'exercice, censé représenter une combinaison de stress physique et psychologique. Les athlètes souffrent souvent de douleurs abdominales induites par la libération d'hormones du stress lors d'activités physiques intenses. Chez les soldats en formation au combat, une perméabilité intestinale accrue a également été constatée (43). En effet, lorsque des jeunes hommes en bonne santé sont exposés à des niveaux de stress élevés (six semaines d'entraînement au combat militaire), non seulement les scores d'anxiété et de dépression augmentent pendant l'entraînement au combat, mais l'excrétion urinaire du saccharose augmente ainsi que l'excrétion du sucralose à 5 et 24 h par rapport à leurs propres niveaux de base avant l'entraînement au combat. De plus, le rapport lactulose / mannitol est également plus élevé pendant l'entraînement, mais seulement chez les volontaires présentant des niveaux plus élevés de scores de sévérité des symptômes du SII (99).

Ces données suggèrent que le stress affecte la perméabilité intestinale et mettent en évidence la communication bidirectionnelle entre le système nerveux central et le tube digestif.

E. Les micro-ARN (miR) et perméabilité intestinale :

Au cours des dernières années, des études fonctionnelles et à haut débit ont montré que les miRs jouent un rôle important dans de nombreux aspects de la physiologie et du développement cellulaire. Ce sont de petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides, qui répriment l'expression des gènes cibles après la transcription et régulent divers processus

cellulaires (100). Il a été estimé que plus de 60% des gènes humains étaient la cible des miR (100). En général, les miR régulent l'expression des gènes en se liant aux régions non traduites en 3' (3' UTR) de leurs ARNm cibles en favorisant la dégradation des ARNm cibles ou en inhibant leur traduction.

Il a été démontré par plusieurs études que dans des conditions pathologiques, les miRs pouvaient entraîner une dégradation de l'ARNm des protéines impliquées dans la fonction de barrière intestinale. En effet, chez les patients SII, l'augmentation de la perméabilité intestinale paracellulaire était associée à une augmentation des taux de plusieurs miRs, dont le miR-29b (101). Ces deux miRs ont été montrés pour réguler négativement la perméabilité intestinale dans le SII en réprimant l'expression de la ZO-1 et de la glutamine synthétase, respectivement. Chez le rat SII-Diarrhéique, il a été démontré que le miR-144 favorisait l'hyperperméabilité colique en ciblant directement l'occludine et la ZO-1 (102). Une autre étude a montré qu'un traitement par TNF- α provoque une augmentation rapide de l'expression de miR-122a dans l'épithélium intestinal, tant *in vitro* qu'*in vivo*, ce qui est associé à un dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale *via* la dégradation de l'occludine (56). D'autres protéines sont également des cibles de miRs. En effet, le miR-155 et le miR-29 qui inhibent ou dégradent tous les deux la claudine-1 ainsi que le miR-145 qui réprime l'expression de JAM-1 et altère la fonction de barrière épithéliale intestinale (103).

F. Le protéasome « ubiquitination » :

L'augmentation de la perméabilité intestinale est souvent associée à une diminution de l'expression des protéines de JS. Cette diminution pourrait être le résultat des modifications épigénétiques post-transcriptionnelles telle que l'intervention des miRs discutée précédemment, ou bien post-traductionnelles par exemple par ubiquitination des protéines, impliquant un système de dégradation de protéines. L'ubiquitine est une petite protéine régulatrice hautement conservée de 76 acides aminés. Elle peut être liée à d'autres protéines en tant que modification post-traductionnelle.

Trois principaux mécanismes de dégradation des protéines opèrent dans les cellules eucaryotes pour éliminer les protéines cellulaires endocytiques ou non fonctionnelles : 1. La voie endosomale-lysosomale, qui opère dans un compartiment acide lié à la membrane. 2. La voie apoptotique procaspase-caspase. 3. La voie du protéasome 26S de la protéine ubiquitinée. Les

deux derniers sont présents dans le cytosol mais diffèrent par le mécanisme d'activation de la signalisation protéolytique.

Le protéasome 26S est une protéase multicatalytique trouvée à la fois dans le cytosol et le noyau. Ses fonctions incluent l'élimination des protéines mal repliées ou anormalement assemblées, la dégradation des cyclines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, le traitement et la dégradation des régulateurs de la transcription, les réponses immunitaires à médiation cellulaire, l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. Ces fonctions nécessitent à la fois des voies de dégradation des protéines induites par l'ubiquitine et l'ATP.

La voie d'ubiquitination dépendante de l'ATP implique une cascade de trois types différents d'enzymes étiquetant les protéines du substrat avec une chaîne d'ubiquitine, en vue de leur reconnaissance et de leur protéolyse par le protéasome 26S. Dans la première étape, l'ubiquitine est activée par une enzyme E1 de manière dépendante de l'ATP. Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée dans une enzyme E2, après quoi elle est transférée dans un résidu de lysine de la protéine cible en fonction de l'enzyme E3 impliquée, une ubiquitine ligase spécifique (104). Ce processus est répété plusieurs fois pour générer une longue chaîne de polyubiquitine attachée à la protéine substrat destinée à être dégradée par le protéasome 26S (**Figure 6**).

La structure du protéasome 26S est constituée de deux entités : une particule centrale 20S coiffée des deux extrémités d'une particule régulatrice 19S. (**Figure 7**) La particule 19S coordonne le processus de dégradation en reconnaissant les substrats polyubiquitinés, en les dépliant, en les désubiquitinant et en les transloquant à l'intérieur du complexe 20S, où ils sont dégradés en oligopeptides. Le complexe 20S exerce les activités protéolytiques. Il est composé de 28 sous-unités codées par 14 gènes différents, les sous-unités 7α et 7β , qui forment une structure cylindrique hautement conservée de quatre cycles, contenant chacun sept sous-unités. Les deux anneaux externes contiennent des sous-unités de type α dont la fonction est de maintenir une «porte» par laquelle les protéines pénètrent dans le site catalytique (105). Les sous-unités β forment les deux anneaux internes. Les sous-unités catalytiquement actives exprimées de manière constitutive sont $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$, qui présentent respectivement une activité de type caspase, trypsine-like et chymotrypsine-like. Globalement, cette architecture crée un compartiment dont les sites actifs protéolytiques sont restreints à son intérieur, de sorte que seules les protéines entrant dans cette chambre sont dégradées.

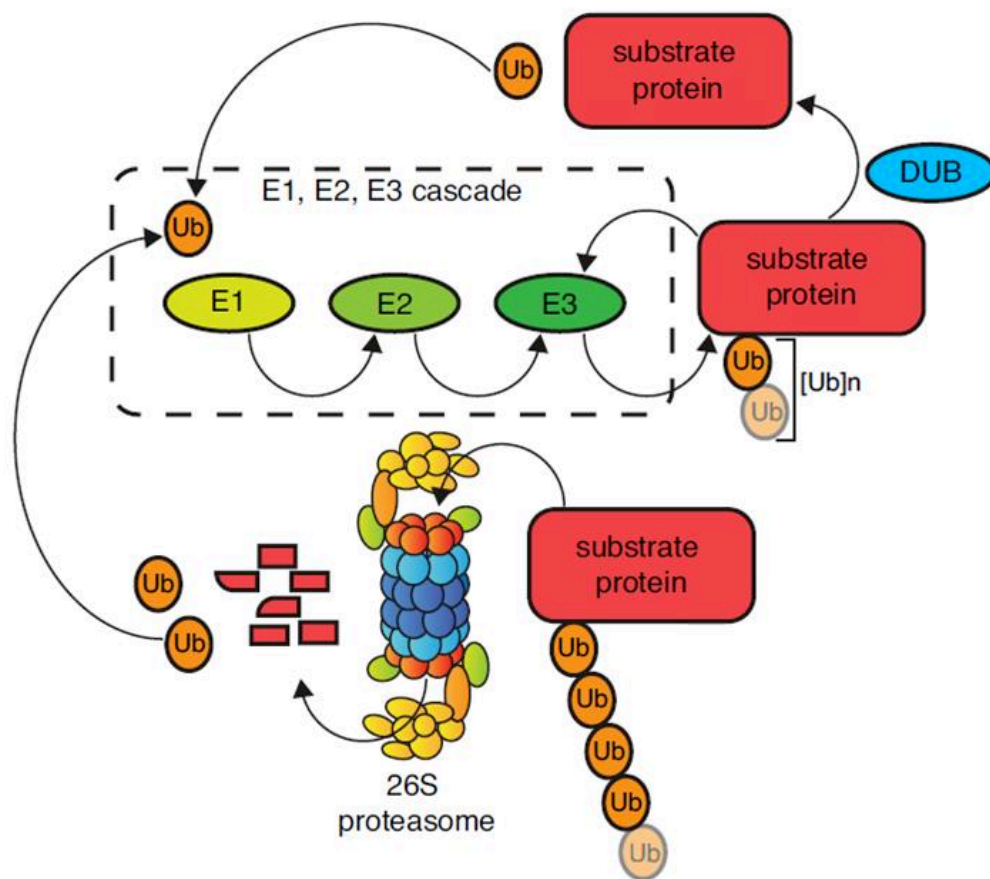


Figure 6 : Vue d'ensemble du système ubiquitine-protéasome. L'ubiquitine (Ub) est liée aux protéines du substrat par l'action successive des enzymes E1, E2 et E3. Les protéines peuvent être modifiées avec une seule molécule de mono-ubiquitine sur un ou plusieurs sites, ou avec des chaînes d'ubiquitine de différentes longueurs et types de liaisons. Les protéines de substrat modifiées avec des chaînes spécifiques sont reconnues et ensuite dégradées par le protéasome 26S.

D'après Leestemaker et Ovaa, 2017 (106)

Dans les tissus lymphoïdes, ou dans d'autres tissus après stimulation par l'IFN- γ et le TNF- α , les sous-unités constitutives β peuvent être remplacées par leurs homologues et deviennent « inductibles » nommées β 1i ou LMP2 (Large Multifunctional Protease 2), β 2i ou MECL1 (Multicatalytic Endopeptidase Complex subunit 1) et β 5i ou LMP7 (Large Multifunctional Protease 7) (107), ainsi l'immunoprotéome de caractère inductible est formé (**Figure 7**).

L'immunoprotéasome est spécialisé dans la dégradation de peptides longs et leur présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) (109). Cependant, au cours des dernières années, l'immunoprotéasome est également devenu un acteur important dans l'élimination des protéines endommagées en réponse à des conditions de stress. Ces immunoprotéasomes sont souvent rencontrés au niveau intestinal, un organe hébergeant la majeure partie des cellules immunitaires de l'organisme. Dans une étude menée par notre laboratoire, il a été montré que l'IFN- γ augmente l'activité « *chymotrypsin-like* » du protéasome dans les cellules épithéliales intestinales HCT-8, en modifiant sa composition et en particulier en augmentant l'expression de sous-unités inductibles β_i , alors que le TNF- α et l'IL-1 β n'ont aucun effet (110). Dans une autre étude, Il a été proposé, chez des patients atteints de la maladie de Crohn, que l'induction de l'immunoprotéasome par l'IFN- γ induirait une augmentation de la dégradation de l'inhibiteur I κ B α du facteur de transcription impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire, NF- κ B. La dégradation d'I κ B α par l'immunoprotéasome libère l'hétérodimère p65/p50 qui va transloquer la membrane nucléaire et aller se fixer sur les éléments de réponse de la voie NF- κ B induisant ainsi la transcription de gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-1, l'IL-2, l'IFN- γ , l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-12 (111). Cette dégradation aurait alors comme effet d'amplifier la réponse inflammatoire. Ce résultat a été confirmé par une étude de notre laboratoire, qui montre dans des cellules épithéliales intestinales, une augmentation de la dégradation d'I κ B α , après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires. Ce qui induit une augmentation de la libération d'IL-8, qui est diminuée lorsque les cellules sont prétraitées avec de la glutamine (112).

La voie de l'ubiquitine-protéasome est responsable du maintien de l'homéostasie des protéines. En conséquence, les protéasomes qui régulent la dégradation des protéines jouent un rôle essentiel dans divers processus cellulaires, notamment la survie cellulaire, l'apoptose, la signalisation cellulaire, la réparation de l'ADN et la progression du cycle cellulaire.

Les inhibiteurs du protéasome, tels que le bortézomib (BTZ), le carfilzomib et l'ixazomib, sont approuvés dans le traitement du myélome multiple (113). Ces inhibiteurs du protéasome sont également efficaces dans le traitement des lymphomes à cellules du manteau et des lymphomes non hodgkiniens (114,115). L'intérêt médical concernant la modulation de la fonction du protéasome à des fins thérapeutiques, a considérablement augmenté au cours de cette dernière décennie. Plus particulièrement, depuis que le premier inhibiteur du protéasome, le bortézomib (Velcade®, PS341), a été approuvé par la Food and Drug Association (FDA) en 2003, pour le traitement du myélome multiple (116).

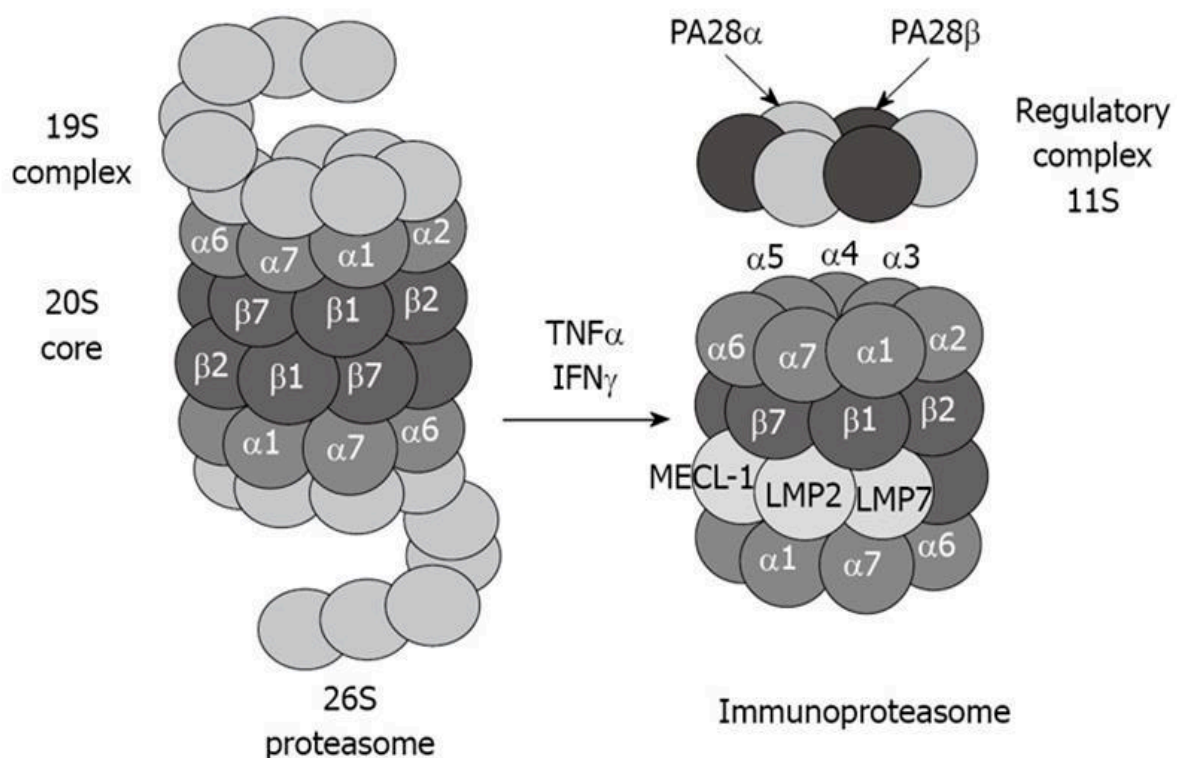


Figure 7 : Mise en place des sous-unités inducibles de l'immunoprotéasome en présence de $\text{TNF-}\alpha$ et d' $\text{IFN-}\gamma$.

Le $\text{TNF-}\alpha$ et l'interféron $\text{IFN-}\gamma$, les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ du protéasome sont remplacées par leurs homologues inducibles LMP2 ($\beta 1i$), MECL-1 ($\beta 2i$), LMP7 ($\beta 5i$). Ces dernières correspondent aux sous-unités actives de l'immunoprotéasome.

D'après Bardag-Gorce, 2010 (107).

C'est un peptide boronate présentant une affinité plus importante pour la sous-unité $\beta 5$ du protéasome, régulant l'activité « *chymotrypsin-like* ». La BTZ induit directement l'apoptose des cellules tumorales, inhibe l'activation de NF-KB, induit un arrêt du cycle cellulaire et bloque la production et la signalisation intracellulaire de l'IL-6 dans les cellules de myélome par la stabilisation de protéines, notamment les protéines de Bid, Bax, P53, IKB α , p21 et p27 (117). Cependant, son action n'est pas toujours efficace. En effet, une étude de notre laboratoire, montre que le bortézomib ne permet pas de prévenir l'apparition de fibrose dans un modèle de

colite chimio-induite chez le Rat (118). D'autres études sont nécessaires, afin de mieux appréhender son action, notamment dans les pathologies intestinales.

D'autres modèles ont été utilisés pour tester d'autres inhibiteurs plus spécifiques du protéasome, c'est le cas du PR-957 (selective epoxyketone proteasome inhibitor) renommé récemment ONX-0914, inhibiteur sélectif de l'immunoprotéasome. Il a été mis en évidence que l'inhibition de l'immunoprotéasome par le ONX-0914, diminue fortement la colite induite au DSS. Dans cette étude, des souris invalidées, soit pour le gène codant pour la sous-unité $\beta 2i$ (ou MECL1), soit $\beta 1i$ (ou LMP2) ou $\beta 5i$ (ou LMP7) montrent également une diminution de la colite. De plus, la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires chez les souris traitées par ONX-0914, est diminuée conduisant ainsi à une réduction de l'inflammation (119). Ces résultats suggèrent que l'inhibition spécifique de l'immunoprotéasome pourrait être une piste thérapeutique potentielle afin d'atténuer les symptômes associés aux MICI chez l'Homme.

Il a été suggéré l'implication du système ubiquitine-protéasome dans la régulation de la composition du complexe de JS de la couche endothéliale affectant ainsi sa perméabilité. La claudine-5 est un membre important des protéines de JS, impliquée dans la détermination de la sélectivité de la barrière hémato-encéphalique. Il a été démontré que le taux d'expression de la Claudine-5 était régulé par le biais de voies du protéasome. Il a également été montré que l'inhibition du protéasome prolongerait la demi-vie de la claudine-5 étant connue très courte ainsi que son accumulation (34).

Plusieurs études sur la barrière épidermique ont montré que l'expression de la claudine-1 est diminuée lors des lésions retrouvées dans la dermatite atopique (120). La claudine-1, étant dégradée par la voie de l'ubiquitine-protéasome, est augmentée à la suite de l'inhibition du protéasome *via* le BTZ, ce dernier semble être efficace dans le traitement des maladies de la peau, telles que la Dermatite atopique (DA) (121).

Concernant les protéines de JS de la barrière intestinale, Il a été montré, dans une étude menée dans notre laboratoire, qu'au cours du SII, une augmentation de l'activité « *trypsin-like* » du protéasome était associée à une augmentation de la dégradation de l'occludine. La dégradation de l'occludine était diminuée après traitement par un inhibiteur du protéasome, suggérant ainsi une implication du protéasome dans la physiopathologie du SII (122). Il a également été mis en évidence, une interaction entre l'ubiquitine-ligase E3, nommée Itch, avec l'occludine. Itch est

spécifiquement impliquée dans l'ubiquitination de l'occludine *in vivo*. De plus la dégradation de l'occludine est sensible à l'inhibition du protéasome (123).

L'inhibition du protéasome semble donc être une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de plusieurs maladies : cancéreuses, inflammatoires et pourrait éventuellement rétablir la fonction de barrière épithéliale intestinale.

II. MALADIES ASSOCIEES AU DYSFONCTIONNEMENT DE LA BARRIERE INTESTINALE :

1. Le syndrome de l'intestin irritable :

A. Définition et épidémiologie :

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) fait partie des troubles fonctionnels intestinaux (TFI) chroniques, caractérisé par des symptômes digestifs (douleurs abdominales, ballonnement) et/ou troubles du transit intestinal (diarrhée, constipation ou alternance des deux). L'ethnie, l'âge, le sexe ou encore le statut social, ne représentent pas des facteurs causaux de la maladie. Le SII est répandu dans les pays développés et sa prévalence est estimée entre 9 et 23% de la population totale (124). Le taux de morbidité chez la population adulte est de 200/100 000 personnes / an (125). Dans les pays européens et aux États-Unis, la prévalence du SII en 2012 était comprise entre 7 et 30% de la population (126), les femmes étant plus fréquemment touchées (2 : 1) (124). En France, selon l'étude de Lepluart et al, la prévalence du SII en 2015 était d'environ 4,7 % de la population (127). La plupart des patients au moment du diagnostic avaient moins de 50 ans (128).

La compréhension de cette maladie a connu une évolution rapide avec les progrès scientifiques, mais elle a été reconnue historiquement il y a plus de 150 ans. En 1849, Cumming déclara : « Les intestins sont à la fois constipés, d'autres laxistes, chez la même personne. Je ne prétends pas expliquer en quoi cette maladie présente deux symptômes si différents » (129). Depuis 1979, les critères de diagnostic ont évolué, lorsque Manning et al, groupe d'expert travaillant sur les TFI, ont publié leurs critères pour la première fois. Les changements ont inclus les critères de Rome I (130), qui ont été révisés selon les directives de Rome II (131), puis par Rome III (132) afin de faciliter le diagnostic.

Actuellement, le SII est défini, selon les critères de diagnostic de ROME IV, comme un TFI caractérisé par des douleurs abdominales chroniques associées à la défécation ou à des modifications du transit (133). Ces symptômes doivent se manifester depuis au moins 6 mois avant le diagnostic et être présents sur les 3 derniers mois (**Tableau 2**) (134).

La sévérité du SII peut être simplement évaluée à l'aide de questionnaires *via* l'échelle de sévérité des symptômes du SII « score de Francis », un instrument à 5 éléments, utilisé pour mesurer la sévérité et la fréquence des douleurs abdominales, la sévérité de la distension abdominale, le niveau d'insatisfaction du transit intestinal et l'interférence avec la qualité de vie,

chacune sur une échelle visuelle à 100 points. Trois groupes de patients sont ainsi distingués : patients SII avec symptômes légers, modérés ou sévères (135).

Tableau 2 : Critères de diagnostic du SII (ROME IV).

D'après Mearin et al, 2016. Drossman, 2016 (133,134)

Critère du diagnostic du SII selon les critères de ROME IV	Types de selles (Echelle de Bristol)
Douleurs abdominales chroniques, en moyenne, au moins 1 jour par semaine au cours des 3 derniers mois, associées à au moins 2 des critères suivants : - Défécation - Changement de fréquence des selles - Changement de la consistance des selles Les critères doivent être remplis au cours des 3 derniers mois avec l'apparition des symptômes au moins 6 mois avant le diagnostic.	
Les sous-groupes se définissent en fonction de la consistance des selles selon l'échelle de Bristol ci-joint.	
SII avec constipation prédominante (SII-C) : Bristol 1-2 > 25% du temps, Bristol 6-7 < 25% du temps	
SII avec diarrhée prédominante (SII-D) : Bristol 6-7 > 25% du temps, Bristol 1-2 < 25% du temps	
SII mixte avec alternance diarrhée/constipation (SII-M) : Bristol 1-2 > 25% du temps, Bristol 6-7 > 25% du temps	
SII post-infectieux (SII-PI) : Caractéristiques proches du type SII-D, survient suite à une gastro-entérite aiguë.	
SII non spécifié : Absence de critères suffisants pour répondre aux critères du SII-C, SII-D, SII-M ou SII-PI	

De plus, sur la base des critères de ROME IV, les patients SII sont classés en 4 sous-types en fonction du trouble du transit prédominant *via* l'échelle des selles de Bristol (Bristol Stool Scale) : patients avec constipation prédominante (SII-C), avec diarrhée prédominante (SII-D) ou mixité par alternance de diarrhée et constipation (SII-M). Les patients répondants aux critères de diagnostic du SII, mais dont le trouble du transit ne peut pas être classé dans l'un des 3 groupes, doivent être catégorisés par le sous-type SII indéterminé (**Tableau 2**). Le SII post-infectieux ou appelé aussi SII post-inflammatoire (SII-PI) est un autre type de SII qui présente souvent les caractéristiques du SII-D et peut survenir chez 4% à 31% des patients après une gastro-entérite aiguë, provoquée généralement par un ensemble d'agents pathogènes tels que *Shigella spp.*, *Escherichia coli* pathogène, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* et *Giardia duodenalis* (136).

Les selles sont évaluées à l'aide de l'échelle des selles de Bristol (BSFS), qui présente 7 types : constipation de type 1 et 2, 3 et 4 - selles normalement d'une personne en bonne santé, tandis que les types 5 à 7 correspondent à une diarrhée (137) (**Tableau 2**).

Cette classification des patients SII en sous-types aide à améliorer l'homogénéité des patients recrutés pour les essais cliniques, à mieux gérer le diagnostic et les diverses interventions thérapeutiques par catégorie de patients SII. Dans la pratique clinique courante, le diagnostic du SII est fondé sur les symptômes typiques. Le recours aux investigations est souvent limité à un panel de tests sélectionnés qui permettent d'exclure des maladies organiques connues présentant des symptômes similaires, telles que la maladie cœliaque, la colite, les MICI (y compris la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique), la malabsorption des acides biliaires, le cancer colorectal. L'examen complémentaire ne permet pas à lui seul de faire le diagnostic du SII. Le diagnostic est basé sur l'histoire de la maladie, l'examen clinique, les tests biologiques et lorsque nécessaire, une coloscopie ou d'autres tests de diagnostic. Afin de poser un diagnostic précis du SII, il est recommandé d'intégrer la positivité des critères de ROME IV à la normalité de l'examen clinique, des tests biologiques et endoscopiques (133).

Contrairement aux autres maladies gastro-intestinales, le traitement du SII est souvent ciblé sur le symptôme prédominant ou le plus gênant que ressent le patient, plutôt que sur la physiopathologie sous-jacente. En conséquence, les traitements ne sont pas suffisamment efficaces et la plupart des interventions thérapeutiques ne modifient pas l'évolution naturelle du trouble à long terme (139). La prévalence et la faible réponse aux thérapies établies pour le SII ont eu un impact économique substantiel (140). Bien qu'il n'y ait pas de surmortalité associée au SII (141), ce trouble a un effet considérable sur la qualité de vie et la productivité du travail. En 2014, Canavan et al, ont estimé que les patients abandonneraient de 10 à 15 ans d'espérance de vie pour une guérison immédiate de la maladie. Ainsi, diagnostiquer le SII avec précision, minimiser les investigations invasives et recommander un traitement efficace jouent un rôle important dans les efforts visant à réduire les effets sociaux et économiques de la maladie (142).

En résumé, le SII est un trouble gastro-intestinal commun qui présente des taux de comorbidité élevés, réduit la qualité de vie des patients et exerce un impact négatif important sur les ressources monétaires des patients et de la société. En conséquence, une meilleure compréhension des mécanismes potentiellement impliqués dans la génération des symptômes est cruciale.

B. Physiopathologie du SII :

Doté d'une physiopathologie imparfaitement comprise, le SII est reconnu comme étant une pathologie multifactorielle. Des facteurs génétiques, environnementaux ou encore psychosociaux augmentent le risque de développer un SII. Les symptômes, sont liés à un dysfonctionnement de communications bilatérales entre le SNC et le système nerveux entérique (SNE). Il en résulte une hypersensibilité viscérale, une hyperperméabilité intestinale, des modifications du microbiote intestinal, une réponse immunitaire voire inflammatoire, des altérations de la motricité intestinale ainsi qu'un dysfonctionnement du dialogue intestin-cerveau (143).

a. Stress et axe intestin-cerveau :

Il a longtemps été démontré que la détresse psychologique et émotionnelle était étroitement associée au SII. Pendant de nombreuses années, le SII a été considéré comme une maladie à médiation cérébrale agissant à travers une modulation exercée par le SNC sur l'intestin *via* le système nerveux autonome (SNA) et l'axe hypothalamique / hypophyso-surrénalien (HPA) (144). Ce substrat neuro-anatomique est un circuit intégré complexe qui transmet des informations provenant de centres cognitifs et émotionnels au TGI et inversement (145). Il comprend le SNC et le SNA (sympathique-SNS et parasympathique-SNP), le SNE, les systèmes neuro-endocrinien et neuro-immunitaire (146). Le TGI est densément innervé afin de fournir des informations sur son contenu luminal, les processus régulant la digestion et l'absorption, ainsi que les menaces potentielles (147). Les fibres sensorielles afférentes gastro-intestinales se terminant dans la paroi de l'intestin expriment un ensemble de récepteurs membranaires et de canaux ioniques qui permettent d'obtenir des informations sur la distorsion de l'épithélium muqueux et du contenu luminal. Ces neurones activent les réponses locales et transmettent des informations sensorielles *via* le nerf vague et les afférences rachidiennes à la moelle épinière ou au tronc cérébral en vue d'un traitement et d'une intégration plus poussés (148). Depuis la moelle épinière, les signaux ascendants de l'intestin atteignent le cerveau par les voies de la colonne antérolatérale et dorsale où ils sont relayés vers les noyaux ventraux du thalamus et vers les zones des cortex somatosensoriels primaires et secondaires pour la localisation, l'intensité et la durée de la douleur et enfin vers les zones limbiques pour la composante émotionnelle de la réponse à la douleur (149). Le système immunitaire joue un rôle intermédiaire important dans la fonction de l'axe intestin-cerveau. Une réponse inflammatoire anormale à différents événements (stress, infection, aliments, etc.) pourrait être responsable de

la cellularité pathologique et de la présence de cytokines inflammatoires au niveau cérébral et intestinal, affectant les nerfs sensoriels en modifiant leur activité et en augmentant la sensibilité.

Le système neuroendocrinien, potentiellement impliqué dans la pathogenèse du SII, comprend deux composantes : des cellules endocrines disséminées dans la muqueuse intestinale et les fibres nerveuses du SNE. Il modifie la motilité, la sécrétion, l'absorption et la microcirculation intestinale grâce à la production de substances transmissives telles que la sérotonine, *via* le système vasculaire (endocrinien) ou par des nerfs intrinsèques / extrinsèques (151).

Il existe de nombreuses preuves que la fonction de l'axe intestin-cerveau subit certains changements au cours du SII. Les troubles psychologiques ou les troubles de l'humeur chez les patients SII, peuvent être responsables d'une perturbation de l'activité du SNA. En effet, son activité est plus faible chez les femmes atteintes d'un SII et souffrant d'anxiété ou de syndrome dépressif (152). Des changements sont également retrouvés dans les fonctions sympathiques et parasympathiques. En effet, au cours d'un stress aigu, il existe une activation du SNS et une inhibition du SNP. Les nerfs parasympathiques ont pour rôle de ralentir les principales fonctions de l'organisme telles que l'activité cardiaque et la respiration tandis que l'activité digestive est accélérée.

Des études ont montré qu'un taux anormal de sérotonine (5-HT) dans le tube digestif pourrait être l'une des causes du SII (153). Cette 5-HT présente un effet important sur l'humeur et sur les mouvements intestinaux, ce qui pourrait expliquer pourquoi de nombreux patients sont touchés par la dépression et l'anxiété. De même, l'induction du stress dans des modèles murins de séparation maternelle précoce a montré une altération de c-fos (marqueur de l'activation neuronale) et une concentration élevée de 5-HT au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, ce qui pourrait produire une sensibilisation (154). L'anxiété et la dépression sont retrouvées chez 22% des patients SII dont 32% de ces patients ont subi un abus physique et/ou sexuel (155). L'anxiété et la dépression sont en lien étroit avec l'altération de « l'axe HPA-CRF ». De plus, il est établi que le stress présente un facteur majeur dans la symptomatologie liée au SII (132). En effet, chez les rongeurs, l'administration du « *Corticotropin Releasing Factor* » CRF, principal neuromédiateur du stress, augmente significativement l'anxiété, ce qui stimule la motricité colique et induit une hypersensibilité (156). L'utilisation d'antagonistes au CRF, comme le NBI 35965, qui agit sur le récepteur au CRF1, a pour effet d'atténuer l'anxiété liée au stress et de diminuer l'hypersensibilité viscérale et gastrique ainsi que l'activité colique chez la Souris (157).

Dans les modèles animaux, il existe un lien clair entre stress, augmentation de la perméabilité et inflammation de l'intestin. Les rongeurs exposés à un stress aigu montrent une augmentation de la perméabilité de la muqueuse aux macromolécules par le biais de mécanismes impliquant principalement le CRF, les mastocytes et les nerfs cholinergiques (158,159). Le stress chronique induit une augmentation accrue de la perméabilité intestinale, de la pénétration bactérienne et de l'infiltration de cellules inflammatoires (160). En outre, Barreau et al, ont montré que, chez des rats adultes précédemment stressés par privation maternelle néonatale, le CRF favoriserait la libération du « *nerve growth-factor* » (NGF) par les mastocytes coliques via le récepteur CRF 1 et, par conséquent, une augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale (161). Dans une autre étude, utilisant un modèle intestinal *ex vivo*, des échantillons d'iléon porcins étaient montés dans des chambres de Ussing et exposés au CRF. Les résultats ont démontré un rôle du CRF dans l'augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale *via* la libération du TNF- α et des protéases dépendantes des mastocytes (162).

De plus, Wallon et al, ont évalué *in vitro* les effets fonctionnels du CRF sur des biopsies intestinales humaines. Ils ont constaté que le CRF active les mastocytes sous-épithéliaux et augmente l'absorption transcellulaire d'antigènes protéiques dans la muqueuse colique humaine. Les récepteurs CRF 1 et CRF 2 s'avèrent exprimés sur les mastocytes et l'utilisation des antagonistes de ces récepteurs a inhibé l'augmentation de la perméabilité évoquée par le CRF. Ces résultats suggèrent que le CRF, agissant *via* les mastocytes, est impliqué dans la régulation de la perméabilité macromoléculaire dans le côlon humain (163).

b. Motricité intestinale :

La douleur est un critère drastique dans le diagnostic de la symptomatologie du SII, elle est chronique, liée aux troubles de la motricité gastro-intestinale et causée par une hypersensibilité viscérale. Les patients atteints du SII montrent une forte réponse motrice aux facteurs de stress comparés aux sujets normaux (134). Le trouble de motricité de l'intestin grêle se manifeste par un transit accéléré chez les patients SII-D et par un retard du transit chez les patients SII-C. En outre, les patients présentent des intervalles plus courts entre les complexes moteurs migratoires, les patients SII-D étant les plus concernés (164). La sérotonine semble jouer un rôle important dans le contrôle de la motricité intestinale. Effectivement, il a été démontré que les concentrations plasmatiques de sérotonine étaient réduites chez les patients SII-C, mais augmentées chez les patients SII-D. Par conséquent, les récepteurs à la sérotonine

ont suscité un intérêt considérable en tant que cibles thérapeutiques potentielles du SII, avec des agonistes ou antagonistes au niveau du récepteur de la sérotonine (165). Sept types principaux et plusieurs sous-types de récepteurs 5-HT ont été identifiés. Les récepteurs 5-HT connus pour affecter les fonctions motrices de l'intestin sont ceux appartenant aux sous-types 5-HT1, 2, 3, 4 et 7 (166). La libération muqueuse de 5-HT stimule à la fois les neurones sensoriels intrinsèques (le plus probablement *via* les récepteurs 5-HT4) et les neurones sensoriels extrinsèques (*via* les récepteurs 5-HT3) (167). L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs 5-HT3, a montré un retard du temps de transit colique chez les sujets sains et semble ralentir le transit colique chez les patients atteints de SII-D (168,169). Les agonistes des récepteurs 5-HT4 facilitent simultanément l'activité des neurones inhibiteurs à médiation nitrenergiques, induisant la libération d'oxyde nitrique pour contrecarrer la contraction, et les neurones cholinergiques excitateurs myentériques, améliorant la libération de l'acétylcholine et la contraction des muscles lisses, lesquels favorisent à leur tour la motilité des voies gastro-intestinales. (170). Il a été démontré que les agonistes des récepteurs 5-HT4 pouvaient agir sur les récepteurs exprimés par les cellules entérochromaffines, les cellules caliciformes et les entérocytes de la muqueuse intestinale, entraînant la libération de 5-HT, la libération de mucus et la sécrétion de chlorure, chacun pouvant favoriser le transit colique (171). Outre leurs effets procinétiques, il a été montré une réduction de l'hypersensibilité viscérale *via* les agonistes de la 5-HT4, chez les animaux et les patients atteints du SII (171,172).

En outre, plusieurs études ont démontré le rôle joué par les différentes bactéries intestinales dans la motricité intestinale. Dans une étude faite sur des rongeurs, des rats axéniques avaient un transit intestinal lent et une période de complexe myoélectrique interdigestif prolongée (173). La colonisation de ces animaux par *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium bifidum* augmenterait partiellement leur motricité intestinale, alors que la colonisation par *Escherichia coli* et *Micrococcus luteus* a l'effet inverse (174). Cette étude montre finalement l'effet d'une dysbiose intestinale sur la motricité intestinale. Le mode d'action des bactéries et les mécanismes impliqués dans les troubles de motricité restent jusqu'à aujourd'hui mal connus (173).

c. Hypersensibilité viscérale :

Certains patients atteints du SII présentent une forte réponse à la distension de la lumière intestinale, à savoir l'hypersensibilité viscérale (VH) (175). Les facteurs qui

déclenchent une douleur viscérale chronique ne sont pas bien déterminés, mais plusieurs mécanismes d'origine multifactorielle semblent être impliqués. En réponse à un événement déclencheur tel qu'une inflammation, un traumatisme ou un stress environnemental, les afférences viscérales primaires de l'intestin deviennent sensibilisées, ce qui entraîne une douleur viscérale chronique chez les patients atteints du SII (176).

D'un autre côté, la survenue d'événements stressants est considérée comme un facteur contributif déclenchant et / ou maintenant le SII. En réponse aux facteurs de stress, il en résulte une dérégulation de la signalisation du CRF qui perturbe le dialogue intestin-cerveau induisant une hypersensibilité colique et par conséquent, contribue à la douleur viscérale chronique. Le CRF possède deux récepteurs couplés à la protéine G aux effets opposés sur le comportement. Un récepteur de type 1 (CRF 1) qui active la réponse au stress et améliore la nociception, et un récepteur de type 2 (CRF 2) qui inhibe la réponse au stress et diminue la nociception chez les rongeurs (177). Des études antérieures ont démontré que le stress augmente l'expression du CRF dans le cerveau et l'intestin et que l'inhibition des récepteurs du CRF dans le cerveau et à la périphérie par des antagonistes, inverse l'hypersensibilité viscérale induite par le stress (178,179).

En outre, l'implication de processus épigénétiques dans le développement de la douleur viscérale lors des troubles gastro-intestinaux fonctionnels a été suggérée. Effectivement, plusieurs études ont démontré que la désacétylation des histones peut favoriser la douleur viscérale et que les inhibiteurs de « l'histone désacétylase » (HDAC) atténueraient la douleur viscérale en augmentant les niveaux d'acétylation des histones. En effet, il a été démontré que la perfusion bilatérale d'un inhibiteur de HDAC dans le noyau central de l'amygdale du rat augmentait l'acétylation de « lysine 9 de l'histone 3 » (H3K9), augmentait l'expression des récepteurs de glucocorticoïdes, diminuait l'expression de CRF et atténuait l'hypersensibilité viscérale induite par des corticostéroïdes. En effet, une exposition prolongée du noyau central de l'amygdale à des taux de corticostéroïdes élevés permet d'imiter les effets d'un stress chronique (180). En outre, l'hypersensibilité viscérale, induite par le stress chronique lié à l'évitement de l'eau, était associée à une augmentation de la méthylation de l'ADN du promoteur récepteurs de glucocorticoïdes et à une diminution de la méthylation de l'ADN du promoteur des gènes codant pour le CRF dans le noyau central de l'amygdale, ce qui a diminué l'expression des récepteurs de glucocorticoïdes et l'augmentation de l'expression du CRF (181). Le stress chronique lié à l'évitement de l'eau a également augmenté l'acétylation de H3, ce qui a entraîné une augmentation de l'expression et de la fonction du récepteur « *nociceptif transient*

receptor potential vanilloïde 1 » (TRPV1) (182). Le TRPV1 est un canal cationique dépendant du ligand qui est exprimé sur les neurones sensoriels afférents primaires périphériques et qui, une fois activé (par la température, la capsaïcine, le pH acide, la résinératoxine et / ou les médiateurs inflammatoires), produit une sensation de brûlure et / ou une douleur. Des patients atteints de SII-D ont montré une augmentation de l'expression de TRPV1 dans les biopsies du côlon, qui était corrélée à la douleur abdominale (184).

Par ailleurs, il a été démontré au niveau du TGI, l'implication d'un ensemble particulier de miR, dans la physiopathologie du SII. Notamment, dans l'hypersensibilité viscérale où une étude montre que l'expression de TRPV1 était ciblée par le miR-199. Dans cette étude, des patients atteints du SII-D présentaient une diminution de l'expression de miR-199 dans le côlon qui était corrélée aux douleurs viscérales chroniques et aux nociceptions, *via* une augmentation de l'expression de TRPV1. Des résultats similaires ont été retrouvés chez le rat au niveau colique (185). Cependant, les modifications épigénétiques restent un champ large de recherche et leur implication dans la douleur viscérale en est encore à ses débuts, les études cliniques sont rares et repose principalement sur des études chez l'animal.

En outre, il a été démontré une distance significativement réduite entre les mastocytes et les terminaisons nerveuses chez les patients atteints du SII, par rapport aux sujets sains (186). Cette interaction favorisée entre neurones et mastocytes dans le cadre d'une pathologie douloureuse pourrait impliquer la libération de protéases de mastocytes et l'activation ultérieure de PAR2 sur les neurones sensoriels de ces patients. Dans l'étude de Cenac et al, une activité protéolytique augmentée a été constatée dans le milieu de culture des biopsies prélevées chez des patients SII par rapport aux contrôles sains (187). Cette activité protéolytique était capable de signaler aux neurones sensoriels et de reproduire les symptômes d'hypersensibilité chez les souris injectées dans la lumière colique par le surnageants obtenu à partir de biopsies de patients atteints du SII (187). Enfin, il a été montré que les signaux de calcium dans les neurones sensoriels et l'hypersensibilité chez ces souris, étaient entièrement dépendants de PAR2 (187). En effet, les neurones de souris déficientes en PAR2 ne répondaient pas à ces surnageants, et les souris déficientes en PAR2 ne développaient pas de symptômes d'hypersensibilité lorsqu'elles étaient administrées avec des surnageants issus de biopsies de patients SII (187).

Outre la douleur viscérale, le SII se caractérise également par une dysbiose du microbiote intestinal, une augmentation de la perméabilité intestinale, et un état d'activation accru des cellules immunitaires.

d. Microbiote intestinal :

Une dysbiose du microbiote intestinal est considérée comme un facteur physiopathologique important dans le SII. Il a été démontré que les patients atteints du SII avaient un microbiote très différent de celui des témoins sains. Les patients SII présentaient plusieurs altérations qualitatives et quantitatives du microbiote fécal (188). La différence dans la composition du microbiote intestinal a été aussi retrouvée entre les sous-types de patients SII. Une augmentation du ratio *Firmicutes* / *Bacteroides* (ratio considéré comme indicateur approximatif d'une dysbiose intestinale) a été constaté au cours du SII (189). Effectivement, une étude a montré une abondance relative de bactéries pro-inflammatoires, y compris des *Enterobacteriaceae* au cours du SII, avec une réduction de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* (190). Les échantillons de muqueuse et des selles de la majorité de patients SII, présentaient une diminution des Bifidobactéries (191). De plus, Kassinen et al, ont montré par extraction de l'ADN génomique bactérien dans des échantillons de fèces de patients SII, une altération et une modification de la composition du microbiote dépendante de la forme prédominante du SII, comparativement aux patients sains (192). Plus particulièrement dans le SII-D, on retrouve un taux significativement plus élevé d'*entérobacteriaceae* et plus bas de *faecalibacterium prausnitzii* par rapport aux patients contrôles, ce qui suggère un déséquilibre de la balance entre les bactéries bénéfiques et délétères nécessaires pour l'équilibre du microbiote intestinale (193). Il a été démontré que les probiotiques pouvait normaliser la motricité intestinale, améliorer la fonction de barrière intestinale, réduire les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires et améliorer l'hypersensibilité viscérale (194). Dans une méta-analyse de 2014, les probiotiques en général se sont révélés être des traitements efficaces contre le SII, ils ont amélioré les symptômes globaux, les douleurs abdominales, les ballonnements et les flatulences (195).

Le SII est également associé à une augmentation de la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) dans le côlon qui pourrait contribuer aux modifications de la réponse à la douleur viscérale et à la motilité qui caractérisent le SII. Des modifications de la fonction cérébrale et du comportement ont également été associées à des métabolites bactériens, tels que les AGCC, *via* diverses voies métaboliques (196). En outre, une découverte intéressante a associé la production de méthane au SII, en montrant des taux de méthane élevé chez les patients SII-C et au contraire, des taux diminués de celui-ci chez les patients SII-D (197). Effectivement, le méthane a été associé à un ralentissement du transit intestinal et sa production semble être limitée aux *Methanobacteriaceae* qui convertissent l'hydrogène en méthane au niveau de l'intestin (198,199). Les patients SII-C présentent une quantité accrue de *Methanobrevibacter*

smithii, un méthanogène le plus commun trouvé dans la lumière intestinale. Enfin, une dysbiose intestinale peut activer une réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale qui pourrait conduire à une inflammation de bas-grade.

e. Inflammation intestinale :

Le SII a été considéré comme un trouble exclusivement fonctionnel, mais des études récentes ont montré des signes d'inflammation de bas grade au niveau de la muqueuse colique et iléale de certains patients SII, comparés aux contrôles (200). Les causes de cette réponse immunitaire au niveau intestinal chez les patients SII ne sont pas très claires, mais un certain nombre de mécanismes, notamment les allergies alimentaires non détectées (201), des infections antérieures (SII-PI), une malabsorption des acides biliaires (202), un dysfonctionnement de la barrière épithéliale, une dysbiose intestinale, et niveaux de stress élevés, peuvent renforcer ou stimuler des réponses immunitaires anormales.

Des biopsies collectées à partir du côlon de patients atteints du SII ont mis en évidence une augmentation de la densité et de l'activation des lymphocytes T, ce qui concorde avec l'hypothèse d'une activation immunitaire de bas grade dans le processus physiopathologique du SII (204). Outre l'augmentation de l'activité du système immunitaire inné, les molécules immunorégulatrices, notamment les cytokines pro- et anti-inflammatoires, sont également modifiées chez les patients SII, au profit d'une augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-8) et une diminution des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) dans les cellules mononucléées du plasma et du sang périphérique (PBMC) (205).

Il a été récemment montré que l'inflammation muqueuse de bas grade pouvait entraîner une altération de la motilité du côlon et de la sensibilité viscérale. Dans une étude récente, les concentrations sériques du TNF- α et de l'IL-17 ont été positivement corrélées à l'inconfort et à la sévérité des symptômes chez les patients SII (206). Néanmoins, la mesure des niveaux de cytokines dans le sérum et la muqueuse intestinale dans une autre étude ne fournissait aucune corrélation entre la sévérité globale des symptômes et l'expression des cytokines, bien que les niveaux d'IL-6 et d'IL-8 aient légèrement augmenté dans le groupe SII (207).

Les mastocytes ont également fait l'objet de plusieurs études évaluant les mécanismes présumés impliqués dans la génération des symptômes du SII (186). Elles régulent l'immunité innée par

les TLR. L'expression des TLR au niveau des mastocytes intestinaux semble être associée aux symptômes du SII, comprenant TLR2 et TLR4 (208). Les composants bactériens dans l'intestin tels que les LPS peuvent jouer le rôle de ligands du TLR. Fait intéressant, une augmentation du taux d'anticorps spécifiques du LPS au niveau sérique, associée à une augmentation de l'expression du TLR (TLR4 et TLR5), a été observée chez des patients atteints du SII (209). Dans une autre étude, une infiltration accrue de mastocytes a été montrée dans la muqueuse du caecum de patients atteints du SII, par rapport aux témoins sains (186). D'autres chercheurs ont signalé une augmentation du nombre de mastocytes dans l'iléon (210). Alors que ces études ont associé le nombre de mastocytes présent au niveau intestinal à la symptomatologie du SII, d'autres études ont montré que la présence en nombre élevé de cellules mastocytaires n'est pas une condition préalable à l'inflammation. Par conséquent, l'activation et la dégranulation de celles-ci en plus de leur proximité avec les nerfs intestinaux est directement associée à la manifestation et à la gravité des symptômes du SII. Cette association spatiale étroite est considérée comme un élément clé dans la communication entre le système immunitaire et le système nerveux dans l'intestin (186).

f. Hyperperméabilité intestinale :

La recherche en gastro-entérologie s'est longtemps focalisée sur la barrière intestinale et son rôle dans le SII et fait l'objet de nombreuses études. La plupart des études montrent une augmentation de la perméabilité intestinale chez les patients atteints du SII-D et du SII-PI. Spiller et al, ont détecté une hyperperméabilité intestinale, mesurée par une augmentation du rapport lactulose / mannitol dans l'urine, chez les patients atteints du SII-PI comparés aux témoins sains (211). Le mécanisme d'augmentation de la perméabilité chez les patients atteints du SII implique un dysfonctionnement des JS (212).

L'inflammation intestinale est également décrite comme un facteur d'augmentation de la perméabilité intestinale, non seulement dans les maladies inflammatoires de l'intestin, mais aussi dans le SII. Il a été montré l'implication du PAR-2, un récepteur cellulaire de la famille des récepteurs activés par la protéase (PARs), dans l'inflammation de la muqueuse intestinale (213). Les résultats immunohistochimiques ont montré que le PAR2 est exprimé dans différents types cellulaires de l'intestin. Dans les entérocytes, le PAR2 est situé à la fois sur les surfaces apicale et basolatérale, ce qui suggère que ce récepteur pourrait être activé par des agents de la lumière ainsi que par les protéinases en circulation. Il semblerait que seule la stimulation apicale

du PAR2 augmente la perméabilité paracellulaire (214). Au cours du SII, il a été montré un rôle des mastocytes dans la perméabilité intestinale. En effet, leur dégranulation entraîne une diminution de l'expression des protéines de JS, telles que la ZO-1, la claudine-1, probablement *via* la libération des tryptases (212). La tryptase, la protéase la plus abondante des mastocytes, active le PAR-2 sur les cellules épithéliales et endothéliales (215). L'activation épithéliale du PAR-2 est suivie d'un réarrangement des protéines de JS et de la F-actine péri-jonctionnelle, entraînant éventuellement une hyperperméabilité intestinale et une inflammation de l'intestin (216). L'activation de PAR2 par l'axe du stress peut également favoriser la libération de peptides pro-inflammatoires tels que le peptide lié au gène de la calcitonine et la substance P, et conduire à la sécrétion du TNF α et de l'IFN γ , ce qui accroît à son tour la perméabilité intestinale et déclenche une inflammation intestinale (216). Cette cascade d'événements impliquant le PAR-2 pourrait être suivie d'une réaction d'hypersensibilité viscérale et de la douleur (215).

De plus, des études *in vitro* ont montré une expression de ZO-1 significativement réduite au niveau de la muqueuse colique lorsque celle-ci est exposée aux surnageants obtenu à partir de biopsies de colon de patients atteints du SII (217). Il a été également démontré sur des modèles *in vitro* mais aussi sur des modèles *in vivo*, une augmentation de la perméabilité colique après exposition aux surnageants fécaux de patients SII-C. l'hyperperméabilité observée était associée à une augmentation de l'activité cystéine-protéase retrouvée dans le surnageant des patients SII-C, qui serait capable de dégrader l'occludine (218). En outre, il a été démontré qu'une diminution de la concentration de bactéries productrices de butyrate au niveau de l'intestin, contribuait à une augmentation de la perméabilité intestinale (219). Effectivement, des chercheurs ont montré l'effet du butyrate sur la perméabilité, celui-ci augmenterait l'expression des protéines claudine-2, occludine et *zonula occludens* et par conséquent favoriserait la restauration de la perméabilité intestinale (220). Dans une autre étude réalisée par Zhou et al, il a été démontré une altération de l'expression de l'ARN messager de la claudine-1 par les miR-29a, entraînant une augmentation de la perméabilité intestinale. Dans la même étude, les chercheurs ont suggéré qu'une diminution de la glutamine synthétase peut également affecter le taux d'expression de la claudine-1 (221). Effectivement, Bertrand et al ont démontré que des doses élevées de glutamine appliquées sur la muqueuse colique de patients atteints du SII-D augmentent l'expression de la claudine-1 et permet de restaurer les protéines de JS en fonction de leur expression basale (222). La glutamine est classiquement connue comme étant le substrat préférentiel des cellules à division rapide, comme les

entérocytes ou les cellules immunitaires. Initialement classé comme un acide aminé non essentiel, sachant qu'il peut être synthétisé *de novo*, la glutamine a été plus récemment considérée comme essentielle dans les états cataboliques (223). Au niveau intestinal, la supplémentation en glutamine diminue l'inflammation intestinale dans des modèles expérimentaux mais ces résultats n'ont pas été confirmés en clinique (224). La glutamine augmente également la synthèse protéique intestinale (225,226). Bien que l'effet bénéfique de la glutamine au niveau intestinal ait été documenté dans les années 1990 (227), la régulation des protéines des JS par la glutamine a été rapportée plus récemment. La privation en glutamine ou l'inhibition de la glutamine-synthétase (GS) conduit à une importante diminution de la résistance trans-épithéliale (TEER), à une augmentation de la perméabilité, ainsi qu'à une réduction des protéines de JS, claudine-1 et occludine dans les cellules Caco-2 (228,229). De façon intéressante, cette rupture de la barrière intestinale peut être restaurée par un apport en glutamine (229).

Enfin, une perméabilité intestinale accrue permettrait la translocation des bactéries à travers l'épithélium et l'activation d'une réponse immunitaire intestinale avec la production de médiateurs inflammatoires capable de maintenir la perméabilité et de produire des réponses neuronales anormales.

Il a été récemment suggéré un lien entre obésité et troubles fonctionnels intestinaux (230). Une étude française récente a montré que la prévalence du SII était augmentée chez des patients ayant une obésité de grade III (IMC > 40). En effet, les auteurs ont retrouvé une prévalence de 30% (231). Ces études soulignent donc une relation entre obésité et SII dont les mécanismes restent incompris. Sur le plan physiopathologique, des facteurs communs ont été retrouvés entre l'obésité et le SII tels que des modifications du microbiote intestinal, de la réponse inflammatoire et de la fonction de barrière intestinale.

2. L'obésité :

A. Définition et épidémiologie :

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'obésité est considérée comme la première épidémie non infectieuse de l'Histoire, caractérisée par une accumulation anormale ou excessive de la graisse corporelle principalement la graisse viscérale. Elle est le résultat d'un déséquilibre de la balance énergétique entre les apports caloriques et les dépenses énergétiques. L'obésité est généralement définie par un indice de masse corporelle [IMC] ≥ 30 . L'IMC est la valeur obtenue par le poids corporel en kilogrammes, divisé par la taille en mètres carrés. Il est le critère actuellement le plus utilisé pour classer l'obésité, qui va de l'insuffisance pondérale ou de l'émaciation ($<18,5 \text{ kg} / \text{m}^2$) à l'obésité sévère ou massive ($\geq 40 \text{ kg} / \text{m}^2$) (**Tableau 3**).

Tableau 3 : La classification des différents types d'obésité suivant l'IMC.

<i>Classification</i>	<i>IMC (kg/m²)</i>
• Maigreur	• $< 18,5$
• Poids « normal »	• $18,5 - 24,9$
• Surpoids	• $25 - 29,9$
• Obésité (classe 1)	• $30 - 34,9$
• Obésité sévère (classe 2)	• $35 - 39,9$
• Obésité morbide (classe 3)	• ≥ 40

La prévalence croissante de l'obésité est devenue un problème de santé majeur chez les adultes mais aussi chez les enfants et les adolescents. Elle a doublé au cours de ces trois dernières décennies. En effet, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour l'année 2016, 600 millions (13%) de personnes de plus de 18 ans étaient classées comme obèses (232). Si les tendances à long terme se maintiennent, on estime que 20% de la population adulte mondiale sera obèse d'ici 2030 (233). Selon l'OMS, en 2035, l'obésité affectera 39% de la société actuelle (234). L'obésité augmente considérablement le risque de morbidité liée aux maladies chroniques, à savoir l'invalidité, la dépression, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, certains cancers et la mortalité. De ce fait, les coûts économiques et psychosociaux de l'obésité ainsi que ceux associés à ses comorbidités et séquelles sont importants. C'est pourquoi il est de plus en plus nécessaire de créer de nouvelles politiques publiques en matière de prévention et de soins de santé primaires (235).

Bien que son étiologie ait été associée à un déséquilibre énergétique entre les apports et les dépenses caloriques, principalement en raison d'une mauvaise hygiène de vie et de la sédentarité. Il s'agit en réalité d'un ensemble de facteurs impliquant une interaction entre des prédispositions génétiques, des facteurs hormonaux et environnementaux (236). De plus, il a été suggéré récemment un lien entre obésité et les TFI.

B. Physiopathologie intestinale de l'obésité :

a. Motricité intestinale :

Plusieurs études ont suggéré que la présence d'une inflammation intestinale pourrait perturber les fonctions entéro-motrices, entraînant des modifications morpho-fonctionnelles dans le compartiment neuromusculaire (237). À cet égard, de plus en plus de données épidémiologiques indiquent que l'obésité soit associée à des troubles gastro-intestinaux chroniques (238). Des études antérieures ont montré qu'une inflammation chronique de bas grade dans l'intestin peut altérer la motricité digestive en modifiant les fonctions des nerfs entériques des cellules interstitielles de Cajal (ICC) ou des cellules musculaires lisses, soulignant ainsi une relation physiopathologique entre l'inflammation intestinale et les anomalies motrices entériques observées chez les animaux obèses (239). Il a été démontré des interactions bidirectionnelles étroites entre le SNE et le système immunitaire visant à préserver l'homéostasie dans le système digestif (240). Effectivement, il a été rapporté que l'activité péristaltique gastro-intestinale était finement régulée par les macrophages entériques résidant dans les tissus (241). La perturbation de ces interactions neuro-immunes détermine les altérations morpho-fonctionnelles du compartiment neuromusculaire digestif (242). D'après les données d'une étude réalisée sur des rats obèses induit par une HFD, une réorganisation du SNE était caractérisée par une augmentation significative de l'expression de la Substance P dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon, suivie de changements fonctionnels représentés par des réactions plus rapides de la vidange gastrique et un péristaltisme duodénal plus faible, ainsi que des contractions et des relaxations plus fortes des mouvements péristaltiques iléaux (243). Des études menées sur des populations aux États-Unis et en Australie ont évalué les symptômes évocateurs d'un dysfonctionnement gastro-intestinal et ont montré une fréquence accrue de douleurs abdominales et de diarrhées chez les sujets en surpoids et obèses (244,245). Dans ce sens, il a été démontré une relation positive significative entre l'IMC et la diarrhée. En revanche,

aucune corrélation significative n'a été observée entre l'IMC et la constipation, même si elle était plus fréquente chez les patients obèses (244).

Des études récentes ont examiné les liens entre le microbiote intestinal et les troubles de la motricité intestinale. La dysbiose intestinale et les troubles de la motricité (la constipation) ont été associées à des régimes riches en graisses (246,247). Dans les études sur des adultes présentant des troubles de la motricité, Vandeputte et al, ont constaté une consistance accrue des selles (selles plus souples avec un temps de transit élevé) inversement liée à la diversité du microbiote et positivement associée au rapport *Bacteroidetes* / *Firmicutes* (248). Des études sur des modèles murins de constipation ont démontré que la production du butyrate, est diminuée lors de la dysbiose intestinale et ont suggéré que la réplétion du butyrate pourrait réduire les symptômes causés par les troubles de la motricité (249). Deng et al, ont découvert que le microbiote produisant des AGCC stimule également la synthèse de la sérotonine augmentant ainsi la motricité intestinale (250).

b. Microbiote intestinal :

Selon plusieurs études, des perturbations dans la composition du microbiote intestinal ont été constatées au cours de l'obésité. Des études cliniques ont comparé la composition du microbiote fécal entre des individus obèses et des individus maigres montrant ainsi une augmentation du ratio *Firmicutes* / *Bacteroides* chez les individus obèses. Dans des modèles animaux ainsi que chez l'Homme, différentes études confirment le même schéma d'augmentation du ratio *Firmicutes* / *Bacteroides* associé à l'obésité et l'inverse est observé avec une perte de poids (251). Cependant, d'autres études, ont montré l'absence de cette relation (252), suggérant la complexité du lien entre les changements dans la composition bactérienne et l'obésité. En effet, l'obésité est une pathologie multifactorielle aux dysfonctions métaboliques connexes impliquant différents acteurs présumés causals tels que la génétique, l'épigénétique et le mode de vie. En outre, des études chez l'animal ont montré que des altérations du microbiote intestinal peuvent entraîner des modifications phénotypiques chez l'hôte, telles que la prise ou la perte de poids. Effectivement, d'après Turnbaugh et al, des souris génétiquement obèses (ob/ob), présentent une augmentation du ratio *Firmicutes* / *Bacteroides* et la greffe fécale de ces souris sur leurs contrôles du même fond génétique, entraîne un gain de poids chez ces derniers avec un profil de microbiote intestinal semblable à celui des souris obèses (253). Backhed et al, ont montré que la transplantation fécale de souris conventionnelles

chez des souris dépourvus du microbiote intestinal, entraîne une augmentation de 60% de la masse adipeuse et une résistance à l'insuline et que ces changements sont indépendamment de la prise alimentaire (254). Pedrego et al, ont suggéré que certaines bactéries intestinales pourraient aider à prédire la probabilité d'une perte de poids réussie avec des interventions sur le mode de vie. En comparant les individus qui n'ont pas pu atteindre une perte de poids de 5%, il a été constaté donc une augmentation de l'abondance de *Phascolarctobacterium* associée à une plus grande probabilité de perte de poids alors que *Dialister* semble être associée à un échec (255). En outre, l'analyse fonctionnelle des gènes microbiens a également montré que ceux qui n'atteignent pas une perte de poids de 5% ont une plus grande abondance d'enzymes impliquées dans le métabolisme des glucides (255). Une autre étude a montré que la transplantation du microbiote fécal de souris sauvages à des souris dépourvues de leur propre microbiote, normalise le poids corporel entre les groupes d'animaux (254). À l'inverse, la transplantation du microbiote fécal provenant de souris obèses a entraîné une augmentation de la masse grasse chez les animaux dépourvus de leur propre microbiote (253), ce qui suggère une identité microbienne spécifique aux animaux obèses qui favorise un excès de poids corporel. Enfin, des changements dans l'abondance de différents phyla bactériens ont été rapportés dans des modèles d'obésité induite par une HFD (256). En clinique, par intervention nutritionnelle, Il a été démontré qu'un régime hypercalorique (2400 kcal/jour contre 3400 kcal/jour) entraînait une augmentation du ratio *Firmicutes* / *Bacteroides*, suggérant l'impact du régime alimentaire sur la composition du microbiote intestinal (257).

c. Inflammation intestinale :

Selon une étude faite chez l'Homme, une association entre l'obésité et une inflammation de l'intestin grêle a été constatée, caractérisée par une augmentation du nombre de lymphocytes T intra-épithéliaux (CD8 $\alpha\beta$). Ces derniers participeraient à une altération de la fonction de barrière intestinale (258). De plus, des études récentes ont montré que les animaux nourris par une HFD présentent une expression accrue de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) dans les tissus intestinaux, suivis d'un dysfonctionnement spontané des cellules caliciformes, d'une biosynthèse altérée de mucine et d'une altération de la barrière intestinale (259,260). Chez le rongeur, De La Serre et al, ont montré que l'obésité développée par une HFD est induite par des modifications de la composition du microbiote intestinal entraînant le développement d'une inflammation de faible intensité dans le TGI. Ceci a été

démontré par une augmentation de l'expression du récepteur TLR-4 dans l'iléon, une augmentation des taux systémiques de LPS et de cytokines pro-inflammatoires et une perméabilité intestinale altérée (262). L'hyperperméabilité intestinale était associée à une diminution de l'expression et une délocalisation des protéines de JS, notamment de ZO-1 et de l'occludine (92).

D'autres études précliniques, ont rapporté des augmentations marquées d'infiltration de l'IL-1 β , l'IL-12p40 (263), l'IL-6 et les éosinophiles (264) dans les tissus du côlon de souris HFD. Antonioli et al, ont utilisé des souris HFD déplétées en macrophages, ce modèle animal était caractérisé par une diminution de l'infiltrat inflammatoire au niveau colique, ainsi que par une diminution significative de l'IL-1 β tissulaire et du stress oxydatif. Cette étude montre un rôle crucial joué par les macrophages activés au cours de l'obésité dans le maintien d'une inflammation de faible intensité *via* la production de cytokines pro-inflammatoires au niveau intestinal (265). Les observations cliniques ont également indiqué une augmentation de l'IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α et de la protéine chimiotactique monocyttaire (MCP-1) dans des échantillons de muqueuse colique provenant de patients obèses (266). De plus, Il a été montré une accumulation de cellules immunitaires et une expression locale de cytokines dans le jéjunum de patients obèses en fonction de leur statut métabolique (258).

d. Hyperperméabilité intestinale :

Une association entre l'obésité et l'augmentation de la perméabilité intestinale a été récemment suggérée. Les études démontrant une hyperperméabilité intestinale chez les sujets obèses sont rares. D'après la littérature les premières preuves de cette association proviennent de modèles animaux plus adaptés à l'étude du dysfonctionnement de la barrière intestinale dans l'obésité (91,92). La conséquence principale de ce dysfonctionnement est l'entrée de toxines de la lumière intestinale, telles que les LPS. Effectivement des modifications de la composition du microbiote intestinal ont été associées à l'absorption de LPS et à une augmentation de la perméabilité intestinale (92). D'autres études ont montré qu'une endotoxémie plus élevée chez les souris génétiquement obèses (souris ob/ob et souris db/db), est dépendante d'une perturbation des protéines de JS ZO-1 et occludine (91). De plus, Il a été démontré chez la souris qu'une perfusion des LPS pendant 4 semaines, permettant de doubler son taux au niveau sérique, mimait les effets métaboliques habituellement induits par une HFD (261). L'élévation des taux sériques des LPS est considérée comme un signe de perturbation de la perméabilité

intestinale. Cependant, le taux des LPS circulants n'est pas toujours couplé à la perméabilité intestinale, ce qui limite son utilisation en clinique comme biomarqueur de la perméabilité intestinale (267). De plus, les modèles animaux qui ont été nourris avec une alimentation riche en graisse ou en fructose, présentaient une dysbiose intestinale, une endotoxémie métabolique et une augmentation de la perméabilité intestinale (268,269). Ce phénomène semble impliquer une réduction de l'expression des gènes codant pour des protéines de JS, ZO-1 et occludine, ainsi qu'une diminution du nombre de bifidobactéries (92,256). Les bifidobactéries réduisent le taux des LPS intestinaux chez la souris et améliorent la fonction de la barrière intestinale. Ceci en augmentant l'expression des ARNm codant pour des protéines de JS et en rétablissant leur distribution (270).

En outre, du fait des données antérieures qui montraient une perméabilité intestinale accrue chez les souris obèses et diabétiques, les auteurs ont pu mettre en avant l'implication des bactéries intestinales dans l'efficacité de la fonction de barrière intestinale. Dans leur étude, les chercheurs ont traité avec un antibiotique des souris obèses par une HFD et des souris diabétiques. L'administration d'antibiotiques a atténué les effets du régime hyperlipidique sur les paramètres de la perméabilité intestinale et l'épithélium intestinal de ces souris a pu recouvrir son intégrité normale. Effectivement, une autre étude a démontré que la modulation prébiotique du microbiote intestinal augmente la hauteur des villosités, la profondeur des cryptes et conduit à une couche muqueuse plus épaisse dans le jéjunum et dans le côlon (271). De plus, il a été constaté que le fait de modifier le microbiote intestinal de rats nourris avec une HFD après un traitement prébiotique, doublait les concentrations du «*glucagon-like peptide-2*» (GLP-2) dans l'intestin (272). Selon d'autres études, le GLP-2 augmente le taux de prolifération des cellules cryptoglyphiques, l'élongation des villosités et réduit l'apoptose, entraînant une amélioration de la fonction de la barrière intestinale. Les auteurs avaient constaté donc que des modifications spécifiques du microbiote intestinal amélioraient la perméabilité intestinale et l'état inflammatoire associés à l'obésité par un mécanisme dépendant du GLP-2 (273). Si les données sont concordantes chez les rongeurs nourris avec une HFD, plusieurs études montrent cependant que tous les paramètres de la perméabilité ne sont pas modifiés chez les rongeurs génétiquement obèses (274,275). Par ailleurs, des études sur des souris Ob/Ob ont montré que la dysbiose du microbiome intestinal liée à l'obésité, est associée à un renouvellement cellulaire anormal dans les tissus intestinaux ; par conséquent, il peut être plausible qu'une carence en leptine puisse contribuer à ces changements observés dans le renouvellement cellulaire dans l'intestin suggérant un rôle important dans le développement de la biologie cellulaire intestinale

via l'axe leptine-IGF1 / IGFBP3. Cette hypothèse est également corroborée par des preuves montrant que les taux de leptine sont positivement corrélés aux taux de facteur de croissance insuline-like (IGF1) et de protéine de liaison à l'IGF1 (IGFBP3) dans d'autres systèmes (276,277), ainsi que des études récentes menées par Addio et al, montrant que IGF1 / IGFBP3 contrôle la croissance et la différenciation des cellules souches intestinales et par conséquent l'intégrité de l'épithélium intestinal (278).

La pullulation bactérienne de l'intestin grêle appelée également « *Small Intestinal Bacterial Overgrowth* » (SIBO), chez les patients obèses conforte indirectement l'idée que l'obésité soit liée à une altération de la perméabilité de l'intestin grêle, car cela a également été retrouvé dans d'autres maladies liées à une altération de la perméabilité intestinale, telles que des maladies du foie et des syndromes d'immunodéficience (279). Par une étude réalisée chez des patients obèses, il a été démontré que l'expression des protéines telles que l'Occludine et la tricelluline jéjunales restait inchangée. Cependant, cette étude démontre une délocalisation de ces deux protéines dans l'obésité humaine, ce qui était décrit auparavant dans un état inflammatoire (280,281). Cela suggère que l'obésité humaine est associée à une altération des propriétés de la barrière intestinale. Les résultats de cette étude ne montrent pas une augmentation de la perméabilité intestinale marquée chez les patients obèses telle que retrouvée dans le modèle d'obésité induit par une HFD chez les rongeurs. En revanche, malgré des défauts de barrière beaucoup plus modestes comparés aux modèles d'obésité chez les rongeurs, ces résultats ont pu révéler chez l'Homme, par une analyse précise des phénotypes liés à l'obésité, un lien entre une perméabilité jéjunale aux petites molécules et une inflammation de bas grade liée à l'obésité (282). D'autres études étaient basées sur un test de perméabilité intestinale lactulose/mannitol réalisé sur de petites cohortes de patients. Cependant, il n'a été trouvé aucune différence statistique dans les rapports lactulose/mannitol entre les patients non obèses et les patients souffrant d'obésité sévère. Seules deux études ont montré une association entre une perméabilité intestinale accrue et des altérations métaboliques telles que la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique (282). En revanche, il a été constaté que la zonuline (un marqueur de perméabilité intestinale dans la maladie cœliaque et le diabète de type 1) (283) et la LBP, (un transporteur de LPS), étaient augmentées chez les patients obèses, conformément aux observations antérieures chez des patients en surpoids ou modérément obèses. Néanmoins, ces biomarqueurs ne représentent pas un outil fiable pour mesurer la perméabilité intestinale en clinique puisqu'aucun de ces biomarqueurs, en *in vivo*, n'a été corrélé avec la perméabilité mesurée *in vivo* dans les chambres de Ussing (284–286).

III. MODELES ANIMAUX :

La physiopathologie du SII et de l'obésité chez l'homme est multifactorielle et restent jusqu'à lors incomplètement comprise. Un certain nombre de modèles *in vitro* et *in vivo* ont été mis au point pour étudier les différentes conditions de dysfonctionnement gastro-intestinal associés à ces pathologies. Généralement, les animaux de laboratoire, en particulier les rongeurs, sont utilisés comme sujets des modèles expérimentaux dans les études précliniques. En outre, grâce aux progrès de la biotechnologie, plusieurs souches de souris transgéniques ont été établies pour imiter plusieurs aspects des syndromes cliniques humains.

Nous aborderons dans cette partie uniquement les modèles qui sont utilisés et ont été validés dans notre laboratoire. Le modèle post-inflammatoire (post-TNBS) ainsi que le modèle de stress WAS pour l'étude du SII et les modèles déficients pour la leptine (ob⁻/ob⁻) ou pour son récepteur (db⁻/db⁻) ainsi que le modèle HFD pour l'étude de l'obésité.

1. Modèles animaux utilisés dans l'étude du SII :

Différents types de facteurs de stress, par exemple les stimuli physiques et psychologiques, ainsi que les inflamogènes, semblent jouer un rôle crucial dans le développement du SII et le maintien de la maladie. Des modèles animaux ont été proposés pour mimer plusieurs symptômes retrouvés chez les patients SII, appelés les modèles SII-Like. À l'aide de ces modèles expérimentaux validés, les chercheurs sont autorisés à explorer la physiopathologie distincte de différents sous-types de SII et à élucider le mécanisme d'action de diverses stratégies thérapeutiques contre des facteurs environnementaux, physiologiques et psychologiques. Différents modèles SII-Like sont couramment utilisés : les modèles post-infectieux, post-inflammatoires ainsi que les modèles de stress (**Tableau 4**).

A. Le modèle post-inflammatoire (SII-PI) ou post-TNBS :

L'un des modèles les plus utilisés reste le modèle post-TNBS (trinitrobenzene sulfonique acid). Le TNBS est administré par voie intra-rectale et est généralement dilué avec de l'éthanol. Ce solvant perturbe la barrière épithéliale et conduit à la translocation de composants bactériens dans la *lamina propria*. Le TNBS est un haptène, capable de se lier aux protéines tissulaires et de stimuler la voie de l'immunité cellulaire Th1 (288).

Tableau 4 : Les modèles SII-Like.

SII-Like	Modèles
Lié au stress	-Séparation maternelle -Contention -Stress acoustique -stress d'évitement de l'eau (WAS)
Post-infectieux	-Lié aux infections bactériennes : -<i>Campylobacter jejuni</i> -<i>Campylobacter rodentium</i> -Lié aux infections parasitaires : -<i>Trichinella spiralis</i> -<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> -<i>Cryptosporidium parvum</i>
Post-inflammatoire	-lié à des agents chimiques : -L'acide acétique -L'acide déoxycholique -Le DSS -L'huile de moutarde -Le zymosan -Le TNBS

Le post-TNBS est considéré comme un modèle animal essentiel du SII-PI qui entraînerait une inflammation muqueuse de faible intensité. En outre, il a été montré le développement d'une colite aiguë ulcéreuse chez l'animal, entre le troisième et le septième jour après l'instillation. Au bout de quatorze jours, ces lésions se résorbent (290). Cette colite semble être modulée par des médiateurs inflammatoires tels que la prostaglandine E2, les interleukines et le « *platelet-activating factor* » (PAF) (291). Dans notre laboratoire, l'étude de la colite chimio-induite par le TNBS a été réalisée, afin d'étudier la fibrose liée à l'inflammation chronique (118,292), ainsi que dans l'étude de la régulation de protéines chaperonnes par le protéasome dans un modèle de colite chez le Rat (293,294). Il a été montré, que 6 semaines après induction d'une colite, l'exposition des rats à un stress rendait le côlon plus sensible aux distensions colorectales et augmentait certains paramètres de l'inflammation. Dans ce modèle, une inflammation transmurale colique sévère se développe souvent, entraînant une diminution du seuil de la douleur et une magnitude élevée des réponses (295). En effet, après administration intra-rectale du TNBS chez deux souches de rats (Lewis et F344), des altérations au niveau de la muqueuse colique à J5 ont été montrées, avec une augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires, correspondant au pic d'inflammation. À J14, aucune séquelle histologique n'a été retrouvée.

De plus, dans ces deux souches, une augmentation de la réponse viscéromotrice à J5 est retrouvée (296). Cependant, cette réponse viscéromotrice n'a perduré jusqu'à J28 uniquement pour les rats Lewis. Ce qui suggère que le facteur de la génétique, joue un rôle important dans le développement d'une hyperalgie viscérale chronique post-inflammatoire et que cette sensibilité semble être liée à l'intensité de l'inflammation de la muqueuse et de la réponse immunitaire systémique (296).

Les résultats des études SII-PI comprennent la physiopathologie du SII qui implique l'immuno-modulation du cerveau et du système moteur de l'intestin en tant qu'événement post-inflammatoire. De plus, Qin et al. ont démontré que les perturbations des activités sensorimotrices de l'intestin contribuent dans une large mesure au développement de l'hyperalgésie dans les conditions du SII-PI (288). D'après leur étude, lors de la liaison aux récepteurs correspondants sur les neurones de l'intestin, la sérotonine (5-HT) sécrétée par les cellules entérochromaffines, un important neurotransmetteur qui stimule la libération d'acétylcholine par les neurones cholinergiques (199), est considérée comme un stimulateur de la motilité de l'intestin chez les rats induits par le TNBS (297).

Ce modèle post-inflammatoire rassemble les principales caractéristiques d'un SII, telles que l'hypersensibilité viscérale, les troubles de la motricité intestinale ou encore les modifications de la perméabilité intestinale et est utilisé comme modèle mimant plusieurs symptômes SII-Like retrouvés chez les patients MICI en rémission.

B. Le modèle de stress dû à l'évitement de l'eau (Water-Avoidance stress (WAS)) :

Selye en 1936, a fourni la preuve expérimentale que le cortex surrénalien, le système immunitaire et l'intestin sont modifiés chez les Rats exposés à divers produits chimiques ou à des stimuli physiques (298). Ainsi le rôle du stress dans la genèse ou l'aggravation des symptômes des troubles fonctionnels intestinaux, a depuis, largement été décrit. De nombreuses hormones et neuropeptides sont connus pour être impliqués dans la communication entre le cerveau et le TGI (299). Le CRF reste le neuropeptide le plus associé au dysfonctionnement de l'axe « intestin-cerveau ». Sa libération est induite *via* l'activation de l'axe du stress HPA, possède des rôles divers et variés, ce qui confirme son position comme médiateur clé des changements liés au stress dans la fonction du TGI.

Le WAS semble donc être un bon modèle de stress psychologique. De plus en plus d'études font le lien entre le stress psychologique répété et les troubles fonctionnels intestinaux. Le WAS est un modèle de stress chronique, qui est utilisé afin d'évaluer l'effet du stress sur la motricité colique, l'hypersensibilité viscérale ou la fonction de barrière intestinale chez les rongeurs. Dans ce modèle, les animaux (rat/souris) sont placés dans une bassine (40 cm de longueur x 25 cm de largeur x 25 cm de hauteur) avec une plateforme de 2,5 cm de diamètre fixé à la bassine. La bassine est remplie avec de l'eau à température ambiante (25 °C), à moins d'1 cm de la partie supérieure de la plateforme. Les animaux sont placés sur la plateforme durant une période de 1 h/jour pendant 10 jours consécutifs (300). Cet événement est considéré comme stressant pour les animaux et joue un rôle dans la genèse ou dans l'aggravation des symptômes des troubles fonctionnels intestinaux. Effectivement, il a été démontré que les expositions au WAS aiguës et répétées pourraient induire une hyperalgésie viscérale immédiate sans distinction de sexe (301). De plus, il a été montré que le modèle du WAS chronique chez le Rat, augmentait le comportement anxieux et induisait une hyperalgie viscérale qui perdurait 1 mois après l'induction du stress. En outre, une barrière intestinale altérée a été observée chez des rats exposés au WAS chronique (302). Il a également été montré qu'un pré-traitement au GLP-2 (glucagon-like peptide 2), chez des souris ayant subi le WAS, empêchait la rupture de la barrière intestinale comparativement aux souris non stressées (303).

Bradesi et al, ont démontré que le nombre de fèces expulsés chez les rats stressés est augmenté ainsi que le nombre de mastocytes et l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IFN- γ) (304). De plus il a été démontré qu'au cours du WAS, l'augmentation du nombre de fèces expulsés était accompagnée d'une augmentation du nombre des cellules c-fos positives dans certaines régions cérébrales tels que le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) ou encore le locus coeruleus (LC). L'injection d'antagoniste du CRF semble atténuer le nombre de cellules c-fos positives. Cela suppose que le CRF jouerait un rôle central dans la modulation de la motricité colique (300). Le stress est responsable de la synthèse et de la libération du CRF *via* l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Il a été montré, que l'administration durant 10 jours consécutifs de corticostérone chez les rats contrôles n'ayant pas subi de WAS, présentaient les mêmes altérations que les rats exposés au WAS (305). De plus, les altérations du microbiote sont également étudiées dans ce modèle, qui les prédisposent à l'inflammation intestinale (306). En effet, le WAS induit une inhibition de NLRP6 (Nod Like Receptor family pyrin domain containing 6) due à la libération de CRF. Cet effet est annulé par un agoniste au récepteur PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) qui rétablit l'expression

de NLRP6, un inflammasome nécessaire au maintien d'une homéostasie du microbiote intestinal (306).

Pris ensemble, le stress psychologique est nettement corrélé à une altération de la motilité gastro-intestinale et des fonctions de barrière intestinale. Finalement le WAS semble être un bon modèle « SII-Like » qui reproduit les symptômes majeurs retrouvés chez les patients SII telles qu'une hyperperméabilité intestinale, une inflammation intestinale de bas-grade, une hypersensibilité viscérale ainsi que des troubles de la motricité colique. Cependant, la relation de cause à effet entre l'hypersensibilité viscérale, l'activation immunitaire et les symptômes du SII reste encore à être élucidée.

Ces modèles animaux nous permettent ainsi une approche physiopathologique proche de la symptomatologie observée chez les patients SII afin d'obtenir une meilleure compréhension de ces pathologies intestinales et ainsi le développement de thérapies ciblées.

2. Modèles animaux utilisés dans l'étude de l'obésité :

L'incidence de l'obésité continue d'augmenter dans le monde entier, ce qui impose de développer des modèles animaux partageant les caractéristiques de l'obésité humaine et de ses comorbidités dans la recherche de nouvelles mesures de prévention et / ou de traitement. La régulation du bilan énergétique se fait en contrôlant l'équilibre entre faim et satiété *via* un système complexe comprenant des récepteurs, des hormones et des neuropeptides. Il est effectué principalement par le système nerveux périphérique (SNP) et le système nerveux central (SNC), en donnant la priorité à l'hypothalamus, mais comprend également le tissu adipeux, le tractus gastro-intestinal, le pancréas, le foie et d'autres organes (307).

L'hypothalamus peut être divisé en plusieurs régions qui participent à ces voies; à savoir, les noyaux arqué et paraventriculaire (ARC et PVN, respectivement), la zone hypothalamique latérale (LHA) et les noyaux ventromédian et dorsomédian (VMH et DMH, respectivement) (308). L'ARC est le principal centre de détection des nutriments au sein de l'hypothalamus, il englobe les deux populations de neurones ou neuropeptides qui jouent un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire: des neuropeptides induisant la satiété, appelés anorexigènes, qui co-expriment la proopiomélanocortine (POMC) et le facteur de transcription régulée par la cocaïne et l'amphétamine (CART), on y trouve également les récepteurs de mélanocortine 3 et 4 (MC3R et MC4R) et l' α -MSH qui est le promoteur réel de la signalisation neuronale

anorexigénique (309). La deuxième population comprend des neuropeptides induisant l'appétit, produits du clivage de la POMC appelés orexigènes, qui co-exprime le neuropeptide Y (NPY) et le peptide apparenté à l'agouti (AgRP) (310). Le NPY est la molécule orexigénique la plus puissante, avec 90% des neurones co-exprimant l'AgRP. En plus d'activer les voies de la faim, les deux molécules agissent en tant qu'inhibiteurs des neurones anorexigènes, favorisant l'expression de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et de l'AgRP, en agissant comme un agoniste des récepteurs α -MSH (311). Dans le cas de l'obésité, le NPY et l'AgRP ont un équilibre positif, stimulant la prise alimentaire (299).

Dans les différents organes et tissus périphériques, l'expression des hormones peptidiques favorise une réponse hypothalamique, principalement les neuropeptides anorexigènes et orexigéniques. L'une des hormones les plus importantes associées au bilan énergétique est la leptine, un peptide anorexigène exprimé par le tissu adipeux, qui détecte l'énergie potentielle stockée principalement sous forme de triacylglycérol dans les adipocytes et contrôle la prise alimentaire (299). La leptine peut moduler l'activité de plusieurs organes, étant influencée par d'autres peptides en circulation, tels que la ghréline ou la galanine (312). Il existe des récepteurs de la leptine dans les deux populations de neuropeptides et par conséquent, la leptine agit par voie directe sur l'inhibition des neuropeptides NPY / AgRP et l'activation des neuropeptides POMC / CART. L'insuline est produite par les cellules β des îlots pancréatiques et, contrairement à la leptine, sa concentration augmente immédiatement après la prise de nourriture (312). En plus de sa régulation directe bien connue du métabolisme du glucose, du glycogène et des lipides, l'insuline a également une action directe importante sur l'activation des neuropeptides anorexigènes POMC / CART et sur l'inhibition des neuropeptides orexigènes NPY / AgRP, de la même manière que la leptine.

Les deux principales catégories de modèles animaux obèses sont 1) monogéniques et 2) polygéniques. Bien qu'il existe un composant génétique clair et bien documenté dans le développement de l'obésité, la plupart des cas d'obésité humaine sont néanmoins considérés comme polygéniques.

A. Les modèles monogéniques :

Ces modèles présentent un défaut dans la voie de signalisation de la leptine et développent un phénotype d'obésité massive, bien qu'il ait été démontré que la manipulation unique de près de 250 gènes différents chez la souris peut conduire à l'obésité (313). La gravité de l'obésité et les altérations métaboliques associées peuvent varier considérablement en fonction des manipulations génétiques ou des facteurs environnementaux et alimentaires (314). L'obésité monogénique chez l'Homme reste rare (315). Parmi les modèles d'obésité génétiquement modifiés, nous avons les souris déficientes pour : la leptine (ob/ob), le récepteur de la leptine (db/db), la POMC ou bien pour (POMC/AgRP) et pour le MC4R. Il existe également des modèles d'obésité par manipulation génétique chez les rats.

Les modèles d'obésité utilisés au sein de notre laboratoire sont : ob/ob, db/db.

a. La souris ob/ob :

Une mutation spontanée sur le gène de la leptine (ob) conduisant au phénotype obèse chez la souris est reconnue depuis les années 1950 (316). Cependant, ce n'est que lors de la caractérisation du gène ob, que la recherche intensive sur la génétique de l'obésité a réellement augmenté de façon spectaculaire (317). La leptine est principalement synthétisée dans les adipocytes blancs et sa sécrétion est directement proportionnelle à la quantité de triglycérides stockée. Une carence en leptine a également été observée dans de rares cas d'obésité humaine (318).

Phénotypiquement, l'absence de leptine entraîne une obésité précoce caractérisée par une hyperphagie, une dépense énergétique réduite et une hypothermie, l'hypercorticotéronémie, la résistance à l'insuline associée à l'hyperglycémie et à l'hyperinsulinémie, l'hypothyroïdie et le déficit en hormone de croissance. Les souris ob/ob sont stériles. Ce sont des formes d'obésité pouvant être traitées efficacement par l'administration de leptine exogène. La leptine normalise tous les défauts phénotypiques connus chez les souris ob/ob, y compris l'obésité, les symptômes du syndrome métabolique et la fonction de reproduction (319,320).

b. La souris db/db :

La souris déficiente en récepteurs de leptine (db/db), également appelée souris «db/db», est phénotypiquement similaire à la souris ob/ob (321). La principale différence par

rapport à la souris ob/ob réside dans la résistance marquée à la leptine, car la souris db/db possède un récepteur de leptine muté (spontanément). Ces souris souffrent également d'obésité massive mais leur taux de leptine est nettement plus élevé. Les souris db/db sont résistantes à l'insuline et développent un diabète ; elles ont souvent été utilisées pour étudier en partie les syndromes de type diabète de type II, mais les souris db/db ne développent pas le phénotype complet du diabète de type II. Analogue à la mutation du gène ob, la mutation du gène du récepteur de la leptine est également retrouvée dans certains cas d'obésité humaine. Cependant, la mutation est très rare.

B. Les modèles environnementaux :

Ces modèles se rapprochent plus de l'obésité humaine et devraient être utilisés pour les tests précliniques d'agents thérapeutiques. Dans ces modèles, l'obésité est souvent induite par des régimes obésogènes tels que les régimes riches en graisses (HFD) et le régime cafétéria (CAF).

Les modèles d'obésité utilisés au sein de notre laboratoire sont : le modèle HFD.

a. Le modèle d'obésité induite par un régime riche en graisses-HFD :

Il est clair que l'exposition des animaux à des régimes riches en graisses entraîne souvent le développement de l'obésité. Ce modèle a été utilisé dès 1949 et son utilisation et ses objectifs ont pris de l'ampleur (322). Certaines souches de rats susceptibles de développer une obésité induite par la diète (DIO) présentent des réductions de sensibilité à l'insuline et à la leptine (323). Il est à noter que l'âge auquel les souris commencent le régime alimentaire riche en graisses a un impact considérable sur les effets métaboliques (324). Des souris C57BL / 6J, la souche de souris la plus couramment utilisée dans les modèles DIO, de 10 semaines exposées à un régime riche en graisses ont présenté des augmentations de poids corporel et de cholestérol plus faibles que les souris qui ont commencé le régime à 54 semaines, malgré le même type de régime et la même durée (325). De même, des souris âgées de 6 semaines n'ont pas développé de diabète, alors que des souris âgées de 7 à 8 mois sont devenues diabétiques (326).

L'alimentation joue également un rôle important dans la détermination de la composition du microbiote intestinal. Dans l'étude de Carmody et al. il a été démontré que l'exposition de souris à des cycles de 3 jours de régime faible en gras (LFD) ou HFD entraînait

des changements cohérents dans la composition et la structure de la population bactérienne intestinale (327). Plusieurs études ont également suggéré qu'un déséquilibre du microbiote intestinal (dysbiose intestinale), suite à une HFD, pourrait être un facteur crucial pour influencer sur la déficience cognitive trouvée dans l'obésité d'origine alimentaire (328). De plus, il a été démontré que les souris obèses nourries avec une HFD présentaient des niveaux d'anxiété supérieurs à ceux des souris témoins (329). En outre, une étude a démontré que ce régime provoque une hyperperméabilité intestinale, altère le système de défense de la muqueuse et modifie la composition du microbiote intestinal (330). En effet, il a été démontré que l'apparition de l'obésité et les troubles métaboliques associés étaient induits principalement via la perturbation de la fonction de la barrière intestinale chez les rongeurs après une HFD (90). De plus, des études chez le rat ont montré une augmentation considérable de la perméabilité paracellulaire, observée dès la semaine suivant une diète riche en graisses dans l'intestin grêle et au bout de 3 semaines dans le côlon, ce qui coïncide avec une élévation de la protéine de liaison au LPS (LBP) dans le sang (331). Selon une étude réalisée récemment, une endotoxémie induite par une HFD, consécutive à une augmentation de la perméabilité intestinale, pourrait être en partie impliquée dans le développement de la stéatose hépatique. En effet, la consommation d'une HFD provoque des modifications de la composition des JS et des mécanismes impliqués dans le contrôle de la perméabilité intestinale, notamment une dysbiose et une augmentation du TNF α plasmatique. Dans l'iléon, la consommation d'une diète riche en graisse déclenche une cascade d'événements liés au statut rédox tels qu'une régulation positive de NOX1 / NOX4, une oxydation de protéines, une activation de NF-KB et ERK1 / 2 ainsi qu'une perturbation des JS (332).

Il est généralement admis qu'il n'existe pas de modèle animal expérimental idéal pour représenter pleinement la complexité des troubles multifactoriels tels que le SII et les TFI associés à l'obésité. Néanmoins, ces modèles in vivo sont des lectures cliniquement pertinentes des fonctions gastro-intestinales et sont essentielles aux études précliniques, en particulier pour l'identification de traitements efficaces des symptômes liés aux TFI et de leurs cibles moléculaires.

OBJECTIF DE L'ETUDE

Toutes ces données suggèrent un rôle du protéasome dans la régulation de la barrière intestinale ainsi qu'un potentiel lien entre l'obésité et le syndrome de l'intestin irritable.

Nous avons choisi donc d'évaluer dans un premier temps le rôle du protéasome en réponse au stress puis d'étudier l'impact de l'obésité sur la réponse au stress chez la souris.

Les résultats de ces travaux sont présentés sous la forme de 2 articles et d'un manuscrit.

Article 1 : **Targeting immunoproteasome and glutamine supplementation prevent intestinal hyperpermeability.**

Ghouzali I, Lemaitre C, **Bahlouli W**, Azhar S, Bôle-Feysot C, Meleine M, Ducrotté P, Déchelotte P, Coëffier M.

Article paru dans Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects

Article 2 : **Colonic Proteome Signature in Immunoproteasome-Deficient Stressed Mice and Its Relevance for Irritable Bowel Syndrome.**

Goichon A, **Bahlouli W**, Ghouzali I, Chan P, Vaudry D, Déchelotte P, Ducrotté P, Coëffier M.

Article paru dans Journal of Proteome Research (J Proteome Res)

Manuscrit 1 : **Stress-induced intestinal barrier dysfunction is exacerbated during diet-induced obesity.**

Wafa Bahlouli, Jonathan Breton, Mauranne Lelouard, Clément L'Huillier, Pauline Tirelle, Emmeline Salameh, Asma Amamou, Karim Atmani, Alexis Goichon, Christine Bôle-Feysot, Philippe Ducrotté, David Ribet, Pierre Déchelotte, Moïse Coëffier.

Manuscrit en cours de soumission

RESULTATS

RESULTATS

I. ARTICLE 1

TARGETING IMMUNOPROTEASOME AND GLUTAMINE SUPPLEMENTATION PREVENT INTESTINAL HYPERPERMEABILITY

Ghouzali I, Lemaitre C, **Bahlouli W**, Azhar S, Bôle-Feysot C, Meleine M, Ducrotté P, Déchelotte P, Coëffier M.

Article paru dans *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*

Le SII est un trouble fonctionnel intestinal caractérisé par des douleurs abdominales chroniques et des troubles du transit intestinal. Sa physiopathologie est multifactorielle impliquant différents facteurs tels que la rupture de la barrière épithéliale intestinale, une dysbiose, des altérations immunitaires, une hypersensibilité viscérale impliquant l'axe intestin-cerveau ou bien encore des facteurs psychosociaux tel que le stress, qui contribuent à l'apparition voire même l'aggravation des symptômes associés au SII.

Le but de cette étude était dans un premier temps de valider des modèles qui miment les symptômes retrouvés chez les patients SII. Ces modèles sont dits SII-Like et sont représentés par le modèle WAS et le modèle post-TNBS. Dans un second temps, étudier l'impact d'une inhibition du protéasome dans ces deux modèles SII-Like.

Des souris mâles C57BL/6 ont été utilisées pour générer les deux modèles SII-Like, pour lesquels nous avons étudié la perméabilité intestinale, la réponse inflammatoire et les activités protéolytiques du protéasome au niveau colique. De plus, une étude complémentaire a été réalisée pour inhiber le protéasome soit par une inhibition pharmacologique par le PR-957, soit par une inhibition génétique utilisant des souris KO pour la sous-unité $\beta 2i$ du protéasome. Enfin, nous avons également étudié, l'effet d'une modulation nutritionnelle par la glutamine dans ces deux modèles.

Nous avons montré dans ces modèles SII-Like, une augmentation de la perméabilité intestinale, une augmentation de l'inflammation intestinale ainsi qu'une augmentation de la motricité colique. Nous avons également montré une modification de l'activité trypsine-like du protéasome qui était associée à une modification du ratio des sous-unités $\beta 2i/\beta 2$. L'hyperperméabilité intestinale retrouvée dans ces deux modèles s'explique par une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées qui était associée à une augmentation de l'activité trypsine-like et par conséquent à une augmentation du ratio $\beta 2i/\beta 2$. L'inhibition pharmacologique et génétique du protéasome, restaurent la perméabilité intestinale et diminue la motricité colique.

En conclusion, cette étude montre une altération du protéasome dans les deux modèles SII-Like et montre également que l'inhibition du protéasome par approche pharmacologique et/ou génétique ou bien encore par intervention nutritionnelle prévient l'hyperperméabilité intestinale, suggérant ainsi un rôle du protéasome dans la physiopathologie du SII.



Targeting immunoproteasome and glutamine supplementation prevent intestinal hyperpermeability



Ibtissem Ghouzali^{a,b,1}, Caroline Lemaitre^{a,b,c,1}, Wafa Bahloul^{a,b,1}, Saïda Azhar^{a,b}, Christine Bôle-Feysot^{a,b}, Mathieu Meleine^{a,b}, Philippe Ducrotté^{a,b,c}, Pierre Déchelotte^{a,b,d}, Moïse Coëffier^{a,b,d,*}

^a Normandie Univ, INSERM unit 1073, Nutrition, Inflammation and Gut-brain axis, Rouen, France

^b Rouen University, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen, France

^c Department of Gastroenterology, Rouen University Hospital, Rouen, France

^d Department of Nutrition, Rouen University Hospital, Rouen, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2016

Received in revised form 15 July 2016

Accepted 15 August 2016

Available online 17 August 2016

Keywords:

Water avoidance stress
Post-inflammatory model
Proteasome
Intestinal permeability
Glutamine

ABSTRACT

Background: Intestinal hyperpermeability has been reported in several intestinal and non-intestinal disorders. We aimed to investigate the role of the ubiquitin proteasome system in gut barrier regulation in two mice models: the water avoidance stress model (WAS) and a post-inflammatory model (post-TNBS).

Methods: Both models were applied in C57BL/6 male mice ($n = 7-8/\text{group}$); Proteasome was targeted by injection of a selective proteasome inhibitor or by using knock-out mice for $\beta 2i$ proteasome subunit. Finally, glutamine supplementation was evaluated.

Results: In both models (WAS at day 10, post-TNBS at day 28), we observed an increase in proteasome trypsin-like activity and in inducible $\beta 2$ /constitutive $\beta 2$ subunit protein expression ratio, associated with an increase in intestinal permeability. Moreover, intestinal hyperpermeability was blunted by intraperitoneal injection of selective proteasome inhibitor in WAS and post-TNBS mice. Of note, knock-out mice for the $\beta 2i$ subunit exhibited a significant decrease in intestinal permeability and fecal pellet output during WAS. Glutamine supplementation also improved colonic permeability in both models.

Conclusions: In conclusion, the proteasome system is altered in the colonic mucosa of WAS and post-TNBS mice with increased trypsin-like activity. Associated intestinal hyperpermeability was blunted by immunoproteasome inhibition.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Intestinal permeability is altered not only in intestinal diseases such as irritable bowel syndrome (IBS) or inflammatory bowel diseases (IBD), but also in extra-intestinal disorders such as obesity and is involved in the pathophysiology of these diseases [1–3]. The paracellular permeability of the intestinal barrier is regulated by a complex protein system that constitutes tight junctions (TJ). Mainly three of the TJ proteins have been studied: the transmembrane proteins, occludin and claudin-1, and the cytosolic protein, zonula occludens-1 (ZO-1). Occludin and claudin-1 interact with ZO-1 which binds to the actin cytoskeleton to control paracellular permeability [4,5]. TJ proteins have been reported to be altered in different conditions such as IBD [6,7], IBS [8] or obesity [9]. Interestingly, occludin has been reported as a target of proteasome degradation through interaction with Itch ubiquitin

ligase [10] and we have previously shown that down-regulation of occludin protein expression may be related to its increased degradation by the proteasome system in IBS patients [11].

The ubiquitin proteasome system is involved in the regulation of several cellular pathways by selective degradation of proteins i.e. cell proliferation, apoptosis, inflammatory response and antigen presentation [12]. Recently, by using a proteomic approach, several proteins involved in stress, inflammatory responses, and metabolism, have been described as targets of proteasome degradation [13,14]. Targeted proteins are polyubiquitinated and then processed by the constitutive 20S proteasome, a large ATP-dependent multicatalytic complex which degrades the proteins to short peptides and releases ubiquitin [12]. In mammalian cells, the three catalytic β subunits of the constitutive 20S proteasome, $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$ can be replaced by inducible β -type subunits (βi), $\beta 1i$, $\beta 2i$ and $\beta 5i$. This then becomes an alternative proteasome complex, called immunoproteasome [15]. We [16] and others [17] have reported that IFN γ up-regulates proteasome activity in intestinal epithelial cell lines by increasing βi subunit protein expression. The proteasome system is altered during IBD [17,18] and also in the colonic mucosa of IBS patients [19]. However, modifications of proteasome seem to

* Corresponding author at: INSERM unit 1073, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen University, 22 Bd Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France.

E-mail address: moise.coeffier@univ-rouen.fr (M. Coëffier).

¹ These authors contributed equally to this work.

have different patterns [11,17]. In addition, experimental data suggest that proteasome inhibition prevented colitis in mice [20–22] but to our knowledge, the role of proteasome on intestinal permeability remains poorly documented.

Previous data reported the beneficial effects of glutamine, a conditionally essential amino acid, on intestinal permeability in vitro [23,24], in both animal models [25] and in humans [26,27]. Interestingly, Zhou et al. showed that glutamine synthetase protein expression was reduced in the colonic mucosa of IBS patients with intestinal hyperpermeability [28] and recently proposed that a decrease in claudin-1 protein expression in IBS patients may be linked to glutamine synthetase protein expression and to the proteasome system [3]. In IBD, Sido et al. also reported alteration of glutamine metabolism in colitic rats [29]. Finally, glutamine supplementation was able to regulate the proteasome system by regulating ubiquitination processes [14,30,31] and was able to restore colonic tight junction protein expression in different conditions [23–25,32,33].

Therefore, we aimed to investigate the regulation of the proteasome system in animal models associated with increased intestinal permeability and the effects of its inhibition.

2. Material and methods

2.1. Animal experimentation

Male C57Bl/6 mice were obtained from Janvier Labs (Le Genest St Isle, France) and were acclimatized at 23 °C with a 12-h light-dark cycle before study (dark phase: 9:30 PM–9:30 AM). Knock-out mice for *MECL1* gene (or β 2i proteasome subunit) were a kind gift from Professors Marcus Groettrup and Mickael Basler of Konstanz University (Germany) with the permission of Professor John Monaco from Cincinnati University (Ohio). The final author (MC) is authorized by the French government to use animal models (authorization no. 76–107) and the protocol was approved by CENOMEXA, the Ethics Committee of Normandy for Animal Experimentation (acceptance number: N/04-11-12/27/11-15). In addition, the authors confirm that all experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations (Official Journal of the European Community L 358, 18/12/1986) and followed ARRIVE guidelines [34].

2.1.1. Water avoidance stress

The water avoidance stress (WAS) model was induced by placing mice on a small platform in a tank (25 cm in height and 40 cm in length) of water (25 °C) during 1 h per day (from 9 h00 to 10 h00 AM) during 10 consecutive days. Control mice were placed on the same platform without water during the same time period. Fecal pellet output was monitored during each session. Mice were euthanized at day 10 immediately after the 1 h WAS period.

2.1.2. Post-inflammatory model

Under anesthesia, TNBS (0.5 mg, trinitrobenzen sulphonic acid) in 50% ethanol was instilled into the colon to produce colitis and was followed up for 28 days. Control mice received intracolonic instillation of 50% ethanol solution. Mice were euthanized at different times (0, 7, 14, 21 and 28 days after TNBS instillation) to establish post-inflammatory state.

2.1.3. Proteasome inhibitor injections

Daily intraperitoneal injection of a selective Inhibitor of immunoProteasome (IP), PR-957, was performed from day 21 to day 28 in TNBS mice and from day 1 to day 10 in WAS mice at 12 mg/kg. IP was diluted in phosphate buffered saline (PBS) solution (KH PO₄ 0.2 g, KCl 0.2%, Na₂HPO₄ 1.15 g, NaCl 8 g, H₂O qsp 1000 mL).

2.1.4. Glutamine supplementation

Glutamine (Gln) was diluted in drinking water to provide 2 g·kg^{−1} of body weight per day^{−1}. In the post-TNBS model, Gln was provided from day 21 to day 28. In the WAS model, Gln was administered from day 1 to day 10. In both models, glutamine solution was prepared and replaced every day.

2.2. Euthanasia and sampling

Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine/Largactil (40 and 1 mg·kg^{−1}, respectively). Blood samples were collected, centrifuged (4 °C, 3000 rpm, 15 min) and plasma was frozen at −80 °C. Colonic samples were collected, washed with ice-cold PBS, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C for RT-qPCR, western blot analysis and evaluation of proteasome activities. Samples of fresh colon were collected to evaluate paracellular permeability.

2.3. Intestinal permeability

Colonic permeability was assessed by measuring FITC-dextran (4 kDa) fluxes in Ussing chambers with an exchange surface of 0.07 cm² (Harvard Apparatus, Holliston, United States). FITC-dextran (5 mg/mL) was placed in the mucosal side. After 3 h at 37 °C, medium from the serosal side was removed and stored at −80 °C.

We also evaluated intestinal permeability in vivo in some WAS model series. At day 10, after a 6-h fasting period, FITC-dextran (4 kDa, 40 mg/mL) was administered by gavage at 10 μ L/g of body weight. Three hours later, the last WAS procedure was performed and mice were then immediately euthanized for blood collection.

The fluorescence level of FITC-dextran either in serosal medium or in plasma (excitation at 485 nm, emission at 535 nm) was measured in 96-well black plate with spectrometer Chameleon V (Hidex, Turku, Finland). Values were converted to concentration using a standard curve.

2.4. qRT-PCR

Mucosal total RNA was extracted from samples as previously described [35]. After reverse transcription of 1.5 μ g total RNA into cDNA by using 200 units of SuperScript™ II Reverse Transcriptase (LifeTechnologies, Cergy-Pontoise, France), qPCR was performed by SYBR™ Green technology on BioRad CFX96 real time PCR system (BioRad Laboratories, Marnes la Coquette, France) in duplicate for each sample. GAPDH was used as the endogenous reference gene. Specific primers are displayed in Table 1.

2.5. Western blot analysis

Colonic mucosa was homogenized in ice-cold lysis buffer containing 0.1% protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich) as previously described

Table 1
Sequences of used primers for qPCR.

Gene		Sequence (5' > 3')	Product size (bp)
TNF α	Forward	TGCTACTCTCAGAGCCCC	166
	Reverse	TGAGTCCTTGATGGTGTGC	
IL-1 β	Forward	CCCAAAAGATGAAGGGCTGC	169
	Reverse	AAGGTCCACGGGAAGACAC	
CXCL-1	Forward	ACTCAAGATGTGTCGGAGG	84
	Reverse	GGCACACTTTTACATCTTTTGG	
GAPDH	Forward	CATCACTGCCACTCAGAAGA	316
	Reverse	AAGTCACAGGAGCAACT	

[36]. Vials were placed on ice for 15 min and then centrifuged for 15 min at 4 °C and 12,000 rpm. The supernatant containing proteins were collected and stored at –80 °C until analysis. Proteins (25 µg) were separated on 4–20% glycine resolving gels (Biorad Laboratories) and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Orsay, France), which was blocked for 1 h at room temperature with 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris Buffered Saline (TBS) (10 mmol/L Tris, pH 8; 150 mmol/L NaCl), plus 0.05% (w/v) Tween 20. Then, an overnight incubation at 4 °C was performed with mouse anti-β1 or anti-β2 (1:1000, Biomol International, Exeter, UK) or with rabbit anti-β1i, anti-β2i, anti-β5 or anti-β5i (1:1000, Biomol International) or anti-occludin, anti-claudin 1 or anti-ZO-1 (1:1000, Life Technologies) or with mouse anti-β-actin (1:1000, Sigma Aldrich) antibodies. After three washes in a blocking solution of 5% (w/v) non-fat dry milk in TBS/0.05% and Tween 20, a 1 h incubation with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (1:5000, SantaCruz Biotechnology) was performed. After three additional washes, immunocomplexes were revealed by using the Enhanced Chemiluminescence (ECL) detection system (GE Healthcare). Protein bands were quantified by densitometry using ImageScanner III and ImageQuant TL software (GE Healthcare).

2.6. Myeloperoxidase assay

After washing in PBS, tissue (50 mg/mL) was homogenized in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma-aldrich) in PBS, (pH 6.0), freeze-thawed 3 times, sonicated and centrifuged (14,000 rpm, 4 °C for 15 min). Myeloperoxidase (MPO) was assessed in the supernatant by adding 1 mg/mL of dianisidine dihydrochloride (Sigma-aldrich) and 5 × 10^{–4} H₂O₂ and measuring the change in optical density at 450 nm. Human neutrophil MPO (Sigma-aldrich) was used as standard. One unit of MPO activity was defined as the amount that degraded 1.0 µmol of peroxide/min at 25 °C.

2.7. Proteasome activities

Colonic mucosa were homogenized in ice-cold lysis buffer containing 30 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, placed on ice for 15 min and then centrifuged for 15 min at 4 °C and 12,000 rpm. Proteasome activities were evaluated as previously described [37] by spectrofluorimetry on microtiter plate fluorometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) using fluorogenic proteasome substrates, Suc-LLVY-MCA (PSIII, Calbiochem, San Diego, CA, USA) for chymotrypsin-like activity, Boc-LSTR-MCA (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for trypsin-like activity and Z-LLE-MCA (Sigma Aldrich) for caspase-like or PGPH activity, in the presence or absence of proteasome inhibitor, 10 µM MG132 (Sigma Aldrich). Thus, proteasome activity was calculated as the difference between the activity measured in absence of MG132 and the activity measured in presence of MG132.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA). To compare two groups, *t*-test was used. If variances significantly differed between groups (Bartlett's test) or if normality test was not passed (Kolmogorov-Smirnov test), Mann-Whitney test was performed. To compare three groups or conditions, statistical analysis consisted in one-way ANOVA followed by Tukey post tests or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's comparisons, as appropriate. Two-way ANOVA with Bonferroni post-tests was also performed. For all tests, *p* < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Colonic hyperpermeability persists at day 28 after TNBS administration in mice

TNBS injection induced colitis was revealed by an increase in pro-inflammatory cytokine mRNA levels. Indeed, CXCL-1, TNFα and IL-1β levels increased at day 7 compared with day 0 (Fig. 1A). From day 14 to day 28, pro-inflammatory cytokine mRNA levels decreased and regained control level at day 28. Despite the resolution of inflammatory response, colonic paracellular permeability remained high (Fig. 1B). FITC-dextran flux increased over time from day 0 to day 28. This increase reached significance at day 14 and day 28. Expression of the TJ proteins, claudin-1 and occludin, were significantly reduced in TNBS mice at days 21 and 28 compared to day 0 (Fig. 1B). We also observed a trend for a reduction in ZO-1 protein expression but the difference did not reach significance at day 28 (Fig. 1B, *p* < 0.1), while it was significantly reduced at day 7. These data show that colonic paracellular hyperpermeability persisted at day 28 in TNBS mice despite restoration of inflammatory markers. Therefore, for the following experiments, we chose to study colonic parameters at day 28 in the TNBS model.

3.2. Colonic hyperpermeability is present in WAS mice

To evaluate stress response in WAS mice, we evaluated plasma corticosterone and fecal pellet output during each 1 h session of WAS. Fecal pellet output gradually increased during the first 5 days of stress, whereas it remained stable in control mice (Fig. 2A). Then, from day 5 to day 10, pellet output did not change over time either in control or in WAS mice. Thus, mean pellet output was higher in WAS mice than in controls (Fig. 2A). Plasma corticosterone level increased in WAS mice but not in controls at day 1 (1.94 fold change, Fig. 2B), whereas it was unchanged at day 10 (Fig. 2B). Then, we evaluated colonic inflammatory markers at day 10. MPO and mRNA levels for CXCL-1, TNFα and IL-1β were markedly increased in WAS mice (Fig. 2C). FITC-dextran passage across colonic mucosa was also higher in WAS mice than in controls at day 10 suggesting an increase in colonic paracellular permeability (Fig. 2D). Expression of TJ proteins was reduced in WAS mice at day 10 (Fig. 2D). Indeed, occludin and ZO-1 protein expression was significantly lower in WAS mice than in controls. We also observed a trend for claudin-1 (*p* < 0.1).

3.3. Proteasome system is altered in the colonic mucosa in both models

Interestingly, we observed a similar pattern of proteasome system modification in post-TNBS and WAS mice (Fig. 3). The trypsin-like activity of proteasome was enhanced 28 days after TNBS treatment and at day 10 in WAS mice (Fig. 3A and C), whereas other proteasome activities, i.e. chymotrypsin-like and caspase-like activities, remained unchanged (data not shown). Then, we evaluated the catalytic subunit composition of proteasome. We did not observe any significant modifications in constitutive subunit β1, β2 and β5 protein expression or in inducible subunit β1i, β2i and β5i protein expression (data not shown). However, the ratio of β2i/β2 was increased both in post-TNBS and WAS mice compared to controls (Fig. 3B and D), whereas β1i/β1 ratio was increased only in WAS mice (data not shown). These data suggest the replacement of constitutive proteasome by an immunoproteasome in post-TNBS and WAS mice, as previously described in IBD patients [38].

3.4. Proteasome inhibitor restores colonic permeability in post-TNBS and WAS mice

To evaluate the putative role of proteasome in the regulation of colonic permeability in these two models, we assessed the effects of a selective Inhibitor of immunoproteasome (IP). First, we checked whether

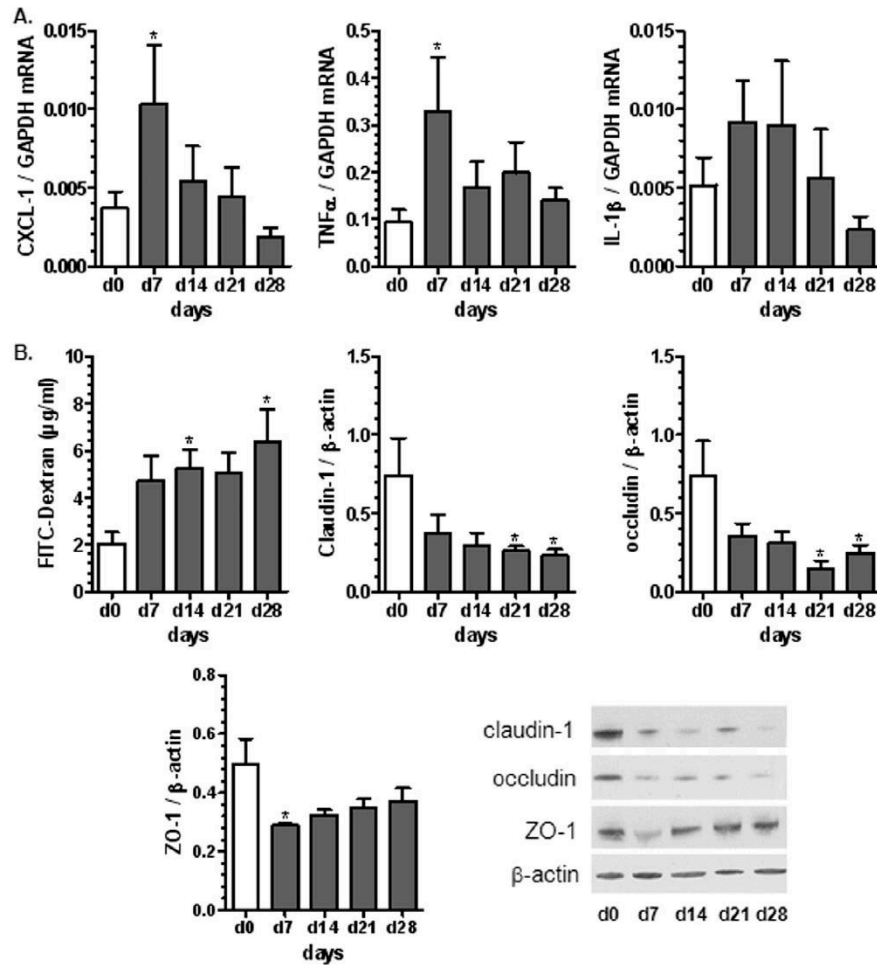


Fig. 1. Inflammatory response and paracellular permeability measured in the colon of mice receiving intracolonic TNBS instillation at day 0. CXCL-1, TNFα, IL-1β mRNA levels (A.) and colonic paracellular permeability (B.) were assessed at day 0 and then 7, 14, 21 and 28 days after TNBS administration. Claudin-1, occludin and ZO-1 (B.) protein expression was evaluated at day 0 and 28 days after TNBS administration. Values are means $\pm$ sem from $n = 8$ per time. ANOVA p values: (CXCL-1.) 0.0310, (TNFα.) 0.0413, (IL-1β.) $p < 0.1$, (FITC-dextran.) 0.0402. *, $p < 0.05$ vs. day 0 (d0).

IP inhibits trypsin-like activity in the colonic mucosa. As shown in Figs. 4 A and 5 A, IP injection prevented an increase in trypsin-like activity both in post-TNBS and WAS mice. Also, IP injection halted the increase in colonic permeability both in post-TNBS (Fig. 4B) and WAS mice (Fig. 5B). In addition, IP injection reduced MPO in WAS mice (Fig. 5C), but failed to restore pellet output to control level, even if the increase remained non significant between IP-treated controls and IP-treated WAS mice (Fig. 5D).

3.5. WAS does not induce colonic hyperpermeability in $\beta 2i$ knock-out mice

To confirm the effects of IP on colonic permeability, we used $\beta 2i$ $-/-$ mice but only in the WAS model. Indeed, it was previously reported that $\beta 2i$ $-/-$ mice were protected against colitis [20]. The WAS model

induced a marked increase in pellet output from day 1 to day 5 in *wild-type* mice (Fig. 6A). $\beta 2i$ $-/-$ mice exhibited lower pellet output than *wild-type* mice both in control and WAS conditions (Fig. 6A). However, we observed that the increase was delayed in $\beta 2i$ $-/-$ WAS mice compared to *wild-type* WAS mice (Fig. 6A). In $\beta 2i$ $-/-$ mice, trypsin-like activity was not increased by WAS whereas it increased in *wild-type* mice (Fig. 6B). Interestingly, mRNA levels for IL-1β and TNFα were also unaffected in $\beta 2i$ $-/-$ WAS mice (Fig. 6C). FITC-dextran flux measured in Ussing chambers increased across the colonic mucosa by WAS model in *wild-type* mice (Fig. 6D). In $\beta 2i$ $-/-$ WAS mice, FITC-dextran passage was markedly reduced compared to *wild-type* WAS mice, even if colonic permeability remained higher in $\beta 2i$ $-/-$ WAS mice compared to $\beta 2i$ $-/-$ control mice (Fig. 6D). Similar results have been observed for plasma FITC-dextran (Fig. 6D). These modifications may be related to the

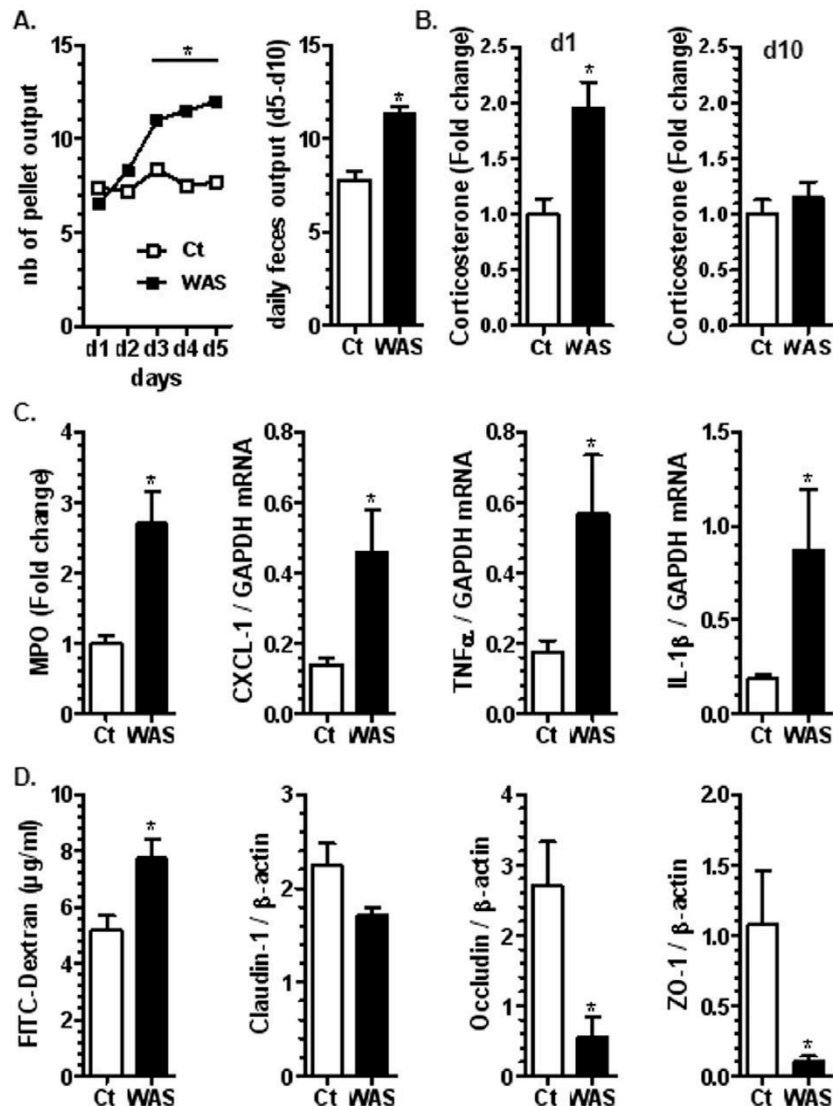


Fig. 2. Water avoidance stress (WAS) was performed from day 1 to day 10 during 1 h per day. Pellet output (A.) was monitored each day during 1 h of stress. Plasma corticosterone was assessed at day 1 and day 10 (B.). Myeloperoxidase or MPO level, CXCL-1, TNF α , IL-1 β mRNA levels (C.), colonic paracellular permeability, claudin-1, occludin and ZO-1 (D.) protein expression was evaluated in the colonic mucosa in control (Ct) and WAS mice. Values are means $\pm$ sem ($n = 8$ per group). Control values (means $\pm$ sem): Corticosterone d1: 45.0 ± 12.7 ng/mL; Corticosterone d10: 66.9 ± 17.8 ng/mL; MPO: 0.52 ± 0.09 U/g tissue. *, $p < 0.05$ vs. Ct.

restoration of occludin protein expression in $\beta 2i^{-/-}$ mice (Fig. 6D). Other TJ proteins were not changed in $\beta 2i^{-/-}$ mice compared to wild-type mice (data not shown).

3.6. Glutamine supplementation restores colonic permeability and occludin protein expression in both models

As glutamine has previously been shown to down-regulate intestinal inflammatory response in TNBS-induced colitis [39], it was administered between day 21 and day 28 in drinking water. Colonic

paracellular permeability was completely restored to control level in glutamine-supplemented TNBS mice (Fig. 7A). Occludin protein expression was affected by the treatment (Kruskal-Wallis $p = 0.0136$) but post-test did not reach significance. A trend for a decrease in occludin protein expression was observed in TNBS mice but not in glutamine-supplemented TNBS mice at day 28 (Fig. 7B).

In WAS mice, glutamine was administered in drinking water from day 1 to day 10. Glutamine supplementation prevented colonic inflammatory response, as shown by reduction in IL-1 β and TNF α mRNA levels (Fig. 8A). FITC-dextran flux was also reduced in glutamine-

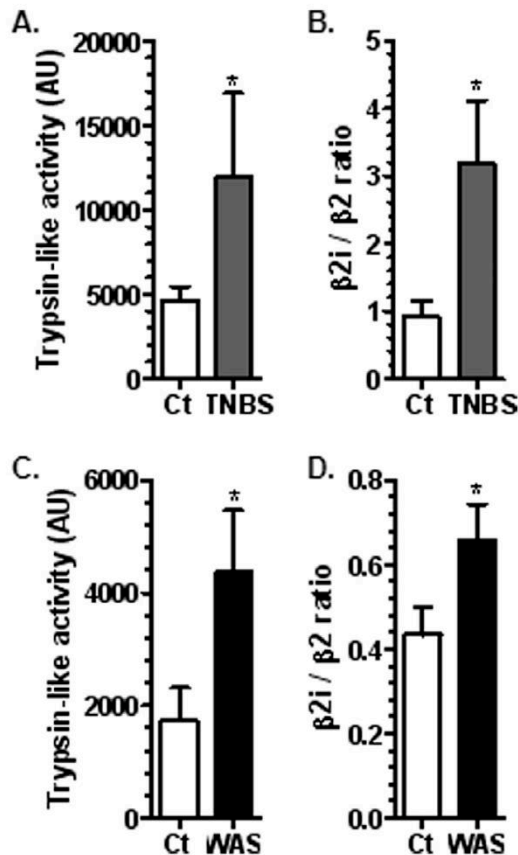


Fig. 3. Proteasome trypsin-like activity (A. and C.) and $\beta 2i / \beta 2$ proteasome subunit protein expression ratio (B. and D.) evaluated in mice 28 days after intracolonic TNBS instillation (A. and B.) and in mice after 10 days of water avoidance stress (WAS) (C. and D.). Values are means $\pm$ sem ($n = 8$ per group). *, $p < 0.05$ vs. Ct.

supplemented WAS mice compared to non-supplemented WAS mice (Fig. 8B). Similar results were observed for plasma FITC-dextran but the difference did not reach significance (Fig. 8B.). Finally, occludin protein expression, which was reduced in WAS mice, was restored in glutamine supplemented-WAS mice (Fig. 8B). Claudin-1 and ZO-1 protein expression remained unaffected by glutamine (data not shown).

In both models, proteasome activity was not affected by glutamine treatment (data not shown).

4. Discussion

The findings of our present study show that (i) the proteasome system is altered in two mice models demonstrating increased intestinal permeability, (ii) selective inhibition of immunoproteasome, by using a pharmacological approach in both models or in knock-out mice in the WAS model, restores intestinal permeability, (iii) glutamine supplementation, recently suggested as a putative candidate to limit intestinal hyperpermeability in different conditions [40], restores intestinal permeability.

Our findings add a new player to the pathophysiological mechanisms associated with the regulation of intestinal permeability, the proteasome

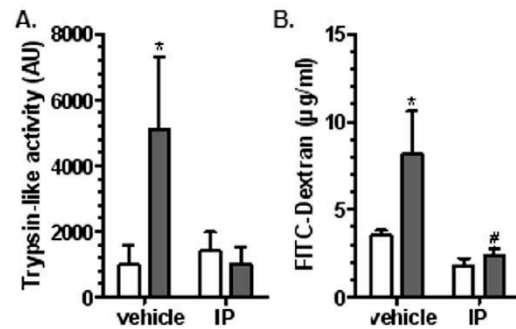


Fig. 4. Intracolonic TNBS instillation was performed at day 0. From day 21 to day 28, mice received either intraperitoneal injection of proteasome inhibitor (IP) or vehicle. Proteasome trypsin-like activity (A.) and colonic paracellular permeability (B.) were assessed at day 28. Open and grey bars represent control and TNBS mice, respectively. Values are means $\pm$ sem ($n = 7-8$ per group). Two-way ANOVA p values: (A.) $p(TNBS) = 0.0990$, $p(PI) = 0.1053$, $p(interaction) = 0.0463$; (B.) $p(TNBS) = 0.0155$, $p(PI) = 0.0010$, $p(interaction) = 0.0576$; *, $p < 0.05$ vs. Ct and #, $p < 0.05$ vs. vehicle.

system. In the ubiquitin proteasome system, which is involved in the regulation of several cellular pathways, i.e. cell proliferation, apoptosis, inflammatory response and antigen presentation [12], proteins are

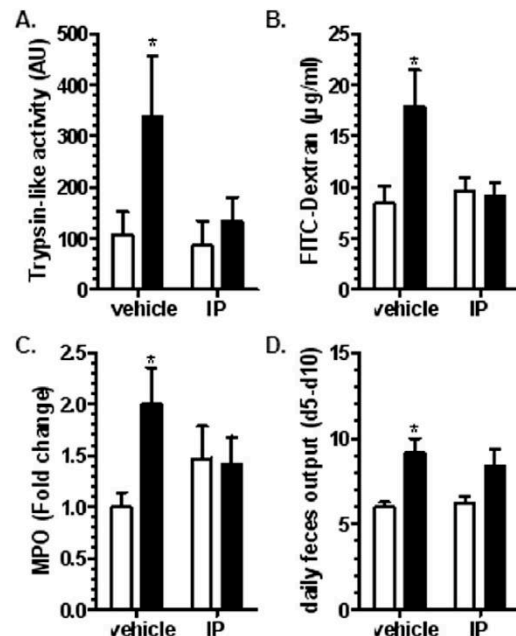


Fig. 5. Water avoidance stress (WAS) was performed from day 1 to day 10 during 1 h per day in mice receiving either intraperitoneal injection of proteasome inhibitor (IP) or vehicle. Proteasome trypsin-like activity (A.), colonic paracellular permeability (B.) and myeloperoxidase or MPO level (C.) were evaluated in the colonic mucosa at day 10. Pellet output (D.) was monitored each day during 1 h of stress. Open and closed bars represent control and WAS mice, respectively. Values are means $\pm$ sem ($n = 7-8$ per group). Control value (mean $\pm$ sem): MPO: 0.75 ± 0.07 U/g tissue. Two-way ANOVA p values: (A.) $p(WAS) = 0.0410$, $p(PI) = 0.0751$, $p(interaction) = 0.1694$; (B.) $p(WAS) = 0.0372$, $p(PI) = 0.0820$, $p(interaction) = 0.0254$; (C.) $p(WAS) = 0.0931$, $p(PI) = 0.8367$, $p(interaction) = 0.0451$; (D.) $p(WAS) = 0.0011$, $p(PI) = 0.7002$, $p(interaction) = 0.5224$. *, $p < 0.05$ vs. Ct.

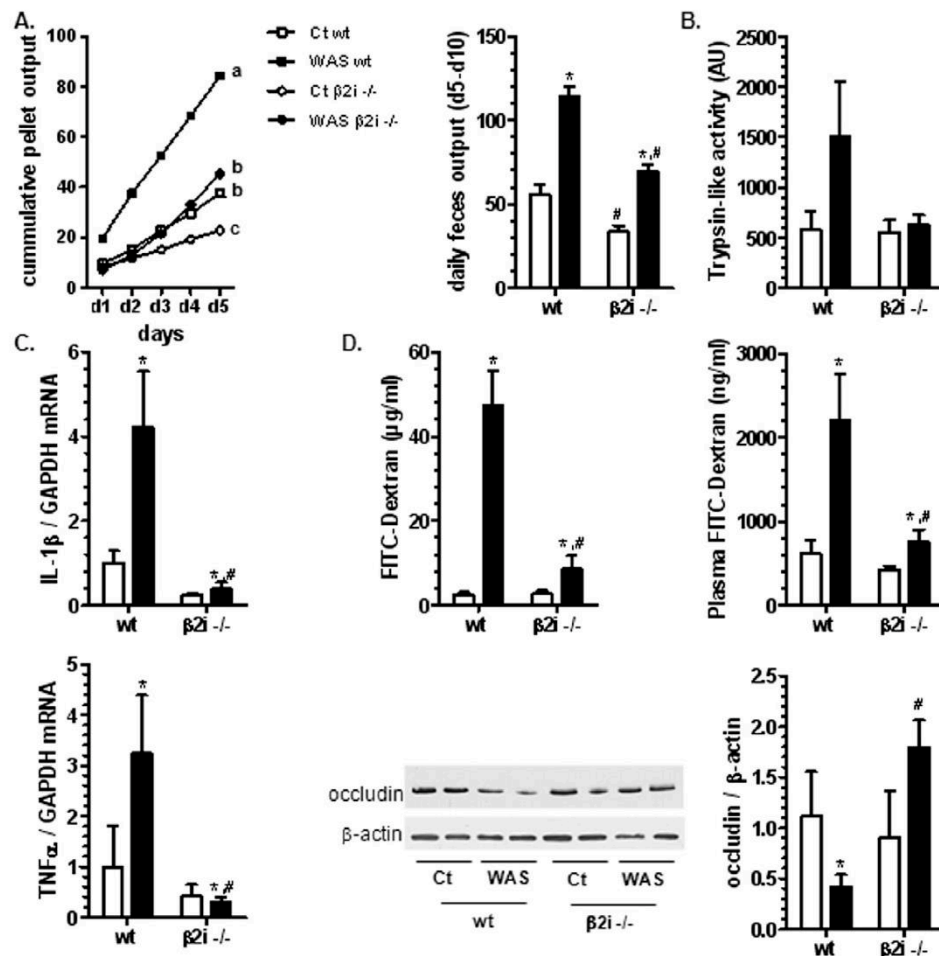


Fig. 6. Water avoidance stress (WAS) was performed from day 1 to day 10 during 1 h per day either in wild-type (wt) or knock-out mice for $\beta 2i$ proteasome subunit ($\beta 2i^{-/-}$). Pellet output (A.) was monitored each day during 1 h of stress. Proteasome trypsin-like activity (B.), IL-1 β (C.), TNF α (C.) mRNA levels, colonic paracellular permeability (D.) and occludin protein expression (D.) were evaluated in the colonic mucosa at day 10. Open and closed bars represent control and WAS mice, respectively. Values are means $\pm$ sem ($n = 7-8$ per group). Two-way ANOVA p values: (A. d1 to d5) $p(\text{WAS}) < 0.0001$, $p(\beta 2i^{-/-}) < 0.0001$, $p(\text{interaction}) < 0.0001$; (A. daily feces output) $p(\text{WAS}) < 0.0001$, $p(\beta 2i^{-/-}) < 0.0001$, $p(\text{interaction}) = 0.0355$; (B.) $p(\text{WAS}) = 0.0451$, $p(\beta 2i^{-/-}) = 0.1389$, $p(\text{interaction}) = 0.1607$; (C. IL-1 β) $p(\text{WAS}) = 0.0230$, $p(\beta 2i^{-/-}) = 0.0029$, $p(\text{interaction}) = 0.0378$; (C. TNF α) $p(\text{WAS}) = 0.0992$, $p(\beta 2i^{-/-}) = 0.0181$, $p(\text{interaction}) = 0.1016$; (D. FITC-dextran) $p(\text{WAS}) < 0.0001$, $p(\beta 2i^{-/-}) = 0.0003$, $p(\text{interaction}) = 0.0003$; (D. plasma FITC-dextran) $p(\text{WAS}) < 0.0036$, $p(\beta 2i^{-/-}) = 0.0119$, $p(\text{interaction}) = 0.0454$; (D. occludin) $p(\text{WAS}) = 0.7877$, $p(\beta 2i^{-/-}) = 0.1092$, $p(\text{interaction}) = 0.0318$. *, $p < 0.05$ vs. Ct and #, $p < 0.05$ vs. wt.

polyubiquitinated and then processed by the constitutive 26S proteasome, a large ATP-dependent multicatalytic complex. We previously showed that the proteasome system is altered in the colonic mucosa of IBD and IBS patients. Indeed, increased trypsin-like activity and changes in proteasome subunit composition suggest the replacement of constitutive 26S proteasome by an immunoproteasome in IBS patients [11]. Changes in the proteasome system have also been observed in IBD patients [17,41] but the pattern of proteasome activities seemed to be different between IBS and IBD patients [11]. In some IBS patients, but not in all, intestinal permeability is altered [42–44]. Interestingly, Vivinus-Nebot et al. also reported intestinal hyperpermeability in quiescent IBD patients with IBS symptoms [45] but it remained unknown whether proteasome alterations persisted or changed throughout IBD. In the present study, we used two different models: a post-inflammatory model (post-

TNBS) able to mimic IBS symptoms in quiescent IBD patients and a stress model (WAS model) able to mimic IBS. Indeed, stress has been suggested as playing a key role in IBS pathophysiology [46]. Post-TNBS and WAS mice exhibited similar alterations to those observed in IBS patients, with an increase in trypsin-like activity and $\beta 2i/\beta 2s$ subunit ratio. In addition, in both models, we also observed an increase in intestinal permeability, even if TJ protein expression was differentially affected. Indeed, claudin-1 protein expression was reduced in post-TNBS mice whereas WAS mice exhibited decreased ZO-1 protein expression. In contrast, occludin protein expression was altered in both models. Different patterns of TJ protein alteration have been described previously according to the models [47–49]. Traweger et al. showed that occludin is a target of the proteasome system by the ubiquitin ligase enzyme E3 called Itch [10] and we then speculated that occludin down-regulation in IBS

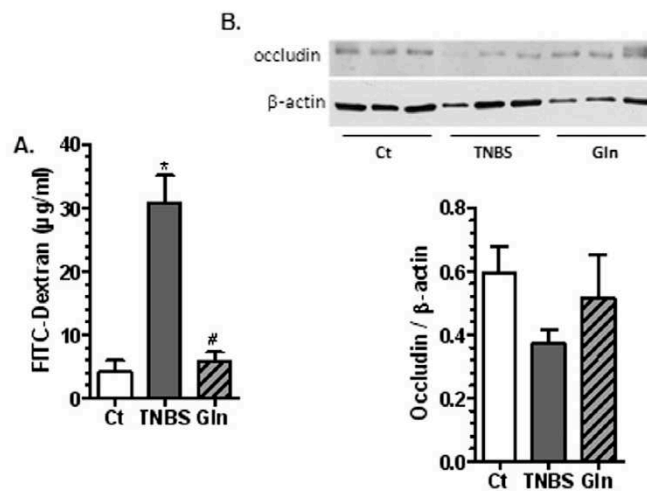


Fig. 7. Intracolonic TNBS instillation was performed at day 0. From day 21 to day 28, mice received glutamine in drinking water. Colonic paracellular permeability (A.) and occludin protein expression (B.) were assessed at day 28. Open and grey bars represent control and TNBS mice, respectively. Values are means $\pm$ sem ($n = 7-8$ per group). Kruskal-Wallis p values (A.) 0.0004, (B.) 0.0136. *, $p < 0.05$ vs. Ct and #, $p < 0.05$ vs. TNBS.

patients could be a consequence of its increased degradation by the proteasome system [11]. However, in the latter study, we were not able to show whether the proteasome system was involved in intestinal hyperpermeability. In the present study, by using pharmacological inhibition and knock-out mice, we were able to blunt intestinal hyperpermeability and to restore occludin protein expression. In IBD mice models, proteasome inhibition prevented colitis [20,22]. To our knowledge, our data are the first to show intestinal permeability improvement by proteasome targeting. Selective inhibitors of the immunoproteasome and constitutive proteasome have recently been generated and could be further evaluated in quiescent IBD and IBS patients with increased intestinal permeability [50].

Interestingly, in the WAS model, proteasome targeting was also associated with a reduction in both colonic inflammatory response and pellet output, suggesting that proteasome inhibition may also interfere, directly or not, with other pathways. It is well established that inflammatory response is regulated by the proteasome system since several factors, i.e. I κ B α , NF- κ B, are degraded by the proteasome. In addition, Zhou et al. recently underlined, by using microarray analysis of miR-29 targets, potential interactions between the proteasome system, inflammatory response and TJ proteins [3]. To our knowledge, there is no previous data showing interaction between the proteasome system and intestinal functional disorders, thus requiring further exploration.

Finally, we evaluated the effects of glutamine supplementation in both models because (i) glutamine has beneficial effects on gut barrier in different conditions [25,33,51], (ii) alterations in glutamine metabolism have been reported both in IBD [29] and IBS patients [28] and (iii) glutamine is able to regulate the ubiquitination of several proteins involved in inflammatory and stress responses or metabolism [14,30,31,52,53]. Interestingly, glutamine supplementation was able to restore intestinal permeability both in post-TNBS and WAS mice. As glutamine has been shown to have anti-inflammatory effects in intestinal tissues [54,55], we administered glutamine after acute inflammatory response in TNBS mice. In WAS mice, glutamine reduced IL-1 β and TNF α mRNA levels confirming the anti-inflammatory effects of glutamine. In glutamine-supplemented mice, we also observed restoration of occludin protein expression. These data are in accordance with previous data showing that glutamine deprivation or supplementation is able to modify TJ proteins [23,24]. In a pilot study, we recently showed that incubation of colonic

biopsies from diarrhea-predominant IBS patients with increasing concentrations of glutamine affected claudin-1, claudin-4 and occludin protein expression [32]. All these data suggest that glutamine supplementation may be beneficial to restore intestinal permeability in different pathophysiological conditions. However, in the present study, we did not use isocaloric or isonitrogenous solution in non-supplemented groups. The specificity of glutamine effects, the mechanisms of action and the best delivery method for glutamine require further investigations. Indeed, glutamine did not affect proteasome activity in the present study in accordance with previous data [14,30], but glutamine has been reported to be able to modulate ubiquitination processes [30,31]. Whether glutamine may affect occludin degradation through the modulation of its ubiquitination warrants further investigation.

In conclusion, we provide evidence that (i) the proteasome system is altered in two mice models with intestinal hyperpermeability; (ii) proteasome inhibition is associated with an improvement in intestinal permeability. Therefore, proteasome targeting represents a new therapeutic strategy for the treatment of patients with increased intestinal permeability.

Authors' contribution

IG, CL, SA, WB, CBF and MM performed experiments and analyses. IG and MC designed experiments. IG, CL, WB and MC interpreted the data. IG and MC wrote the main manuscript text and prepared figures. All authors reviewed the manuscript.

Financial support

This study was supported by the Cephalon Research Prize, by INSERM and the University of Rouen. IG was supported by a grant from the Région Haute-Normandie. These funders did not participate in the design, implementation, analysis and interpretation of the data.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

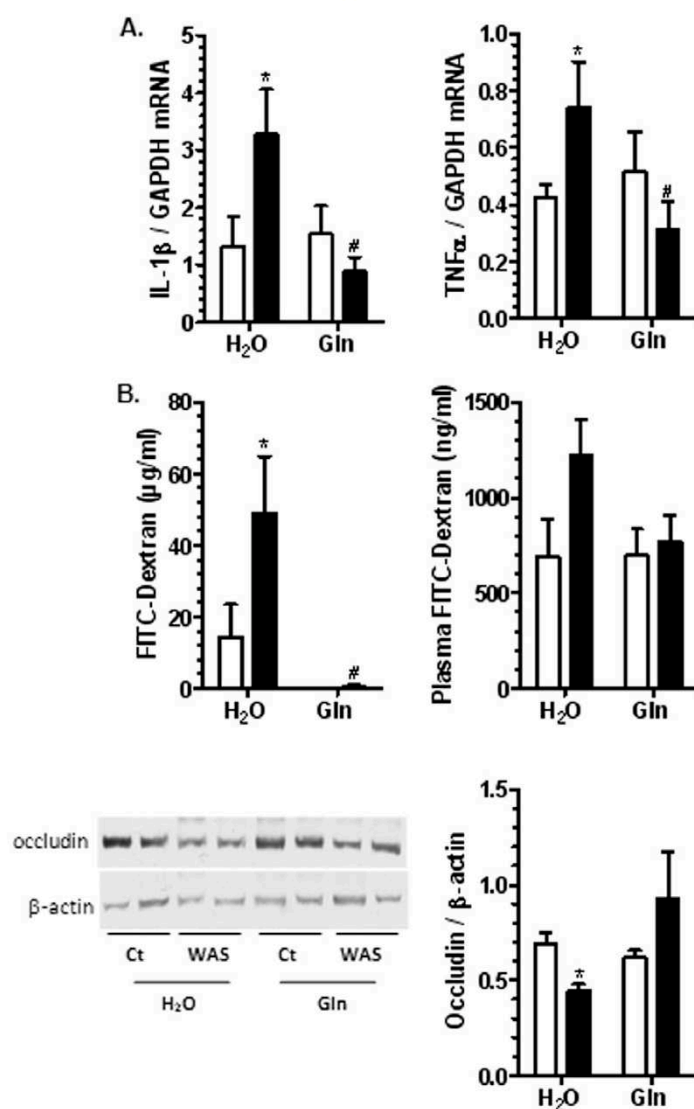


Fig. 8. Water avoidance stress (WAS) was performed from day 1 to day 10 during 1 h per day in mice receiving or not glutamine in drinking water. IL-1β (A), TNFα (A) mRNA levels, colonic paracellular permeability (B) and occludin protein expression (B) were evaluated in the colonic mucosa at day 10. Open and closed bars represent control and WAS mice, respectively. Values are means $\pm$ sem ($n = 7-8$ per group). Two-way ANOVA p values: (A. IL-1β) $p(\text{WAS}) = 0.2438$, $p(\text{Gln}) = 0.0581$, $p(\text{interaction}) = 0.0241$; (A. TNFα) $p(\text{WAS}) = 0.6532$, $p(\text{Gln}) = 0.1656$, $p(\text{interaction}) = 0.0406$; (B. FITC-dextran) $p(\text{WAS}) = 0.0567$, $p(\text{Gln}) = 0.0014$, $p(\text{interaction}) = 0.0628$; (B. plasma FITC-dextran) $p(\text{WAS}) = 0.0761$, $p(\text{Gln}) = 0.1825$, $p(\text{interaction}) = 0.1726$; (B. Occludin) $p(\text{WAS}) = 0.8207$, $p(\text{Gln}) = 0.1101$, $p(\text{interaction}) = 0.0341$. *, $p < 0.05$ vs. Ct and #, $p < 0.05$ vs. H₂O.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

This study was supported by a Cephalon Research Prize, by INSERM and the University of Rouen. IG was supported by a grant from the Région Haute-Normandie.

The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

References

- [1] B. Brzozowski, A. Mazur-Bialy, R. Pajdo, S. Kwiecien, J. Bilski, M. Zwolinska-Wcislo, T. Mach, T. Brzozowski, Mechanisms by which stress affects the experimental and clinical inflammatory bowel disease (IBD), Role of Brain-Gut Axis, Curr Neuropharmacol, 2016.
- [2] P.D. Cani, S. Possemiers, T. Van de Wiele, Y. Guiot, A. Everard, O. Rottier, L. Geurts, D. Naslain, A. Neyrinck, D.M. Lambert, G.G. Muccioli, N.M. Delzenne, Changes in gut

- microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability, *Gut* 58 (2009) 1091–1103.
- [3] Q. Zhou, S. Costinean, C.M. Croce, A.R. Brasier, S. Merwat, S.A. Larson, S. Basra, G.N. Verne, MicroRNA 29 targets nuclear factor-kappaB-repressing factor and claudin 1 to increase intestinal permeability, *Gastroenterology* 148 (2015) 158–169 e158.
 - [4] A. Nasrat, J.R. Turner, J.L. Madara, Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279 (2000) G851–G857.
 - [5] S. Tsukita, M. Furuse, M. Itoh, Structural and signalling molecules come together at tight junctions, *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1999) 628–633.
 - [6] N. Gassler, C. Rohr, A. Schneider, J. Kartenbeck, A. Bach, N. Obermuller, H.F. Otto, F. Autschbach, Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281 (2001) G216–G228.
 - [7] R. Al-Sadi, D. Ye, H.M. Said, T.Y. Ma, IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF-kappaB pathway, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 2310–2322.
 - [8] N. Bertiaux-Vandaele, S. Beutheu Youmba, L. Belmonte, S. Leclaire, M. Antonietti, G. Gourcerol, A. Leroi, P. Dechelotte, J. Ménard, P. Ducrotte, M. Coeffier, The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype, *Am. J. Gastroenterol.* 166 (2011) 2165–2173.
 - [9] C.B. de La Serre, C.L. Ellis, J. Lee, A.L. Hartman, J.C. Rutledge, H.E. Raybould, Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299 (2010) G440–G448.
 - [10] A. Traweger, D. Fang, Y.C. Liu, W. Stelzhammer, I.A. Krizbai, F. Fresser, H.C. Bauer, H. Bauer, The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase Itch, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 10201–10208.
 - [11] M. Coeffier, R. Gloro, N. Boukhettala, M. Aziz, S. Leclaire, N. Vandaele, M. Antonietti, G. Savoye, C. Bole-Feyssot, P. Dechelotte, J.M. Reimund, P. Ducrotte, Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome, *Am. J. Gastroenterol.* 105 (2010) 1181–1188.
 - [12] M.H. Glickman, A. Ciechanover, The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 373–428.
 - [13] J. Bertrand, A. Goichon, P. Dechelotte, M. Coeffier, Regulation of intestinal protein metabolism by amino acids, *Amino Acids* 45 (2013) 443–450.
 - [14] J. Bertrand, R. Marion-Letellier, S. Azhar, P. Chan, R. Legrand, A. Goichon, I. Ghoulali, M. Aziz, D. Vaudry, G. Savoye, P. Dechelotte, M. Coeffier, Glutamine enema regulates colonic ubiquitinated-proteins but not proteasome activities during TNBS-induced colitis leading to increased mitochondrial activity, *Proteomics* 15 (2015) 2198–2210.
 - [15] B. Boes, H. Hengel, T. Ruppert, G. Multhaup, U.H. Koszinowski, P.M. Klotzel, Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes, *J. Exp. Med.* 179 (1994) 901–909.
 - [16] J. Leblond, A. Hubert-Buron, C. Bole-Feyssot, P. Ducrotte, P. Dechelotte, M. Coeffier, Regulation of proteolysis by cytokines in the human intestinal epithelial cell line HCT-8: role of IFN-gamma, *Biochimie* 88 (2006) 759–765.
 - [17] A. Visekruna, T. Joeris, D. Seidel, A. Kroesen, C. Loddenkemper, M. Zeit, S.H. Kaufmann, R. Schmidt-Ullrich, U. Steinhoff, Proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 3195–3203.
 - [18] I. Cleyne, E. Vazeille, M. Artieda, H.W. Verspaget, M. Szczepiorska, M.A. Bringer, P.L. Lakatos, F. Seibold, K. Parnell, R.K. Weersma, J.M. Mahachie John, R. Morgan-Walsh, D. Staelens, I. Arijis, G. De Hertogh, S. Muller, A. Tordai, D.W. Hommes, T. Ahmad, C. Wijnga, S. Pender, P. Rutgeerts, K. Van Steen, D. Lottaz, S. Vermeire, A. Darfeuille-Michaud, Genetic and microbial factors modulating the ubiquitin proteasome system in inflammatory bowel disease, *Gut* 63 (2014) 1265–1274.
 - [19] M. Coeffier, R. Gloro, N. Boukhettala, M. Aziz, S. Leclaire, N. Vandaele, M. Antonietti, G. Savoye, C. Bole-Feyssot, P. Dechelotte, J.M. Reimund, P. Ducrotte, Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome, *Am. J. Gastroenterol.* 105 (2010) 1181–1188 (In press).
 - [20] M. Basler, M. Dajee, C. Moll, M. Groettrup, C.J. Kirk, Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome, *J. Immunol.* 185 (2010) 634–641.
 - [21] S. Inoue, H. Nakase, M. Matsuura, S. Mikami, S. Ueno, N. Uza, T. Chiba, The effect of proteasome inhibitor MG132 on experimental inflammatory bowel disease, *Clin. Exp. Immunol.* 156 (2009) 172–182.
 - [22] N. Schmidt, E. Gonzalez, A. Visekruna, A.A. Kuhl, C. Loddenkemper, H. Mollenkopf, S.H. Kaufmann, U. Steinhoff, T. Joeris, Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis, *Gut* 59 (2010) 896–906.
 - [23] S. Beutheu, I. Ghoulali, L. Galas, P. Dechelotte, M. Coeffier, Glutamine and arginine improve permeability and tight junction protein expression in methotrexate-treated Caco-2 cells, *Clin. Nutr.* 32 (2013) 863–869.
 - [24] N. Li, P. Lewis, D. Samuelson, K. Liboni, J. Neu, Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287 (2004) G726–G733.
 - [25] S. Beutheu, W. Ouelaa, C. Guerin, L. Belmonte, M. Aziz, N. Tonnoune, C. Bole-Feyssot, L. Galas, P. Dechelotte, M. Coeffier, Glutamine supplementation, but not combined glutamine and arginine supplementation, improves gut barrier function during chemotherapy-induced intestinal mucositis in rats, *Clin. Nutr.* 33 (2014) 694–701.
 - [26] K. Choi, S.S. Lee, S.J. Oh, S.Y. Lim, W.K. Jeon, T.Y. Oh, J.W. Kim, The effect of oral glutamine on 5-fluorouracil/leucovorin-induced mucositis/stomatitis assessed by intestinal permeability test, *Clin. Nutr.* 26 (2007) 57–62.
 - [27] B. Daniele, F. Perrone, C. Gallo, S. Pignata, S. De Martino, R. De Vivo, E. Barletta, R. Tambaro, R. Abbiati, L. D'Agostino, Oral glutamine in the prevention of fluorouracil induced intestinal toxicity: a double blind, placebo controlled, randomised trial, *Gut* 48 (2001) 28–33.
 - [28] Q. Zhou, W.W. Souba, C.M. Croce, G.N. Verne, MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome, *Gut* 59 (2010) 775–784.
 - [29] B. Sido, C. Seel, A. Hochlehnert, R. Breikreutz, W. Droge, Low intestinal glutamine level and low glutaminase activity in Crohn's disease: a rationale for glutamine supplementation? *Dig. Dis. Sci.* 51 (2006) 2170–2179.
 - [30] A. Hubert-Buron, J. Leblond, A. Jacquot, P. Ducrotte, P. Dechelotte, M. Coeffier, Glutamine pretreatment reduces IL-8 production in human intestinal epithelial cells by limiting IkappaBalpha ubiquitination, *J. Nutr.* 136 (2006) 1461–1465.
 - [31] K.D. Singleton, P.E. Wischmeyer, Glutamine attenuates inflammation and NF-kappaB activation via Cullin-1 deneddylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 (2008) 445–449.
 - [32] J. Bertrand, I. Ghoulali, C. Guerin, C. Bole-Feyssot, M. Gouteux, P. Dechelotte, P. Ducrotte, M. Coeffier, Glutamine restores tight junction protein claudin-1 expression in colonic mucosa of patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, *J. Parenter. Enteral Nutr.* (2015).
 - [33] A. Seth, S. Basuroy, P. Sheth, R.K. Rao, L-glutamine ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287 (2004) G510–G517.
 - [34] C. Kilkenny, N. Parsons, E. Kadyaszewski, M.F. Festing, I.C. Cuthill, D. Fry, J. Hutton, D.G. Altman, Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals, *PLoS One* 4 (2009), e7824.
 - [35] M. Coeffier, S. Claeysens, B. Heckeysweiler, A. Lavoine, P. Ducrotte, P. Dechelotte, Enteral glutamine stimulates protein synthesis and decreases ubiquitin mRNA level in human gut mucosa, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285 (2003) G266–G273.
 - [36] P. Jesus, W. Ouelaa, M. Francois, L. Riachy, C. Guerin, M. Aziz, J.C. Do Rego, P. Dechelotte, S.O. Fetisov, M. Coeffier, Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice, *Clin. Nutr.* 33 (2014) 1046–1053.
 - [37] M. Coeffier, S. Claeysens, C. Bole-Feyssot, C. Guerin, B. Maurer, S. Leclaire, A. Lavoine, N. Donnadieu, A.F. Cailleux, P. Dechelotte, Enteral delivery of proteins stimulates protein synthesis in human duodenal mucosa in the fed state through a mammalian target of rapamycin independent pathway, *Am. J. Clin. Nutr.* 97 (2013) 286–294.
 - [38] A. Visekruna, N. Slavova, S. Dullat, J. Grone, A.J. Kroesen, J.P. Ritz, H.J. Buhr, U. Steinhoff, Expression of catalytic proteasome subunits in the gut of patients with Crohn's disease, *Int. J. Color. Dis.* 24 (2009) 1133–1139.
 - [39] M. Coeffier, R. Marion-Letellier, P. Dechelotte, Potential for amino acids supplementation during inflammatory bowel diseases, *Inflamm. Bowel Dis.* 16 (2010) 518–524.
 - [40] M. Coeffier, P. Dechelotte, P. Ducrotte, Intestinal permeability in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome: is there a place for glutamine supplementation? *Gastroenterology* 148 (2015) 1079–1080.
 - [41] A. Visekruna, T. Joeris, N. Schmidt, M. Lawrenz, J.P. Ritz, H.J. Buhr, U. Steinhoff, Comparative expression analysis and characterization of 20S proteasomes in human intestinal tissues: the proteasome pattern as diagnostic tool for IBD patients, *Inflamm. Bowel Dis.* 15 (2009) 526–533.
 - [42] Q. Zhou, B. Zhang, G.N. Verne, Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome, *Pain* 146 (2009) 41–46.
 - [43] A. Annahazi, L. Ferrier, V. Bezirard, M. Leveque, H. Eutamene, A. Ait-Belgnaoui, M. Coeffier, P. Ducrotte, R. Roka, O. Incze, K. Gecse, A. Rosztozy, T. Molnar, T. Ringel-Kulka, Y. Ringel, T. Piche, V. Theodorou, T. Wittmann, L. Bueno, Luminal cysteine-proteases degrade colonic tight junction structure and are responsible for abdominal pain in constipation-predominant IBS, *Am. J. Gastroenterol.* 108 (2013) 1322–1331.
 - [44] Z. Mujagic, S. Ludidi, D. Keszthelyi, M.A. Hesselink, J.W. Kruiem, K. Lenaerts, N.M. Hanssen, J.M. Conchillo, D.M. Jonkers, A.A. Masclee, Small intestinal permeability is increased in diarrhoea predominant IBS, while alterations in gastroduodenal permeability in all IBS subtypes are largely attributable to confounders, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 40 (2014) 288–297.
 - [45] M. Vivinus-Nebot, G. Frin-Mathy, H. Bziouche, R. Dainese, G. Bernard, R. Anty, J. Filippi, M.C. Saint-Paul, M.K. Tulic, V. Verhasselt, X. Hebuterne, T. Piche, Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation, *Gut* 63 (2014) 744–752.
 - [46] R.D. Moloney, S.M. O'Mahony, T.G. Dinan, J.F. Cryan, Stress-induced visceral pain: toward animal models of irritable-bowel syndrome and associated comorbidities, *Front. Psychiatry* 6 (2015) 15.
 - [47] E. Loeuillard, J. Bertrand, A. Herranen, C. Melchior, C. Guerin, M. Coeffier, M. Aziz, P. Dechelotte, G. Savoye, R. Marion-Letellier, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colitis with fibrosis and modulation of TGF-beta1 signaling, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 18207–18215.
 - [48] L.S. Poritz, K.I. Garver, C. Green, L. Fitzpatrick, F. Ruggiero, W.A. Koltun, Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis, *J. Surg. Res.* 140 (2007) 12–19.
 - [49] C.M. Xia, Y. Zhao, L. Jiang, J. Jiang, S.C. Zhang, *Schistosoma japonicum* ova maintains epithelial barrier function during experimental colitis, *World J. Gastroenterol.* 17 (2011) 4810–4816.
 - [50] A.F. Kisselev, M. Groettrup, Subunit specific inhibitors of proteasomes and their potential for immunomodulation, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 23 (2014) 16–22.
 - [51] J. Benjamin, G. Makharia, V. Ahuja, K.D. Anand Rajan, M. Kalaivani, S.D. Gupta, Y.K. Joshi, Glutamine and whey protein improve intestinal permeability and morphology in patients with Crohn's disease: a randomized controlled trial, *Dig. Dis. Sci.* 57 (2012) 1000–1012.

- [52] J. Bertrand, A. Goichon, P. Chan, S. Azhar, S. Lecleire, N. Donnadieu, D. Vaudry, A.F. Cailleux, P. Dechelotte, M. Coeffier, Enteral glutamine infusion modulates ubiquitination of heat shock proteins, Grp-75 and Apg-2, in the human duodenal mucosa, *Amino Acids* 46 (2014) 1059–1067.
- [53] J. Bertrand, N. Tennoune, R. Marion-Letellier, A. Goichon, P. Chan, K. Mbodji, D. Vaudry, P. Dechelotte, M. Coeffier, Evaluation of ubiquitinated proteins by proteomics reveals the role of the ubiquitin proteasome system in the regulation of Grp75 and Grp78 chaperone proteins during intestinal inflammation, *Proteomics* 13 (2013) 3284–3292.
- [54] M. Coeffier, R. Marion, P. Ducrotte, P. Dechelotte, Modulating effect of glutamine on IL-1beta-induced cytokine production by human gut, *Clin. Nutr.* 22 (2003) 407–413.
- [55] N.A. Kretzmann, H. Fillmann, J.L. Mauriz, C.A. Marroni, N. Marroni, J. Gonzalez-Gallego, M.J. Tunon, Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* 14 (2008) 1504–1513.

II. ARTICLE 2

COLONIC PROTEOME SIGNATURE IN IMMUNOPROTEASOME-DEFICIENT STRESSED MICE AND ITS RELEVANCE FOR IRRITABLE BOWEL SYNDROME.

Goichon A, **Bahlouli W**, Ghouzali I, Chan P, Vaudry D, Déchelotte P, Ducrotté P, Coëffier M.

Article paru dans *Journal of Proteome Research* (J Proteome Res)

L'hyperperméabilité intestinale est un facteur fortement impliqué dans la physiopathologie du SII. Il a été suggéré dans l'étude précédente l'implication du protéasome dans la régulation de la perméabilité intestinale dans des modèles SII-Like. En effet, l'augmentation de la perméabilité intestinale était associée à une augmentation de la dégradation des protéines de jonctions serrées liée probablement à l'augmentation de l'activité trypsine-like du protéasome. L'inhibition de ce dernier, par voie pharmacologique et/ou génétique, permettait de restaurer la perméabilité intestinale (333).

Le but de cette étude était d'abord de valider l'implication du protéasome dans la physiopathologie du SII chez l'Homme et l'animal et de mieux comprendre les voies impliquées par une étude protéomique.

Des souris mâles C57BL/6 sauvages et KO pour la sous-unité du protéasome $\beta 2i$ (ou MECL1-/-) ont été utilisées, ces souris ont été validées dans l'étude précédente comme un modèle SII-Like-WAS (333). Sur des échantillons de colon, nous avons évalué la perméabilité intestinale et la production des cytokines pro-inflammatoires chez la souris $\beta 2i$ (ou MECL1-/-). Il a également été étudié le profil du protéome colique. De plus, des patients SII-D, diagnostiqués selon les critères de ROME III, ont été sélectionnés. Sur des biopsies coliques, le profil d'ubiquitination de protéines coliques a été étudié.

Nous avons confirmé que l'inhibition génétique du protéasome diminue l'hyperperméabilité colique et qu'elle modifie le profil protéique colique. Nous avons en effet montré que le

protéome colique était altéré chez les souris SII-Like-WAS sauvages et particulièrement les protéines impliquées dans le système ubiquitine du protéasome, dans le métabolisme mitochondrial. Il a été également rapporté des modifications de l'ubiquitome colique chez des patients SII-D, particulièrement une diminution des protéines ubiquitinées impliquées dans l'inflammation intestinale.

En conclusion, cette étude confirme l'implication du protéasome au cours du SII (chez l'Homme et l'animal) et montre également que son inhibition limite l'hyperperméabilité colique et propose les voies impliquées. Enfin, le protéasome pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement du SII associé à l'hyperperméabilité intestinale.

Colonic Proteome Signature in Immunoproteasome-Deficient Stressed Mice and Its Relevance for Irritable Bowel Syndrome

Alexis Goichon,^{†,‡,§,||} Wafa Bahloul,^{†,‡} Ibtissem Ghouzali,^{†,‡} Philippe Chan,^{†,§} David Vaudry,^{†,§,||} Pierre Déchelotte,^{†,‡,⊥} Philippe Ducrotté,^{†,‡,§,⊥} and Moïse Coëffier^{*,†,‡,⊥}

[†]INSERM unit 1073, Normandie University, UNIROUEN, 22 boulevard Gambetta, Rouen, F-76183, France

[‡]Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Normandie University, UNIROUEN, Rouen, F-76183, France

[§]Platform in proteomics PISSARO, Normandie University, UNIROUEN, Rouen, F-76821, France

^{||}INSERM unit 1239, Normandie University, UNIROUEN, Rouen, F-76821, France

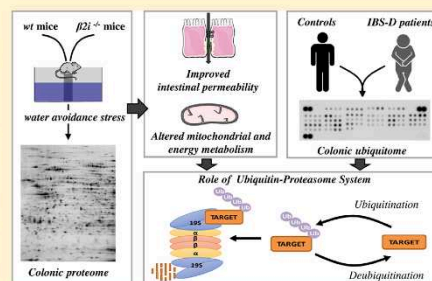
[⊥]Nutrition Department, Rouen University Hospital, Rouen, F-76031, France

^{*}Gastroenterology Department, Rouen University Hospital, Rouen, F-76031, France

Supporting Information

ABSTRACT: A role for immunoproteasome in the regulation of intestinal permeability has been previously suggested both in mice during water avoidance stress (WAS) and in patients with irritable bowel syndrome (IBS). Here, we provide evidence that the ubiquitin–proteasome system (UPS) contributes to the pathophysiology of IBS. Indeed, we report that colonic proteome is altered in WAS mice and that $\beta 2i$ subunit deficiency modifies the proteome response that is associated with a limitation of colonic hyperpermeability. Interestingly, we show specific alterations of proteins involved in UPS, mitochondrial, and energy metabolism. We also report changes in the pattern of colonic ubiquitome in diarrhea-predominant IBS (IBS-D) patients and particularly a reduced expression of ubiquitinated proteins involved in the nuclear factor- κ B (NF- κ B) inflammatory signaling pathway. All these data suggest that immunoproteasome targeting may represent a new therapeutic strategy for the treatment of IBS patients with increased intestinal permeability.

KEYWORDS: colonic proteome, immunoproteasome, irritable bowel syndrome, water avoidance stress



1. INTRODUCTION

Irritable bowel syndrome (IBS) is a functional gastrointestinal (GI) disorder that affects 5–20% of the general population in industrialized countries.^{1,2} It is characterized by chronic abdominal pain associated with diarrhea and/or constipation, bloating, and urgency.³ Recent studies have shown that IBS-associated symptoms, such as visceral hypersensitivity, low-grade inflammation, or pain, may be linked to disturbances in intestinal barrier function.^{4–9} Alterations were observed in the expression and distribution of intestinal tight junctions (TJs), apical protein structures that control paracellular permeability.^{10–12} Indeed, IBS patients with diarrhea-predominant irritable bowel symptoms (IBS-D) exhibited an increased permeability in both colon¹³ and jejunum¹² and a reduced expression of several TJ proteins such as occludin, zonula, occludens-1 (ZO-1), and claudin-1.^{11,12} Emerging evidence supports the concept of an altered colonic ubiquitin–proteasome system (UPS) in IBS patients that could be responsible for intestinal barrier dysfunction. Interestingly, occludin has been reported as a functional target of the E3

ubiquitin–protein ligase Itch,¹⁴ and we have previously shown that the low expression of occludin in the colonic mucosa of IBS patients was related to its higher degradation by UPS.¹¹

UPS is a major pathway of proteolysis in eukaryotic cells and may contribute to the regulation of many intestinal biological processes, such as inflammatory response, cell proliferation, and apoptosis.^{10,15,16} Targeted proteins by UPS are poly-ubiquitinated and then processed by the constitutive 20S proteasome, which comprises three catalytic subunits named $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 5$. In mammals, the exposure of cells to inflammatory cytokines such as IFN- γ or TNF- α leads to the formation of an immunoproteasome that can be distinguished from its constitutive homologue through assembly of the catalytic immunosubunits named LMP2 ($\beta 1i$), MECL-1 ($\beta 2i$), and LMP7 ($\beta 5i$).¹⁷ An increased expression of immunoproteasome subunits in intestinal epithelial cell lines stimulated by IFN- γ has been reported.^{15,16} In vivo, the immunosubunits $\beta 1i$

Received: October 8, 2018

Published: November 26, 2018

and $\beta 2i$ were strongly upregulated in colon tissues of IBS¹⁰ and Crohn's disease (CD) patients¹⁵ but not in patients with ulcerative colitis. Proteasome inhibitors such as bortezomib, MG132, and PR-957 have been developed and have achieved success in preventing experimental colitis in mice.^{18–20} Similar effects have been observed with mice deficient in subunit $\beta 5i$.¹⁹ More recently, we showed a link between proteasome and intestinal permeability in mice. In this latter study, both pharmacological immunoproteasome inhibition and $\beta 2i$ subunit deficiency limited colonic hyperpermeability and improved occludin expression.²¹

To better understand the underlying mechanisms, we thus aimed (i) to evaluate the colonic proteome in wild-type and $\beta 2i$ immunoproteasome subunit knockout ($\beta 2i^{-/-}$) mice during water avoidance stress (WAS) and (ii) to investigate the colonic expression of 49 ubiquitinated proteins in IBS-D patients.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

Male C57Bl/6 knockout mice for MECL1 gene (or $\beta 2i$ proteasome subunit) were a kind gift from Professors Marcus Groettrup and Mickael Basler of Konstanz University (Germany) with the permission of Professor John Monaco from Cincinnati University (Ohio). The protocol was approved by CENOMEXA, the Ethics Committee of Normandy for Animal Experimentation (acceptance number: N/04-11-12/27/11-15). In addition, all experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations (Official Journal of the European Community L 358, 18/12/1986) and followed ARRIVE guidelines.²²

2.2. Water Avoidance Stress

The water avoidance stress (WAS) is a murine model of chronic stress that induces several symptoms associated with IBS. In particular, WAS increased visceral sensibility, colonic motility, intestinal permeability, pro-inflammatory cytokine production, and mast cell count.^{21,23–25} After 1 week of acclimatization at 23 °C (12 h light–dark cycle; dark phase: 8:00 PM to 8:00 AM), the WAS model was performed during 1 h per day during 10 consecutive days as previously described.²¹ After the last WAS procedure, mice were euthanized. Colonic samples were taken, washed with ice-cold PBS, and either immediately frozen until further analysis or immediately used to evaluate paracellular permeability.

2.3. Intestinal Permeability

Colonic permeability was evaluated by measuring paracellular flux of fluorescein isothiocyanate (FITC)–dextran (4 kDa) through colonic samples mounted in Ussing chambers as previously described.²⁶ Briefly, FITC–dextran (5 mg/mL) was placed in the mucosal side. After 3 h at 37 °C, medium from the serosal side was removed and stored at –80 °C. The fluorescence level of FITC–dextran was measured in 96-well black plates with a spectrometer Chameleon V (excitation at 485 nm, emission at 535 nm; Hidex, Turku, Finland).

2.4. qRT-PCR

Mucosal total RNA was extracted from samples as previously described.²⁷ After reverse transcription of 1.5 μ g of total RNA into cDNA by using 200 units of SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), qPCR was performed by SYBR Green technology on a BioRad CFX96 real time PCR system (BioRad Laboratories, Marnes la

Coquette, France) in duplicate for each sample. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the endogenous reference gene. Specific primers are displayed in Table S-1.

2.5. Proteasome Activities

Proteasome activities were evaluated on colonic mucosa homogenized in ice-cold lysis buffer containing 30 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM dithiothreitol, and 1% Triton X-100 by spectrofluorimetry on a microtiter plate fluorometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) as previously described.¹⁰

2.6. Protein Extraction for Comparative Proteome and Ubiquitome Analysis

Colonic mucosa was homogenized, as previously described,^{28,29} in ice-cold lysis buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (wt/vol) 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 50 mM dithiothreitol, 25 mM spermine tetrahydrochloride, 1 $\times$ protease inhibitor cocktail (P2714; Sigma-Aldrich), and 0.5% (vol/vol) immobilized pH gradient (IPG) buffer with pH 3–10 nonlinear (GE Healthcare). The protein content was determined by using a 2D Quant kit (GE Healthcare).

2.7. Comparative Proteome Analysis

Total protein extract (40 μ g for silver staining or 500 μ g for CBB G-250 staining) was used to rehydrate Immobiline DryStrip gels (pH 3–10 NL 18 cm; GE Healthcare). Proteins were resolved in the first dimension by isoelectric focusing for a total of 50 000 V·h by using the Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). After equilibration of the strips, the second dimension was performed on 8–16% polyacrylamide gradient gels (20 cm $\times$ 18 cm $\times$ 1 mm) and was run on an Ettan Dalt six vertical system (GE Healthcare). The 2D gels were silver-stained (PlusOne Silver Staining kit; GE Healthcare) for image analysis or dyed following the CBB G-250 staining method for mass spectrometric analysis.²⁸

2.7.1. 2D Image Analysis. Silver stained gels were scanned with an ImageScanner II (GE Healthcare) previously calibrated by a grayscale marker (Kodak), and 2D images were captured with Labscan 6.00 software (GE Healthcare). Differential analysis was realized by using ImageMaster 2D Platinum v7.0 software (GE Healthcare) for spot detection, background subtraction, spot volume normalization, and differences in spot expression among the groups and/or each experiment. Each tissue sample was subjected to 2DE three times to minimize run-to-run variation, and each set of three gels was compared by using ImageMaster to confirm the nonappearance of statistically differential spots within the set of gels. The most representative silver-staining gels (gel migration, spot definition, and spot number) of each sample ($n = 5$ per group) were used to identify differential colonic protein expression. The expression level was determined by the relative volume of each spot in the gel and expressed as % volume, calculated as spot volume/ Σ volumes of all spots resolved in the gel. Variations in abundance, corresponding to normalized spot volume, were calculated as the ratio of average values of % volume for each group. Only spots with a % volume variation >1.4 were included in analysis. Statistical differences between the groups were determined using ANOVA (significance level P values <0.05).

2.7.2. In-Gel Trypsin Digestion and Protein Identification by LC–ESI–MS/MS. Protein spots of interest were

manually excised from colloidal Coomassie blue-stained 2D gels and digested. Briefly, gel fragments were washed three times for 20 min in destaining solution containing 50% (v/v) methanol and 50 mM ammonium bicarbonate. The excised spots were then air-dried for 1 h, which was followed by in-gel digestion in 30 μ L of a digestion buffer containing 50 mM ammonium bicarbonate and 6 ng/ μ L sequencing grade bovine trypsin (Roche Diagnostics, Meylan, France). After overnight digestion, the aliquots were treated with 50% (v/v) acetonitrile and 5% (v/v) formic acid. Speed-vac-dried peptide extracts were resuspended in 10 μ L of 5% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) formic acid and then analyzed with a nanoflow liquid chromatograph LC1200 system coupled to a Q-TOF 6550 mass spectrometer equipped with a nanospray source and an HPLC-chip cube interface (Agilent Technologies). A 20 min linear gradient (3–75% acetonitrile in 0.1% formic acid), at a flow rate of 350 nL/min, was used to separate peptides on a polaris-HR-Chip C18 column (150 mm long $\times$ 75 μ m inner diameter). Full autoMS1 scans from 290 to 1700 m/z and autoMS2 from 59 to 1700 m/z were recorded. In every cycle, a maximum of 5 precursors sorted by charge state (2+ preferred and single-charged ions excluded) were isolated and fragmented in the collision cell that was automatically adjusted depending on the m/z . Active exclusion of these precursors was enabled after 1 spectra within 0.13 min, and the absolute threshold for precursor selection was set to 1000 counts (relative threshold of 0.001%). For protein identification, MS/MS peak lists were extracted and compared with the protein databases using the MASCOT Daemon version 2.4.0 (Matrix Science, London, UK) search engine. The MASCOT searches were performed in the *Mus musculus* database as previously described.³⁰ Protein hits were automatically validated if they satisfied one of the following criteria: identification with at least two top ranking peptides (bold and red), each with a MASCOT score of more than 41 ($P < 0.001$), or at least two top ranking peptides (bold and red), each with a MASCOT score of more than 31 ($P < 0.01$). To evaluate false-positive rates, all the initial database searches were performed using the “decoy” option of MASCOT. Results were considered relevant if the false-positive rate never exceeded 1%. The mass spectrometry data were deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/>) with the data set identifiers PXD011199 and 10.6019/PXD011199.³¹

2.8. Patients

Fourteen patients, who met the Rome III criteria for IBS with predominant diarrhea and were seen in the Department of Gastroenterology of the Rouen University Hospital, were included between December 2012 and July 2016 (10 women/4 men, aged 41.2 ± 11.2 years). IBS patients with the following criteria were excluded: (i) IBS predominant constipation or alternating constipation and diarrhea, (ii) blood dyscrasia, (iii) personal history of autoimmune disease, (iv) personal history of inflammatory bowel disease, (v) personal history of digestive cancer, or (vi) macroscopic (except for diverticulosis, hyperplastic polyp, and angiodysplasia) and histological abnormality of the colonic mucosa. Fourteen control patients (8 women/6 men, aged 55 ± 17.4 years) were subjects admitted in the Department of Gastroenterology of the Rouen University Hospital for a colonoscopy indicated within the framework of screening (anemia, personal or family history of polyp, family history of colorectal cancer, rectal bleeding, screening

campaign). To be selected, control subjects had to fulfill all of the following criteria: (i) macroscopically and histological normal colonic mucosa (diverticulosis, hyperplastic polyp, and angiodysplasia were tolerated), (ii) lack of any digestive symptom, and (iii) lack of any organic or functional bowel disease. A complete colonoscopy was performed under general anesthesia after large bowel cleansing with 4 L of a macrogol solution. Biopsies were taken in the descending colon in all cases. Two biopsies for each patient were analyzed by a pathologist in order to exclude any histological abnormality. Written informed consent was obtained from each patient. The protocol was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and European GCP for biomedical research.

2.9. Ubiquitome Analysis

Expression of 49 ubiquitinated proteins was assessed using the commercial Proteome Profiler Human Ubiquitin Array kit (R&D Systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 300 μ g of colonic mucosal proteins was loaded on membranes previously coated with specific antibodies directed against ubiquitinated proteins. After incubation of these membranes with specific buffers and wash steps, ubiquitinated proteins were detected using ECL reagents (GE Healthcare). Each spot was quantified by densitometry using ImageScanner III and ImageQuant TL software (GE Healthcare). Only spots with a % volume variation ratio greater than 1.5 were considered relevant.

2.10. Gene Ontology-Based Analysis

The PANTHER classification system (version 10.1, <http://www.pantherdb.org>) was used to categorize the identified proteins according to their molecular function and biological process. To identify significantly enriched biological themes and functional groups in the list of identified proteins, functional annotation clustering analysis was performed using the DAVID Gene Ontology (GO) tool version 6.7³² as previously described³⁰ with minor modifications: the reference data set was *Mus musculus* or *Homo sapiens*, and $P < 0.05$ for Benjamini-Hochberg correction was considered significant.

2.11. Western Blot Analysis

Twenty micrograms of total protein extracts was separated by 4–20% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels and electrotransferred onto nitrocellulose membrane (GE Healthcare) as previously described.²⁸ Membrane was blocked with 3% (wt/vol) bovine serum albumin (BSA) in TBS-T solution [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2% (vol/vol) Tween 20] and then incubated with corresponding primary antibodies (from Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4 °C: mouse monoclonal antibodies anti-UCH-L3 (sc-100340, 1:2500); goat polyclonal antibodies anti-GDH1 (sc-160382, 1:1000) or anti-HSP60 (sc-1052, 1:3000); rabbit monoclonal antibodies anti-Ub (sc-9133, 1:1000). Membrane was washed three times for 10 min with TBS-T and then incubated with appropriate horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies [HRP-goat anti-mouse IgG (sc-2005, 1:5000; Santa Cruz Biotechnology), HRP-donkey anti-goat IgG (sc-2020, 1:5000; Santa Cruz Biotechnology), or HRP-swine anti-rabbit IgG (P0399, 1:5000; Dako)] for 1 h at room temperature. After 2 washes with TBS-T, immunocomplexes were revealed by using ECL detection reagents (GE Healthcare). Protein bands were quantified by densitometry with ImageScanner III and ImageQuant TL software (GE Healthcare). The blot was

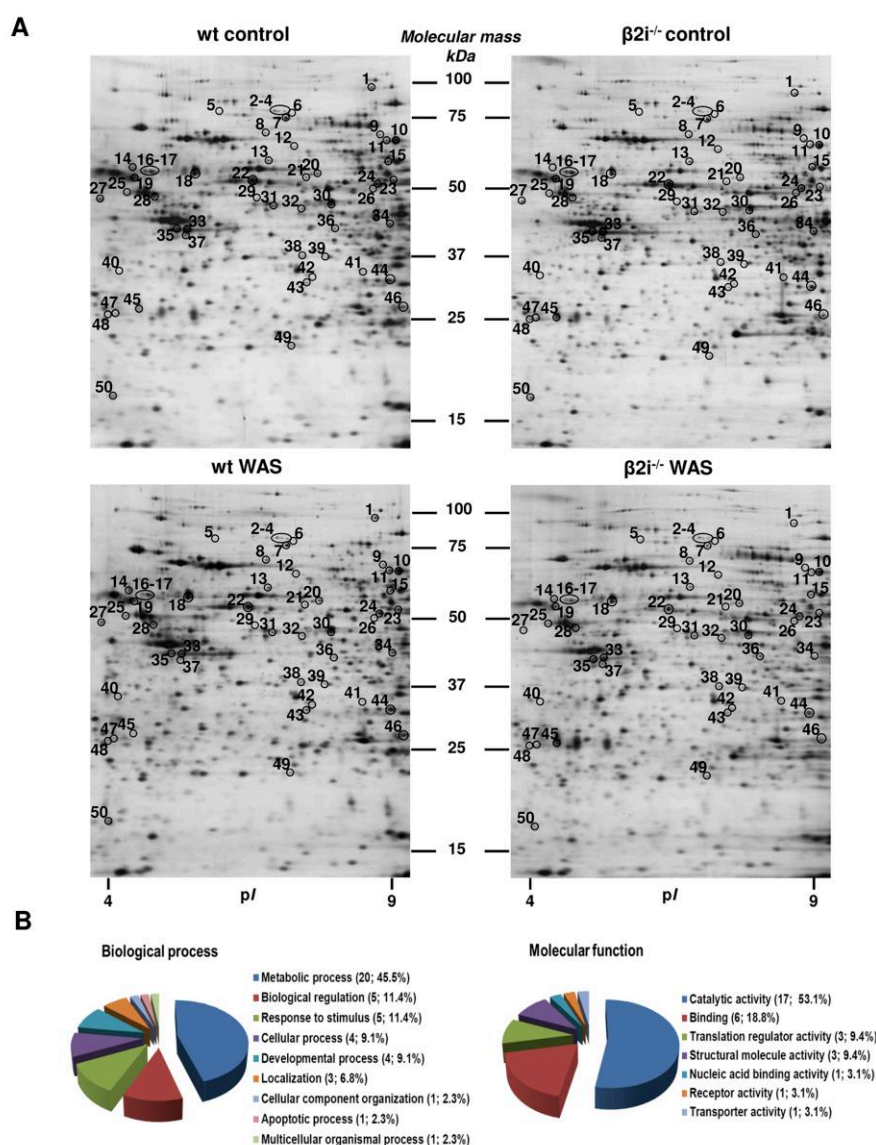


Figure 1. Colonic proteome alterations in wild-type (wt) and $\beta 2i^{-/-}$ mice during WAS. (A) Silver-stained 2-dimensional gel images representing colonic proteome from wt control (Ct), $\beta 2i^{-/-}$ Ct, wt WAS, and $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice. For isoelectric focusing, 40 μ g of total colonic proteins was separated onto a pH 3–10 NL IPG strip (18 cm). SDS-PAGE (4–16% gel) was performed, and proteins were revealed with silver staining. The molecular weight of each protein was determined by standard markers. Differentially expressed proteins (>1.4-fold difference; circled spots with a number) were determined by statistical analysis (two-way ANOVA, $P < 0.05$). Protein spot identification is displayed in Table 1. (B) Pie chart depicting the functional classification of proteins differentially expressed between the four groups of mice. Using the online resource PANTHER classification system, proteins of interest were categorized into the broad GO classes of biological process and molecular function. For each category, the number of identified proteins and their percentage of the total number of proteins in the pie chart are indicated for each GO term.

stripped and reblotted with a mouse monoclonal antibody anti- β -actin (A5441, 1:5000; Sigma-Aldrich) also used as a loading control.

2.12. Detection of Carbonylated Proteins

Carbonylated proteins were detected and analyzed following derivatization of protein carbonyl groups with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), using the OxyBlot kit (Millipore, Billerica, MA). Briefly, colonic proteins were incubated with

DNPH for 15 min at room temperature to convert carbonyl to hydrazone derivatives. The samples were neutralized, applied on SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes. Immunodetection was performed with a primary antibody directed against dinitrophenylhydrazone.

2.13. Statistical Analysis

Results were compared in GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) by two-way ANOVA

Table 1. Colonic Protein Expression Changes in Wild-Type (wt) and $\beta 2i$ Immunoproteasome Subunit Knock-Out ($\beta 2i^{-/-}$) Mice during Water Avoidance Stress (WAS) or No Stress (Ct)

spot number	Swiss-Prot accession number	protein name (short name)	theoretical ^{1a}		MascotScore ^b , sequence coverage (%) ^c , peptide hit ^c	fold change ^d				two-way ANOVA: $P(WAS)$, $P(\beta 2i^{-/-})$, $P(interaction)$
			pI	Mr (kDa)		wt Ct/ WAS	wt Ct/ $\beta 2i^{-/-}$ Ct	wt Ct/ $\beta 2i^{-/-}$ WAS	wt WAS/ $\beta 2i^{-/-}$ WAS	
1	P58252	elongation factor 2 (EF-2)	6.41	95.3	94.0, 4%, 4	-3.23	-3.74	NS	NS	0.0553, 0.0345, 0.0786
2	Q8CAQ8	MICOS complex subunit Mic60 (IMMT)	6.18	83.8	166, 9%, 6	-1.41	-1.46	NS	NS	0.0498, 0.0134, 0.1482
3	Q8K0D5	elongation factor G1 (EF-G1mt)	6.48	83.5	76.0, 6%, 4	-1.88	-2.17	NS	NS	0.0699, 0.0179, 0.0180
4	Q8CAQ8	MICOS complex subunit Mic60 (IMMT)	6.18	83.8	147, 8%, 4	-1.60	-1.52	NS	NS	0.0576, 0.1305, 0.0072
5	Q8R2Q4	elongation factor G2 (EF-G2mt)	5.98	85.9	63.0, 3%, 2	-1.74	-1.98	NS	NS	0.2957, 0.0986, 0.0095
6	Q9WU78	programmed cell death 6-interacting protein (Pdcd6p)	6.15	96.0	121, 7%, 5	-2.48	-2.14	NS	NS	0.0145, 0.0446, 0.0222
7	P26040	Ezrin (Ezr)	5.83	69.4	267, 9%, 6	-1.53	-1.93	NS	NS	0.0345, 0.0019, 0.2013
8	Q9CCQ1	heat shock protein 75 kDa (HSP75)	6.25	80.2	90.0, 8%, 4	-1.51	-1.63	NS	NS	0.2076, 0.0898, 0.0375
9		undetermined				-2.23	-1.84	NS	NS	0.0002, 0.0047, 0.0028
10		undetermined				-1.42	-1.59	NS	NS	0.0391, 0.0062, 0.1552
11		undetermined				-1.58	-1.77	NS	NS	0.0244, 0.0056, 0.1831
12		undetermined				-1.48	-1.71	NS	NS	0.2286, 0.0269, 0.0112
13	P11984	T-complex protein 1 subunit alpha A (TCP-1-A)	5.76	60.3	203, 11%, 5	-1.89	-1.79	NS	NS	0.0074, 0.0146, 0.0528
14	P09103	protein disulfide-isomerase precursor (PDI)	4.79	57.1	151.0, 7%, 4	-2.36	-2.81	NS	NS	0.0056, 0.0010, 0.0018
15	P52480	pyruvate kinase (PKM)	7.18	57.8	300, 24%, 11	-1.73	-1.77	NS	NS	0.0358, 0.0277, 0.0206
16	P09103	protein disulfide-isomerase precursor (PDI)	4.79	57.1	201, 10%, 5	-2.89	-1.70	NS	NS	0.0097, 0.4592, 0.0099
17	P09103	protein disulfide-isomerase precursor (PDI)	4.79	57.1	174, 14%, 6	-2.59	-1.89	NS	NS	0.0135, 0.2347, 0.0015
18	P63038	heat shock protein 60 kDa (HSP60)	5.90	60.9	821, 28%, 13	NS	NS	NS	-1.86	0.0399, 0.0014, 0.4110
19	P99024	tubulin beta-5 chain (Tubbs)	4.78	49.6	552, 24%, 9	-1.83	-1.85	NS	NS	0.0020, 0.0017, 0.0532
20	Q99KTP6	pre-mRNA-processing factor 19 (Prpf19)	6.14	55.2	169, 10%, 3	-1.48	1.72	NS	NS	0.0325, 0.0021, 0.0463
21	P46467	vacuolar protein sorting-associating protein 4B (Vps4b)	6.65	49.4	79.0, 7%, 3	-1.68	NS	NS	NS	0.0276, 0.2884, 0.1122
22		undetermined				-2.78	-2.85	NS	NS	0.0171, 0.0145, 0.0136
23	Q91ZJS	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (Ugr2)	7.18	57.0	216, 17%, 6	-1.60	-1.61	NS	NS	0.0059, 0.0055, 0.4087
24	P26443	glutamate dehydrogenase 1 (GDH1)	8.05	61.3	393, 31%, 13	NS	NS	NS	-1.48	0.0201, 0.0041, 0.7822
25	P56480	ATP synthase subunit beta (Atp5b)	5.19	56.3	294, 21%, 7	NS	NS	+1.59	+1.67	0.0023, 0.9397, 0.4053
26		undetermined				NS	NS	NS	NS	0.0277, 0.0127, 0.0312
27		undetermined				-2.01	-1.70	NS	NS	0.0015, 0.0159, 0.0318
28		undetermined				NS	-1.60	NS	NS	0.249, 0.0452, 0.03630
29		undetermined				-1.65	-1.83	NS	NS	0.080, 0.0286, 0.11610
30	P17182	alpha-enolase 1 (Eno1)	6.37	47.1	773, 26%, 9	NS	NS	-1.55	-1.65	0.030, 0.0078, 0.13510
31	P55264	adenosine kinase (AK)	5.84	40.1	162, 16%, 5	-1.76	NS	NS	NS	0.0188, 0.1506, 0.2865
32	P46664	adenylosuccinate synthetase isozyme 2 (Adss2)	5.98	50.0	111.0, 7%, 3	-1.45	-1.55	NS	NS	0.1908, 0.0202, 0.0465

Table 1. continued

spot number	Swiss-Prot accession number	protein name (short name)	theoretical ^a		MascotScore, ^b sequence coverage (%) ^c , peptide hit ^d	fold change ^d				two-way ANOVA: $P(\text{WAS})$, $P(\beta_{21}^{-/-})$, $P(\text{interaction})$
			pI	Mr (kDa)		wt Ct/wt WAS	wt Ct/ $\beta_{21}^{-/-}$ Ct	$\beta_{21}^{-/-}$ Ct/ $\beta_{21}^{-/-}$ WAS	wt WAS/ $\beta_{21}^{-/-}$ WAS	
33		undetermined				-2.46	-2.31	NS	NS	0.0341, 0.0588, 0.0010
34	P62334	26S protease regulatory subunit S10B (Psmc6)	7.10	44.1	404, 30%, 8	-1.47	NS	NS	NS	0.0078, 0.0359, 0.1776
35		undetermined				-2.57	-2.41	NS	NS	0.0096, 0.0187, 0.0002
36	Q9JH15	isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD)	8.53	46.3	350, 20%, 7	-1.56	-1.73	NS	NS	0.118, 0.0354, 0.07550
37	Q9CQM9	glutaredoxin-3 (Glx3)	5.42	37.8	93.0, 7%, 2	-1.64	-1.76	NS	NS	0.2368, 0.0992, 0.0010
38	Q9JMD3	PCTP-like protein (PCTP-L)	6.67	32.9	169.0, 8%, 2	NS	NS	NS	NS	0.0224, 0.0711, 0.6146
39		undetermined				-1.67	NS	-1.84	NS	0.0002, 0.9421, 0.7163
40		undetermined				NS	+2.35	NS	NS	0.1041, 0.0075, 0.1830
41		undetermined				-1.97	-1.85	NS	NS	0.1486, 0.2342, 0.0151
42	P52624	uridine phosphorylase 1 (UPase 1)	6.12	34.1	101.0, 6%, 2	NS	NS	+3.59	NS	0.0096, 0.2894, 0.2429
43	Q99J99	3-mercaptopyrivate sulfurtransferase (MST)	6.11	33.0	416, 36%, 9	-1.51	-1.44	NS	NS	0.0075, 0.0178, 0.2104
44	Q99LC5	electron transfer flavoprotein subunit alpha (Alpha-ETF)	8.62	35.0	878, 49%, 13	NS	-1.50	NS	NS	0.0393, 0.0059, 0.4695
45	O70435	proteasome subunit alpha type-3 (Psm3)	5.29	28.4	80.0, 10%, 2	NS	+5.06	+1.72	+3.80	0.0152, < 0.0001, 0.211
46	Q9R1P0	proteasome subunit alpha type-4 (Psm4)	7.59	29.5	231, 19%, 4	NS	NS	NS	-1.70	0.204, 0.0167, 0.32380
47	Q9JKB1	Ub carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 (Uchl3)	4.96	26.1	142, 16%, 3	NS	NS	NS	+2.35	0.7986, 0.0105, 0.0445
48	Q9Z2U1	proteasome subunit alpha type-5 (Psm5)	4.74	26.4	87.0, 7%, 2	NS	NS	+1.85	+2.22	0.2666, 0.0385, 0.0004
49	Q99LX0	protein deglycase DJ-1 (DJ-1)	6.32	20.0	178, 12%, 3	-1.54	-1.70	NS	NS	0.0036, 0.0008, 0.4190
50	Q3THE2	myosin regulatory light chain 12B (Myl12b)	4.71	19.8	105, 12%, 3	NS	NS	NS	NS	0.0519, 0.0117, 0.7918

^aTheoretical molecular mass (Mr) and isoelectric point (pI) calculated from the mature protein and amino acid sequence, respectively. ^bMASCOT, algorithm that uses mass spectrometric data to identify proteins from primary sequence databases. ^cNumber of peptides matched. ^dAverage spot volume ratio between two groups. +, upregulated; -, downregulated; NS, not significant.

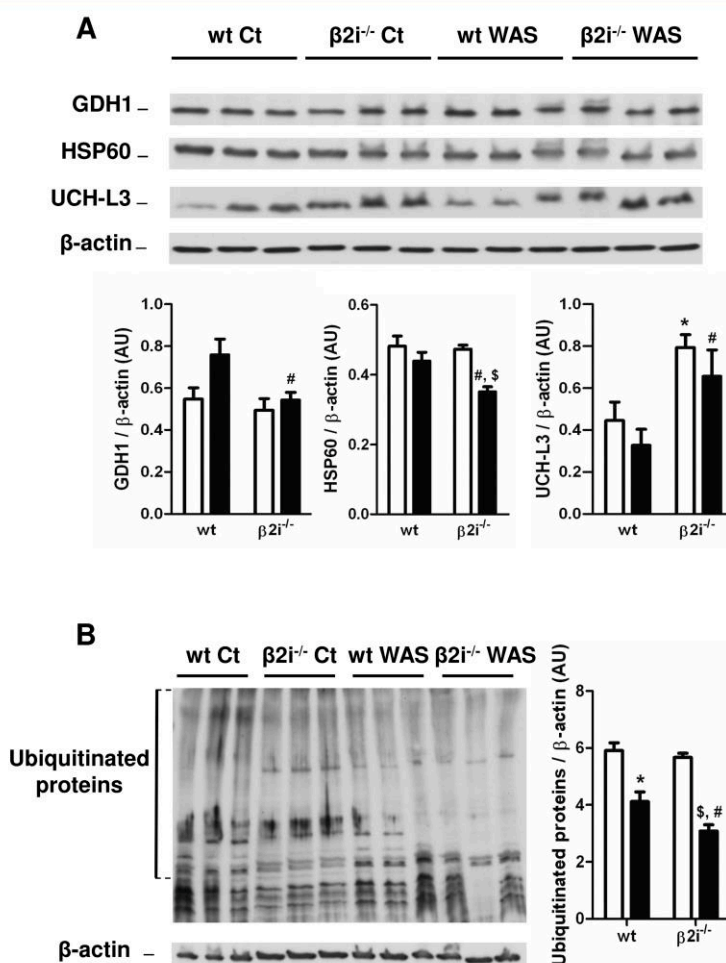


Figure 2. Expression levels of GDH1, HSP60, UCH-L3, and ubiquitinated proteins in the colonic mucosa of $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice. Representative immunoblots and densitometric analysis of GDH1 (A), HSP60 (A), UCH-L3 (A), ubiquitinated protein (B), and β -actin levels in the colonic mucosa of wild-type (wt) or $\beta 2i$ knockout ($\beta 2i^{-/-}$) mice subjected to WAS (1 h/day for 10 days) or not (Control; Ct). Values are means $\pm$ sem ($n = 5$ per group). Open and closed bars represent control and WAS mice, respectively. Two-way ANOVA P values: (A, GDH1) $P(\text{WAS}) = 0.0363$, $P(\beta 2i^{-/-}) = 0.0305$, $P(\text{interaction}) = 0.1709$; (A, HSP60) $P(\text{WAS}) = 0.0013$, $P(\beta 2i^{-/-}) = 0.0388$, $P(\text{interaction}) = 0.0805$; (A, UCH-L3) $P(\text{WAS}) = 0.1797$, $P(\beta 2i^{-/-}) = 0.0019$, $P(\text{interaction}) = 0.9172$; (B) $P(\text{WAS}) < 0.0001$, $P(\beta 2i^{-/-}) = 0.0243$, $P(\text{interaction}) = 0.1393$. *, $P < 0.05$ vs wt Ct; #, $P < 0.05$ vs wt WAS; \$, $P < 0.05$ vs $\beta 2i^{-/-}$ Ct. GDH1, glutamate dehydrogenase 1; HSP60, heat shock protein 60 kDa; UCH-L3, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3.

(stress $\times \beta 2i^{-/-}$) with Bonferroni post-tests. For data from patients, the t test or Mann–Whitney test was used as appropriate. For all tests, $P < 0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

3.1. Immunoproteasome Subunit $\beta 2i$ Deficiency Prevents Hyperpermeability and Proinflammatory Cytokine Production in the Colonic Tissue of Stressed Mice

The WAS model increased fecal pellet output from day 1 to day 10 in both wild-type (wt) and $\beta 2i^{-/-}$ mice (Figure S-1A). However, $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice showed lower fecal pellet output than wt WAS mice. In $\beta 2i^{-/-}$ mice, trypsin-like activity was not affected by WAS (Figure S-1B). Interestingly, colonic mRNA levels for TNF- α and IL-1 β were not altered in $\beta 2i^{-/-}$ WAS

mice (Figure S-1C). Gut barrier function was assessed by paracellular permeability of FITC-dextran. WAS induced enhanced passage of FITC-dextran across the colonic mucosa of wt mice (Figure S-1D). Interestingly, FITC-dextran flux was markedly reduced in $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice compared to wt WAS mice (Figure S-1D). These data confirm that WAS did not affect colonic permeability in $\beta 2i^{-/-}$ mice, as previously described.²¹

3.2. WAS and Immunoproteasome Subunit $\beta 2i$ Deficiency Alter Colonic Proteome in Mice

To evaluate colonic proteome and then identify altered biological processes in wt and $\beta 2i^{-/-}$ mice in both control and WAS conditions, we used a proteomic approach combining 2DE mapping and mass spectrometry identification.

Table 2. DAVID Functional Annotation Clusters Generated from the List of Colonic Proteins Differentially Expressed between the Four Mice Groups

	annotation category	term	enrichment score ^a	protein count	P value ^b	Benjamini ^c	related genes ^d
annotation cluster 1	SP_PIR_KEYWORDS	mitochondrion	4.89	11	7.0×10^{-6}	2.2×10^{-4}	ATP5B, ETFA, GFM1, GFM2, GLUD1, HSPD1, IMMT, IVD, MPST, TRAP1, VSP4B
	SP_PIR_KEYWORDS	transit peptide		8	1.3×10^{-5}	3.1×10^{-4}	ATP5B, ETFA, GFM1, GFM2, GLUD1, HSPD1, IVD, TRAP1
	UP_SEQ_FEATURE	transit peptide: mitochondrion		8	2.4×10^{-5}	2.5×10^{-3}	ATP5B, ETFA, GFM1, GFM2, GLUD1, HSPD1, IVD, TRAP1
annotation cluster 2	INTERPRO	proteasome, alpha-subunit	2.06	3	8.2×10^{-5}	9.2×10^{-3}	PSMA3, PSMA4, PSMA5
	SP_PIR_KEYWORDS	proteasome		4	1.2×10^{-4}	1.9×10^{-3}	PSMA3, PSMA4, PSMA5, PSMC6
	INTERPRO	proteasome, subunit alpha/beta		3	5.5×10^{-4}	3.1×10^{-3}	PSMA3, PSMA4, PSMA5
	KEGG_PATHWAY	proteasome		4	6.2×10^{-4}	1.9×10^{-2}	PSMA3, PSMA4, PSMA5, PSMC6
	SP_PIR_KEYWORDS	threonine protease		3	6.4×10^{-4}	6.0×10^{-3}	PSMA3, PSMA4, PSMA5
annotation cluster 3	SP_PIR_KEYWORDS	gtp-binding	1.94	6	2.2×10^{-4}	2.3×10^{-3}	ADSS, EEF2, GFMI, GFM2, GLUD1, TUB5
	PANTHER_MF_ALL	translation elongation factor		3	5.3×10^{-4}	2.6×10^{-3}	EEF2, GFM1, GFM2

^aFold enrichment of the cluster. ^bP value from modified Fisher's exact test (EASE score). ^cP value adjusted for multiple testing according to the Benjamini-Hochberg model. ^dGenes encoding the differentially expressed proteins in *Mus musculus*: ADSS, adenylosuccinate synthase; ATP5B, ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide; EEF2, eukaryotic translation elongation factor 2; ETFA, electron transfer flavoprotein subunit alpha; GFM1, G elongation factor mitochondrial 1; GFM2, elongation factor mitochondrial 2; TRAP1, heat shock protein 75 kDa, mitochondrial; GLUD1, glutamate dehydrogenase 1; HSPD1, heat shock protein family D (Hsp60) member 1; IMMT, inner membrane mitochondrial protein; IVD, isovaleryl-CoA dehydrogenase; MPST, mercaptopyruvate sulfurtransferase; PSMA3, proteasome subunit alpha 3; PSMA4, proteasome subunit alpha 4; PSMA5, proteasome subunit alpha 5; PSMC6, 26S protease regulatory subunit, ATPase 6; TUBB5, Tubb5 tubulin, beta 5 class I; VSP4B, vacuolar protein sorting-associated protein 4B.

Image analysis detected approximately 2100 protein spots per 2D gel, out of which 75% were successfully matched throughout all gels. Representative 2D gels from both conditions are shown in Figure 1A. Fifty protein spots were differentially and significantly expressed between the four mice groups (at least ± 1.4 -fold change; two-way ANOVA, $P < 0.05$). These protein spots were analyzed by using liquid chromatography coupled with electrospray ionization MS/MS, and 36 spots (72%) were identified (Table 1). Overall, 33 nonredundant proteins were obtained. Indeed, two proteins, named MICOS complex subunit (Mic60; spots 2 and 4, Figure 1A) and protein disulfide-isomerase precursor (spots 14, 16, and 17; Figure 1A), were detected at multiple spot positions that could be due to protein isoforms, i.e., the difference in maturation state, degradation, and/or post-translational modifications. Among the identified proteins, 22 proteins were downregulated in the colonic mucosa of wt WAS mice compared with wt mice, while only 6 proteins were affected by WAS in $\beta 2i^{-/-}$ mice. Interestingly, among these 6 proteins, only 2 were downregulated. In addition, we also observed that 7 proteins were differentially expressed in $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice compared to wt WAS mice. In this latter case, proteasome subunit alpha type-3 (PSMA3), proteasome subunit alpha type-5 (PSMA5), and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 (UCH-L3) were upregulated in the colonic mucosa of $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice (range from 2.20- to 3.80-fold), whereas proteasome subunit alpha type-4 (PSMA4), alpha-enolase 1 (ENO1), heat shock protein 60 kDa (HSP60), and glutamate dehydrogenase 1 (GDH1) showed a reduced expression (with fold changes from 1.48 to 1.86).

To validate the data from proteomics experiments, three proteins were randomly selected to verify the expression level via Western blot analysis (Figure 2A). The colonic expression levels of GDH1 and HSP60 were downregulated in $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice compared to wt WAS mice, whereas UCH-L3 expression was increased, which is consistent with the results given by 2-DE analysis and thus confirmed the proteomic findings.

3.3. WAS and Immunoproteasome Subunit $\beta 2i$ Deficiency Modify Expression of Protein Involved in Mitochondrial and Energy Metabolism in the Colon

Panther Gene Ontology (GO) analysis allowed us to elucidate the different functions and processes in which the 33 proteins identified are putatively involved. According to the molecular function analysis (Figure 1B), most of the proteins were related to catalytic activity (53.1%) and binding (18.8%). Concerning biological processes, the identified proteins were mainly involved in the metabolic process (45.5%, Figure 1B). To expand the GO analysis, we next analyzed the proteomic data with the DAVID functional annotation tool. DAVID uses GO and other data sources to cluster proteins based on the shared annotations to similarity clusters. DAVID analysis identified 3 significant annotation clusters (Table 2), of which the highest ranked cluster had an enrichment score (ES) of 4.89 and was represented by 3 terms relating to mitochondrion.

The mitochondrial cluster accounted for 33% of the identified proteins and included: ATP synthase subunit beta (Atp5b), elongation factor G1 (EF-G1mt), elongation factor

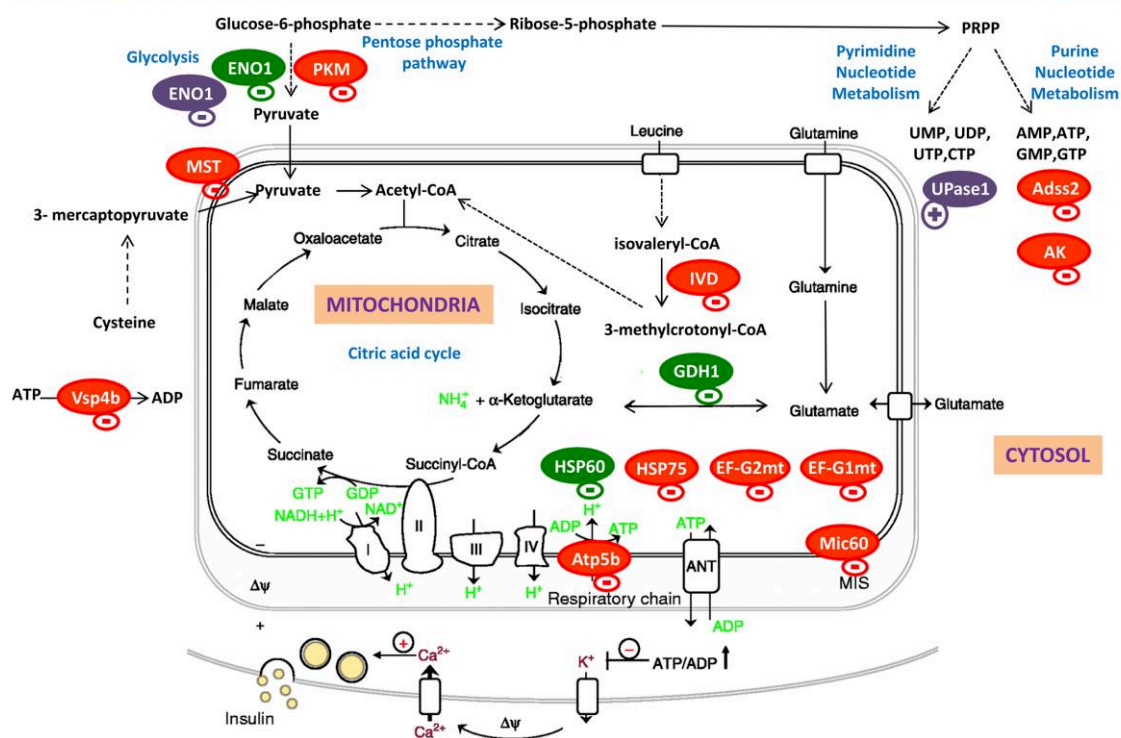


Figure 3. Schema of mitochondrial and energy metabolism alterations in the colonic mucosa. WAS induces protein expression changes in the colon tissue of wt mice (in red) and $\beta 2i^{-/-}$ mice (in mauve). These changes are different from those induced by $\beta 2i$ subunit deficiency during WAS (in green). Proteins in red, mauve, or green are downregulated in the colonic mucosa of mice, except for UPase 1; Adss2, adenylosuccinate synthetase isozyme 2; AK, adenosine kinase; Atp5b, ATP synthase subunit beta; EF-G1mt, elongation factor G1; EF-G2mt, elongation factor G2; ENO1, alpha-enolase 1; GDH1, glutamate dehydrogenase 1; HSP60, heat shock protein 60 kDa; HSP75, heat shock protein 75 kDa; IVD, isovaleryl-CoA dehydrogenase; Mic60, MICOS complex subunit; MST, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase; PKM, pyruvate kinase; Vsp4b, vacuolar protein sorting-associating protein 4B. These modifications suggest a significant decrease of mitochondrial activity and energy metabolism in the colonic mucosa of wt mice during WAS. Interestingly, these metabolic disturbances were minored in $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice.

G2 (EF-G2mt), electron transfer flavoprotein subunit alpha (ETFA), GDH1, HSP60, heat shock protein 75 kDa (HSP75), isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD), MICOS complex subunit (Mic60), 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST), and vacuolar protein sorting-associating protein 4B (Vsp4b). The expression levels of Atp5b, EF-G1mt, EF-G2mt, HSP75, IVD, Mic60, MST, and Vsp4b were downregulated in the colonic mucosa of wt mice during WAS (Figure 3). Decreased expressions of pyruvate kinase (PKM), adenylosuccinate synthetase isozyme 2 (Adss2), and adenosine kinase (AK), which are involved in energy metabolism (Figure 3), were also observed. These data suggest a significant decrease of mitochondrial activity and energy metabolism in the colonic mucosa during WAS. Invalidation of $\beta 2i$ expression alone induced similar modifications of colonic proteome except for Vsp4b, Atp5b, and AK (Table 1). Interestingly, Vsp4b, Atp5b, and AK remained unaffected in $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice compared with $\beta 2i^{-/-}$ control mice. In addition, in $\beta 2i^{-/-}$ mice, WAS altered alpha-enolase 1 (ENO1), which was downregulated, and uridine phosphorylase 1 (UPase 1; Table 1). By comparing the response of wt and $\beta 2i^{-/-}$ mice to WAS, we observed a reduction of ENO1, HSP60, and GDH1 expression in $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice (Table 1 and Figure 3).

3.4. WAS and Immunoproteasome Subunit $\beta 2i$ Deficiency Alter the Ubiquitin-Proteasome System in the Colon

We also observed that proteasome subunits were significantly enriched among identified proteins. The proteasome cluster (ES = 2.06, Table 2) was made up from three proteasome alpha subunits (PSMA3/4/5) and 26S proteasome regulatory subunit S10B (PSMC6). The expression levels of PSCM6 and two other UPS-related proteins, namely pre-mRNA-processing factor (Prpf19) and protein deglycase (DJ-1), were decreased in the colonic mucosa of wt mice during WAS (Figure 4). Interestingly, $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice exhibited an increased expression of PSMA3 and PSMA5 as compared to $\beta 2i^{-/-}$ control mice and of PSMA3, PSMA5, and UCH-L3 when compared to wt WAS mice (Table 1 and Figure 4). In contrast, PSMA4 was downregulated while Prpf19 and DJ-1 remained unaffected in $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice. UCH-L3 is a deubiquitinating enzyme (DUB) that controls levels of cellular ubiquitin through processing of ubiquitinated proteins. We thus evaluated the level of ubiquitinated proteins in the colonic mucosa, and we observed that both wt and $\beta 2i^{-/-}$ control mice exhibited a reduction of ubiquitinated protein levels in response to WAS (Figure 2B). Interestingly, $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice exhibited a lower ubiquitinated protein level than wt

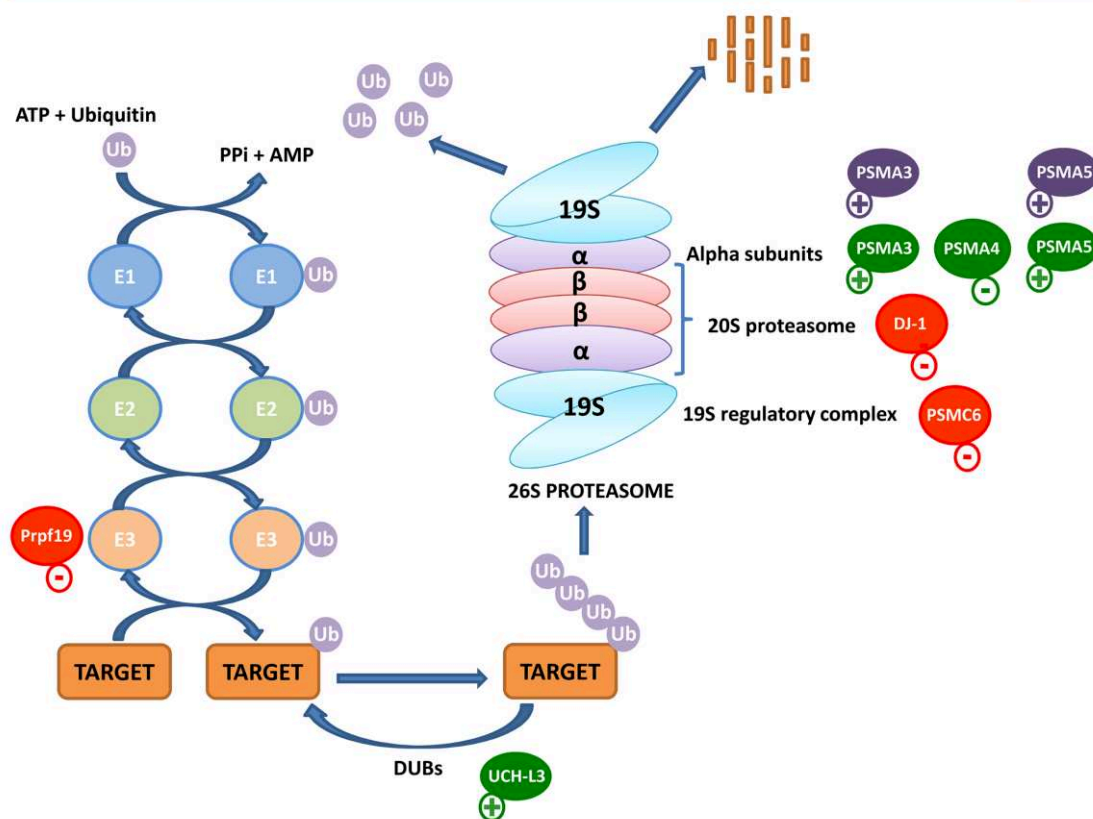


Figure 4. Schema of ubiquitin–proteasome system (UPS) alterations in the colonic mucosa. WAS induces protein expression changes in the colon tissue of wt mice (in red) and $\beta 2i^{-/-}$ mice (in mauve). These changes are different from those induced by $\beta 2i$ subunit deficiency during WAS (in green). The external and internal rings constitute the 20S proteasome. The lid and base constitute the 19S regulatory complex. In some cases, it can be replaced by the PA28 or 11S regulatory complex, constituted of a single ring of 7 subunits. Proteins in red, mauve, or green are upregulated (plus sign, +) or downregulated (minus sign, -) in the colonic mucosa of mice: DJ-1, protein deglycase; Prp19, pre-mRNA-processing factor 19; PSMA3, proteasome subunit alpha type-3; PSMA4, proteasome subunit alpha type-4; PSMA5, proteasome subunit alpha type-5; PSMC6, 26S protease regulatory subunit S10B; UCH-L3, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3. These modifications suggest altered UPS function in the colonic mucosa of wt mice during WAS. Disturbances in UPS in $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice were also observed. In this case, immunoproteasome subunit $\beta 2i$ deficiency induces increased colonic expression of UCH-L3, PSMA3, and PSMA5 in stressed mice, while PSMA4 was downregulated. α , proteasome alpha subunit; β , proteasome beta subunit; DUBs, deubiquitinating enzymes; E1, ubiquitin-activating enzyme; E2, ubiquitin-conjugating enzyme; E3, ubiquitin ligase; Ub, ubiquitin.

WAS mice. All these data suggest that (i) WAS affected UPS and (ii) that subunit $\beta 2i$ deficiency may regulate the degradation of specific proteins.

3.5. Ubiquitination of Inflammation-Related Proteins Is Modulated in the Colonic Mucosa of IBS-D Patients

Because stressed mice exhibited UPS changes in their colonic mucosa, we investigated in IBS-D patients the putative changes of ubiquitination of colonic proteins. For this purpose, we used macroarrays directed against 49 ubiquitinated proteins. Among these 49 proteins, the expression of 7 ubiquitinated proteins was significantly decreased in the colonic mucosa of IBS-D patients compared with control patients (Figure 5): TNF- α -induced protein 3 (A20), prostaglandin G/H synthase 2 (COX-2), heat shock protein 70 kDa (HSP70), heat shock protein 90 kDa (HSP90), interferon regulatory factor 3 (IRF3), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2),

and TNF receptor-associated factor 6 (TRAF-6). Nevertheless, the total expression of ubiquitinated proteins was not significantly different between control and IBS-D patients (Figure S-2A). Interestingly, enrichment analysis of KEGG pathways in DAVID showed that A20, COX-2, IRF3, and TRAF6 were involved in the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathway (39.7-fold enrichment, $P = 0.031$). All these data suggest that ubiquitination of these proteins may participate in the pathophysiology of IBS-D, which is commonly described as a low grade inflammatory state, by regulating apoptosis and disrupting the UPS mechanism.

4. DISCUSSION

In the present study, we provide evidence that the ubiquitin–proteasome system contributes to the pathophysiology of IBS. Indeed, we report that colonic proteome is altered in stressed mice and that $\beta 2i$ subunit deficiency modifies the proteome

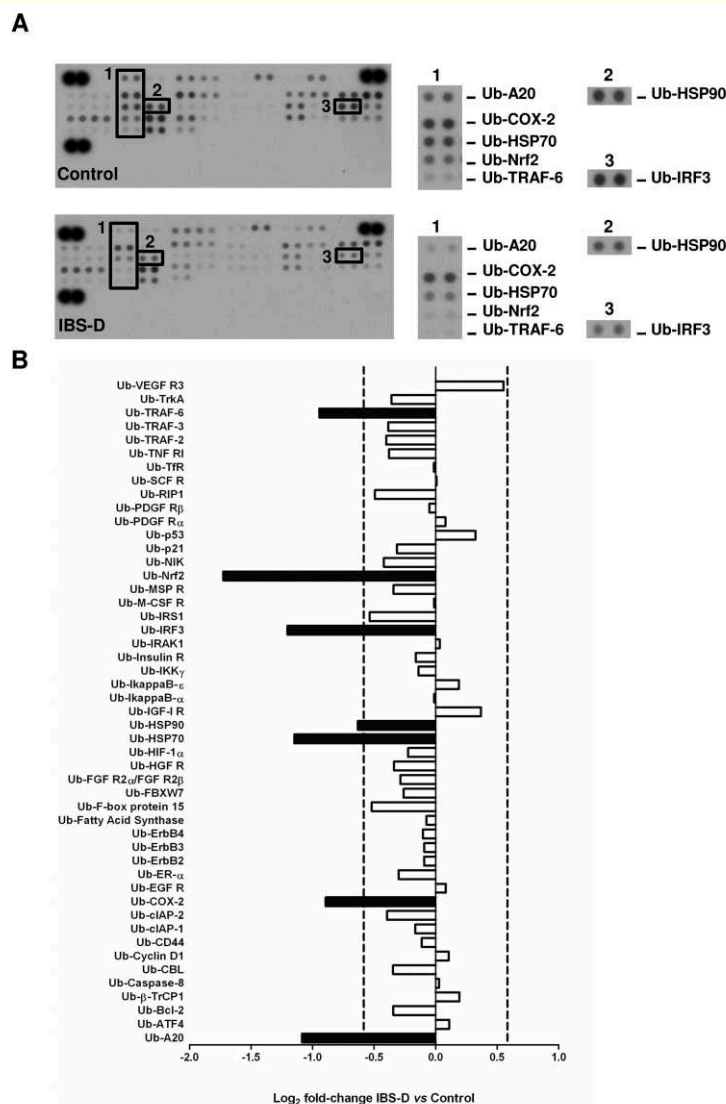


Figure 5. Expression of ubiquitinated proteins in the colonic mucosa of IBS-D patients. The ubiquitinated forms (Ub) of A20, COX-2, HSP70, HSP90, IRF3, Nrf2, and TRAF6 are underexpressed in the colonic mucosa of IBS-D patients. Representative macroarray results (A) and densitometric analysis (B) of ubiquitinated protein expression in the colonic mucosa of IBS-D or control patients. 300 μ g of colonic mucosal proteins from IBS-D or control patients was incubated with a human ubiquitin macroarray ($n = 7-8$ per group). A ratio of signal intensity "R" (IBS-D/control) was calculated and log transformed (base 2). Significant changes ($\log_2 R < -0.584$ or $\log_2 R > 0.584$; Mann-Whitney test, $P < 0.05$) are shown by black bars. A20, tumor necrosis factor alpha-induced protein 3; COX-2, prostaglandin G/H synthase 2; HSP70, heat shock protein 70 kDa; HSP90, heat shock protein 90 kDa; IRF3, interferon regulatory factor 3; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; TRAF-6, TNF receptor-associated factor 6; Ub, ubiquitin.

response that is associated with a limitation of colonic hyperpermeability. Interestingly, we show specific alterations of proteins involved in UPS, mitochondrial, and energy metabolism. We also report changes in the pattern of colonic ubiquitome in IBS-D patients and particularly a reduced expression of ubiquitinated proteins involved in the NF- κ B signaling pathway.

Previous studies clearly demonstrated that UPS may be involved in the regulation of inflammatory response³³ or gut barrier function.¹⁰ We and others have reported the formation of an alternative proteasome called immunoproteasome in the colonic mucosa of IBS¹⁰ and CD^{15,34} patients. It was also shown that proteasome composition and activity were different between CD and IBS patients.¹⁰ Indeed, trypsin-like activity was increased in the colonic mucosa of IBS patients³⁵ but not

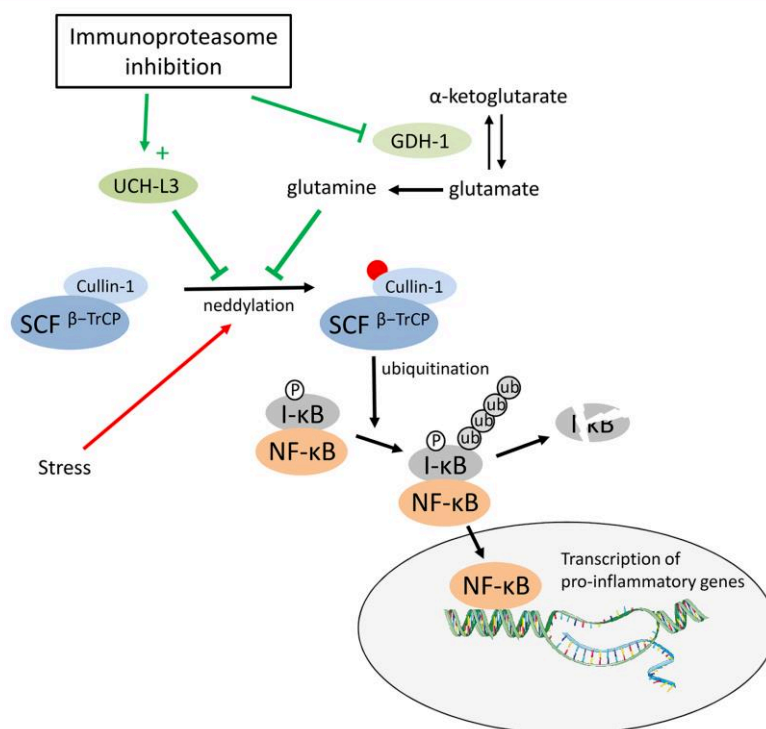


Figure 6. Speculative schema of interactions between UCH-L3, glutamine content, and inflammatory response in the colonic mucosa of immunoproteasome-deficient stressed mice. In wild-type mice, stress induces the neddylation of cullin-1 that is necessary for activation of the ubiquitin ligase E3 complex, SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$. Active SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$ induces ubiquitination of I- κ B, the inhibitor of NF- κ B, leading to the degradation of I- κ B, the translocation of NF- κ B in the nucleus, and transcription of NF- κ B-dependent genes. In immunoproteasome deficient mice, the expression of deubiquitinase (UCH-L3) is increased, while the expression of glutamate dehydrogenase 1 (GDH1) is decreased. Underexpression of GDH1 may lead to higher glutamine content. Both UCH-L3 and glutamine are able to inhibit cullin-1 neddylation. Consequently, I- κ B is not degraded by proteasome and NF- κ B remains in the cytosol leading to the limitation of inflammatory response.

in CD patients. In contrast, chymotrypsin-like activity remained unchanged in IBS patients whereas it was upregulated in CD patients. In the present study, we used a stress model (the water avoidance stress “WAS” model) able to reproduce certain aspects of IBS such as visceral hypersensitivity or intestinal hyperpermeability. Indeed, stress contributes to the development and aggravation of IBS symptoms.³⁶ WAS mice exhibited an increased colonic permeability, trypsin-like activity, and $\beta 2i/\beta 2$ subunit ratio,²¹ that was previously observed in IBS-D patients.¹⁰ In our study, we showed that $\beta 2i$ subunit deficiency increased expression of proteasome subunits (PSMA3/5) in stressed mice, whereas PSMA4 and ubiquitinated proteins were downregulated. The shift from constitutive to immunoproteasome could be responsible for the decrease of ubiquitinated proteins after WAS since Seifert et al. showed that immunoproteasome activity is higher than constitutive proteasome activity.³⁷ Nevertheless, Nathan et al. have reported that immunoproteasomes and constitutive proteasomes degraded ubiquitinated proteins at similar rates following IFN γ -treatment.³⁸ Other processes like ubiquitination and deubiquitination may also be involved. UCH-L3, which was increased in $\beta 2i^{-/-}$ mice in the present study, is a deubiquitinating enzyme performing hydrolysis of the bond at the C terminus of the ubiquitin and trimming down the polyubiquitin chain into monomers.

UCH-L3 knockout mice led to marked accumulation of ubiquitinated proteins in the skeletal muscles.³⁹ However, the effect of UCH-L3 overexpression on ubiquitinated protein level remains unknown. Thus, the underlying mechanisms responsible of the ubiquitinated protein level changes need to be deeply explored. UCH-L3 also processed a ubiquitin-like substrate called NEDD8 and regulated smad1 ubiquitination in osteoblast differentiation.⁴⁰ Interestingly, Sano et al. have reported that UCH-L3 prevented mitochondrial oxidative stress-related apoptosis in photoreceptor cells.⁴¹ UCH-L3 may then affect mitochondrial structure and the levels of reactive oxygen species (ROS). In contrast, it was considered a negative regulator of apoptosis in cancer.^{42–44} More interestingly, Zhao et al. have recently underlined a relationship between UCH-L3 and inflammatory response. Indeed, overexpression of UCH-L3 inhibited the activity of cellular SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$ ligase E3 through a limitation of cullin-1 neddylation.⁴⁵ SCF $^{\beta\text{-TrCP}}$ ligase E3 induces ubiquitination and degradation of phosphorylated substrates including I- κ B, the inhibitor of NF- κ B.⁴⁶

Previous papers reported that NF- κ B activity can also be limited by glutamine through the regulation of I- κ B ubiquitination^{29,47} and particularly by the regulation of cullin-1 neddylation.⁴⁸ Interestingly, in the present study, we showed that $\beta 2i$ subunit deficiency leads to a reduced expression of GDH1 in the colonic mucosa of WAS mice.

GDH1 is a metabolic enzyme mainly located in the mitochondria that catalyzes the reversible NAD (P)+-linked oxidative deamination of glutamate into α -ketoglutarate and ammonia. This reaction is the final step of glutaminolysis after the conversion of glutamine to glutamate by glutaminase. In inflammatory experimental conditions, glutamine supplementation improves gut barrier function,^{49–52} regulates UPS,^{29,48,53} and restores colonic TJ protein expression.^{49,50,54} We have recently demonstrated that glutamine supplementation prevented colonic hyperpermeability and reduced proinflammatory cytokine production in WAS mice.²¹ Zhou et al. have recently reported that reduced expression of glutamine synthase in colon tissues of IBS-D patients may lead to decreased claudin-1 expression and consequently increased intestinal permeability.⁵⁵ In the same way, we have shown *ex vivo* that glutamine supplementation increased claudin-1 expression in the colonic mucosa of IBS-D patients.⁵⁴ In a randomized controlled trial, Zhou et al. recently showed the beneficial effect of glutamine supplementation on intestinal permeability and gastrointestinal symptoms in postinfectious IBS patients.⁵⁶ All these data are in accordance with previous studies showing that glutamine supplementation or deprivation is able to modify TJ protein expression and influence intestinal permeability.^{50,57} The mechanisms of action for glutamine remain not completely understood and have been previously discussed.^{58,59} In our model, we can thus speculate that immunoproteasome inhibition induces higher glutamine content and overexpression of UCH-L3 leading to limitation of inflammatory response and improved barrier function (Figure 6). The assessment of colonic mucosal glutamine content in $\beta 2i^{-/-}$ WAS mice should thus be further investigated.

To confirm the putative role of proteasome system in the pathophysiology of IBS, we have investigated in IBS-D patients the changes of ubiquitination rate of colonic proteins. Interestingly, we observed alterations of ubiquitome and particularly a reduced expression of 7 ubiquitinated proteins involved in the NF- κ B signaling pathway. Cleynen et al. previously reported that adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) was able to regulate UPS leading to a decrease of NF- κ B negative regulator CYLD in intestinal epithelial cells.⁶⁰ In patients with IBS-D, Zhou et al. recently underlined that colonic hyperpermeability caused by TNF- α may be due to activation of NF- κ B expression and disassembly of claudin-1.⁵⁵ All of these data suggest a potential relationship between UPS, glutamine content, inflammatory response, and TJ protein expression in the pathophysiology of IBS. Further investigations should be done to deeply explore these mechanisms.

In conclusion, we provide evidence that (i) the $\beta 2i$ subunit deficiency modified the colonic UPS function that was associated with an improvement of intestinal hyperpermeability in stressed mice and (ii) IBS-D patients exhibited altered colonic ubiquitome leading to an altered NF- κ B pathway. Therefore, immunoproteasome targeting represents a new therapeutic strategy for the treatment of IBS-D patients with intestinal hyperpermeability.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00793.

Figure S-1: colonic permeability and cytokine production in stressed mice; Figure S-2: expression levels of ubiquitinated and carbonylated proteins in colonic mucosa of IBS-D patients; Table S-1; sequences of used primers for qPCR (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel.: +33235148240. Fax: +33235148226; E-mail: moise.coeffier@univ-rouen.fr.

ORCID

Alexis Goichon: 0000-0002-6605-3944

Author Contributions

A.G., I.G., W.B., and P.C. performed experiments and analyses. A.G. and M.C. designed experiments. P. Ducrotté performed colonoscopy and sampling. A.G., D.V., P. Déchelotte, P. Ducrotté, and M.C. interpreted the data. A.G. and M.C. wrote the main manuscript text and prepared figures. All authors reviewed the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

[†]P. Ducrotté: Deceased.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the Endoscopy Unit for their assistance with the endoscopic procedure. We dedicate this work to the memory of Prof. Philippe Ducrotté, our colleague and friend, who passed away on December 30, 2017. This work was supported by a Cephalon Research Prize (to I.G.), INSERM, and the University of Rouen Normandy and cosupported by European Union and Normandie Regional Council (to W.B. and for equipment). Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF). These funders did not participate in the design, implementation, analysis, and interpretation of the data.

■ ABBREVIATIONS

A20, TNF- α -induced protein 3; Adss2, adenylosuccinate synthetase isozyme; AK, adenosine kinase; Atp5b, ATP synthase subunit beta; CD, Crohn's disease; COX-2, prostaglandin G/H synthase 2; EF-G1mt, elongation factor G1; EF-G2mt, elongation factor G2; ENOA, alpha-enolase 1; ETFA, electron transfer flavoprotein subunit alpha; GDH1, glutamate dehydrogenase 1; GO, Panther Gene Ontology; HSP60, heat shock protein 60 kDa; HSP70, heat shock protein 70 kDa; HSP75, heat shock protein 75 kDa; HSP90, heat shock protein 90 kDa; IBS, irritable bowel syndrome; IBS-D, diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; IVD, isovaleryl-CoA dehydrogenase; IRF3, interferon regulatory factor 3; Mic60, MICOS complex subunit; MST, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; PKM, pyruvate kinase; Prpf19, pre-mRNA-processing factor; PSMA3/4/5, proteasome alpha subunits; PSMC6, 26S protease regulatory subunit S10B; TJs, tight junctions; TRAF-6, TNF receptor-associated factor 6; UCH-L3, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3; UPase 1, uridine phosphorylase 1; UPS, ubiquitin-proteasome system; Vsp4b, vacuolar protein sorting-associating protein 4B; WAS, water avoidance stress; wt, wild-type.

REFERENCES

- (1) Le Pluart, D.; Sabaté, J.-M.; Bouchoucha, M.; Hercberg, S.; Benamouzig, R.; Julia, C. Functional Gastrointestinal Disorders in 35,447 Adults and Their Association with Body Mass Index. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2015**, *41* (8), 758–767.
- (2) Ford, A. C.; Lacy, B. E.; Talley, N. J. Irritable Bowel Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376* (26), 2566–2578.
- (3) Drossman, D. A.; Camilleri, M.; Mayer, E. A.; Whitehead, W. E. AGA Technical Review on Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* **2002**, *123* (6), 2108–2131.
- (4) Simrén, M.; Axelsson, J.; Gillberg, R.; Abrahamsson, H.; Svedlund, J.; Björnsen, E. S. Quality of Life in Inflammatory Bowel Disease in Remission: The Impact of IBS-like Symptoms and Associated Psychological Factors. *Am. J. Gastroenterol.* **2002**, *97* (2), 389–396.
- (5) Camilleri, M.; Madsen, K.; Spiller, R.; Van Meerveld, B. G.; Verne, G. N. Intestinal Barrier Function in Health and Gastrointestinal Disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **2012**, *24* (6), S03–S12.
- (6) Zhou, Q.; Verne, G. N. New Insights into Visceral Hypersensitivity—Clinical Implications in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2011**, *8* (6), 349–355.
- (7) Spiller, R. C.; Jenkins, D.; Thornley, J. P.; Hebden, J. M.; Wright, T.; Skinner, M.; Neal, K. R. Increased Rectal Mucosal Enterodendocrine Cells, T Lymphocytes, and Increased Gut Permeability Following Acute *Campylobacter* Enteritis and in Post-Dysenteric Irritable Bowel Syndrome. *Gut* **2000**, *47* (6), 804–811.
- (8) Dunlop, S. P.; Hebden, J.; Campbell, E.; Naesdal, J.; Olbe, L.; Perkins, A. C.; Spiller, R. C. Abnormal Intestinal Permeability in Subgroups of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndromes. *Am. J. Gastroenterol.* **2006**, *101* (6), 1288–1294.
- (9) Zhou, Q.; Zhang, B.; Verne, G. N. Intestinal Membrane Permeability and Hypersensitivity in the Irritable Bowel Syndrome. *Pain* **2009**, *146* (1–2), 41–46.
- (10) Coëffier, M.; Gloro, R.; Boukhetala, N.; Aziz, M.; Lecleire, S.; Vandaele, N.; Antonietti, M.; Savoye, G.; Bôle-Feysot, C.; Déchelotte, P.; et al. Increased Proteasome-Mediated Degradation of Occludin in Irritable Bowel Syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* **2010**, *105* (5), 1181–1188.
- (11) Bertiaux-Vandaële, N.; Youmba, S. B.; Belmonte, L.; Lecleire, S.; Antonietti, M.; Gourcerol, G.; Leroi, A.-M.; Déchelotte, P.; Ménard, J.-F.; Ducrotte, P.; et al. The Expression and the Cellular Distribution of the Tight Junction Proteins Are Altered in Irritable Bowel Syndrome Patients with Differences According to the Disease Subtype. *Am. J. Gastroenterol.* **2011**, *106* (12), 2165–2173.
- (12) Martínez, C.; Vicario, M.; Ramos, L.; Lobo, B.; Mosquera, J. L.; Alonso, C.; Sánchez, A.; Guilarte, M.; Antolín, M.; de Torres, I.; et al. The Jejunum of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Shows Molecular Alterations in the Tight Junction Signaling Pathway That Are Associated with Mucosal Pathobiology and Clinical Manifestations. *Am. J. Gastroenterol.* **2012**, *107* (5), 736–746.
- (13) Zhou, Q.; Souba, W. W.; Croce, C. M.; Verne, G. N. MicroRNA-29a Regulates Intestinal Membrane Permeability in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Gut* **2010**, *59* (6), 775–784.
- (14) Traweger, A.; Fang, D.; Liu, Y.-C.; Stelzhammer, W.; Krizbai, I. A.; Fresser, F.; Bauer, H.-C.; Bauer, H. The Tight Junction-Specific Protein Occludin Is a Functional Target of the E3 Ubiquitin-Protein Ligase Itch. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (12), 10201–10208.
- (15) Viserkruna, A.; Joeris, T.; Seidel, D.; Kroesen, A.; Loddenkemper, C.; Zeitz, M.; Kaufmann, S. H. E.; Schmidt-Ullrich, R.; Steinhoff, U. Proteasome-Mediated Degradation of IkappaBalpha and Processing of p105 in Crohn Disease and Ulcerative Colitis. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116* (12), 3195–3203.
- (16) Leblond, J.; Hubert-Buron, A.; Bole-Feysot, C.; Ducrotte, P.; Déchelotte, P.; Coëffier, M. Regulation of Proteolysis by Cytokines in the Human Intestinal Epithelial Cell Line HCT-8: Role of IFNgamma. *Biochimie* **2006**, *88* (7), 759–765.
- (17) Kloetzel, P. M. Antigen Processing by the Proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2* (3), 179–187.
- (18) Inoue, S.; Nakase, H.; Matsuura, M.; Mikami, S.; Ueno, S.; Uza, N.; Chiba, T. The Effect of Proteasome Inhibitor MG132 on Experimental Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *156* (1), 172–182.
- (19) Schmidt, N.; Gonzalez, E.; Viserkruna, A.; Kühl, A. A.; Loddenkemper, C.; Mollenkopf, H.; Kaufmann, S. H. E.; Steinhoff, U.; Joeris, T. Targeting the Proteasome: Partial Inhibition of the Proteasome by Bortezomib or Deletion of the Immunosubunit LMP7 Attenuates Experimental Colitis. *Gut* **2010**, *59* (7), 896–906.
- (20) Basler, M.; Dajee, M.; Moll, C.; Groettrup, M.; Kirk, C. J. Prevention of Experimental Colitis by a Selective Inhibitor of the Immunoproteasome. *J. Immunol.* **2010**, *185* (1), 634–641.
- (21) Ghoulali, I.; Lemaitre, C.; Bahloul, W.; Azhar, S.; Bôle-Feysot, C.; Meleine, M.; Ducrotte, P.; Déchelotte, P.; Coëffier, M. Targeting Immunoproteasome and Glutamine Supplementation Prevent Intestinal Hyperpermeability. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2017**, *1861* (1 Pt A), 3278–3288.
- (22) Kilkenny, C.; Parsons, N.; Kadyaszewski, E.; Festing, M. F. W.; Cuthill, I. C.; Fry, D.; Hutton, J.; Altman, D. G. Survey of the Quality of Experimental Design, Statistical Analysis and Reporting of Research Using Animals. *PLoS One* **2009**, *4* (11), No. e7824.
- (23) Bradesi, S.; Schwetz, I.; Ennes, H. S.; Lamy, C. M. R.; Ohning, G.; Fanselow, M.; Pothoulakis, C.; McRoberts, J. A.; Mayer, E. A. Repeated Exposure to Water Avoidance Stress in Rats: A New Model for Sustained Visceral Hyperalgesia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2005**, *289* (1), G42–53.
- (24) Lee, J. Y.; Kim, N.; Kim, Y. S.; Nam, R. H.; Ham, M. H.; Lee, H. S.; Jo, W.; Shim, Y.; Choi, Y. J.; Yoon, H.; et al. Repeated Water Avoidance Stress Alters Mucosal Mast Cell Counts, Interleukin-1 β Levels with Sex Differences in the Distal Colon of Wistar Rats. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **2016**, *22* (4), 694–704.
- (25) Larauche, M.; Gourcerol, G.; Million, M.; Adelson, D. W.; Taché, Y. Repeated Psychological Stress-Induced Alterations of Visceral Sensitivity and Colonic Motor Functions in Mice: Influence of Surgery and Postoperative Single Housing on Visceromotor Responses. *Stress* **2010**, *13* (4), 343–354.
- (26) Jésus, P.; Ouelaa, W.; François, M.; Riachy, L.; Guérin, C.; Aziz, M.; Do Rego, J.-C.; Déchelotte, P.; Fetissov, S. O.; Coëffier, M. Alteration of Intestinal Barrier Function during Activity-Based Anorexia in Mice. *Clin. Nutr.* **2014**, *33* (6), 1046–1053.
- (27) Coëffier, M.; Claeysens, S.; Hecketsweiler, B.; Lavoine, A.; Ducrotte, P.; Déchelotte, P. Enteral Glutamine Stimulates Protein Synthesis and Decreases Ubiquitin mRNA Level in Human Gut Mucosa. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2003**, *285* (2), G266–273.
- (28) Goichon, A.; Coëffier, M.; Claeysens, S.; Lecleire, S.; Cailleux, A.-F.; Bôle-Feysot, C.; Chan, P.; Donnadiou, N.; Lerebours, E.; Lavoine, A.; et al. Effects of an Enteral Glucose Supply on Protein Synthesis, Proteolytic Pathways, and Proteome in Human Duodenal Mucosa. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *94* (3), 784–794.
- (29) Bertrand, J.; Marion-Letellier, R.; Azhar, S.; Chan, P.; Legrand, R.; Goichon, A.; Ghoulali, I.; Aziz, M.; Vaudry, D.; Savoye, G.; et al. Glutamine Enema Regulates Colonic Ubiquitinated Proteins but Not Proteasome Activities during TNBS-Induced Colitis Leading to Increased Mitochondrial Activity. *Proteomics* **2015**, *15* (13), 2198–2210.
- (30) Goichon, A.; Bertrand, J.; Chan, P.; Lecleire, S.; Coquard, A.; Cailleux, A.-F.; Vaudry, D.; Déchelotte, P.; Coëffier, M. Enteral Delivery of Proteins Enhances the Expression of Proteins Involved in the Cytoskeleton and Protein Biosynthesis in Human Duodenal Mucosa. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *102* (2), 359–367.
- (31) Vizcaino, J. A.; Csordas, A.; del-Toro, N.; Dianas, J. A.; Griss, J.; Lavidas, I.; Mayer, G.; Perez-Riverol, Y.; Reisinger, F.; Ternent, T.; et al. 2016 Update of the PRIDE Database and Its Related Tools. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1), D447–456.
- (32) Huang, D. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A. Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources. *Nat. Protoc.* **2009**, *4* (1), 44–57.

- (33) Bertrand, J.; Tennoune, N.; Marion-Letellier, R.; Goichon, A.; Chan, P.; Mbodji, K.; Vaudry, D.; Déchelotte, P.; Coëffier, M. Evaluation of Ubiquitinated Proteins by Proteomics Reveals the Role of the Ubiquitin Proteasome System in the Regulation of Grp75 and Grp78 Chaperone Proteins during Intestinal Inflammation. *Proteomics* **2013**, *13* (22), 3284–3292.
- (34) Visekruna, A.; Joeris, T.; Schmidt, N.; Lawrenz, M.; Ritz, J.-P.; Buhr, H. J.; Steinhoff, U. Comparative Expression Analysis and Characterization of 20S Proteasomes in Human Intestinal Tissues: The Proteasome Pattern as Diagnostic Tool for IBD Patients. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15* (4), 526–533.
- (35) Rolland-Fourcade, C.; Denadai-Souza, A.; Cirillo, C.; Lopez, C.; Jaramillo, J. O.; Desormeaux, C.; Cenac, N.; Motta, J.-P.; Larauche, M.; Taché, Y.; et al. Epithelial Expression and Function of Trypsin-3 in Irritable Bowel Syndrome. *Gut* **2017**, *66* (10), 1767–1778.
- (36) Moloney, R. D.; O'Mahony, S. M.; Dinan, T. G.; Cryan, J. F. Stress-Induced Visceral Pain: Toward Animal Models of Irritable-Bowel Syndrome and Associated Comorbidities. *Front. Psychiatry* **2015**, *6*, 15.
- (37) Seifert, U.; Bialy, L. P.; Ebstein, F.; Bech-Otschir, D.; Voigt, A.; Schröter, F.; Prozorovski, T.; Lange, N.; Steffen, J.; Rieger, M.; et al. Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *Cell* **2010**, *142* (4), 613–624.
- (38) Nathan, J. A.; Spinnenhirn, V.; Schmidtke, G.; Basler, M.; Groettrup, M.; Goldberg, A. L. Immuno- and Constitutive Proteasomes Do Not Differ in Their Abilities to Degrade Ubiquitinated Proteins. *Cell* **2013**, *152* (5), 1184–1194.
- (39) Setsuie, R.; Suzuki, M.; Tsuchiya, Y.; Wada, K. Skeletal Muscles of Uchl3 Knockout Mice Show Polyubiquitinated Protein Accumulation and Stress Responses. *Neurochem. Int.* **2010**, *56* (8), 911–918.
- (40) Kim, J. Y.; Lee, J.-M.; Cho, J.-Y. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L3 Regulates Smad1 Ubiquitination and Osteoblast Differentiation. *FEBS Lett.* **2011**, *585* (8), 1121–1126.
- (41) Sano, Y.; Furuta, A.; Setsuie, R.; Kikuchi, H.; Wang, Y.-L.; Sakurai, M.; Kwon, J.; Noda, M.; Wada, K. Photoreceptor Cell Apoptosis in the Retinal Degeneration of Uchl3-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* **2006**, *169* (1), 132–141.
- (42) Song, H. M.; Lee, J. E.; Kim, J. H. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L3 Regulates EMT Process and Cancer Metastasis in Prostate Cell Lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *452* (3), 722–727.
- (43) Rolén, U.; Kobzeva, V.; Gasparjan, N.; Ova, H.; Winberg, G.; Kisseljov, F.; Masucci, M. G. Activity Profiling of Deubiquitinating Enzymes in Cervical Carcinoma Biopsies and Cell Lines. *Mol. Carcinog.* **2006**, *45* (4), 260–269.
- (44) Miyoshi, Y.; Nakayama, S.; Torikoshi, Y.; Tanaka, S.; Ishihara, H.; Taguchi, T.; Tamaki, Y.; Noguchi, S. High Expression of Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase-L1 and -L3 mRNA Predicts Early Recurrence in Patients with Invasive Breast Cancer. *Cancer Sci.* **2006**, *97* (6), 523–529.
- (45) Zhao, P.; Guo, T.; Qian, L.; Wang, X.; Yuan, Y.; Cheng, Q.; Zuo, Y.; Liu, J.; Miao, Y.; Feng, Q.; et al. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L3 Promotes Interferon Antiviral Activity by Stabilizing Type I-Interferon Receptor. *Antiviral Res.* **2017**, *144*, 120–129.
- (46) Kanarek, N.; Ben-Neriah, Y. Regulation of NF- κ B by Ubiquitination and Degradation of the I κ Bs. *Immunol. Rev.* **2012**, *246* (1), 77–94.
- (47) Coëffier, M.; Marion-Letellier, R.; Déchelotte, P. Potential for Amino Acids Supplementation during Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **2010**, *16* (3), 518–524.
- (48) Singleton, K. D.; Wischmeyer, P. E. Glutamine Attenuates Inflammation and NF- κ B Activation via Cullin-1 Deneddylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *373* (3), 445–449.
- (49) Beutheu, S.; Ouelaa, W.; Guérin, C.; Belmonte, L.; Aziz, M.; Tennoune, N.; Bôle-Feysot, C.; Galas, L.; Déchelotte, P.; Coëffier, M. Glutamine Supplementation, but Not Combined Glutamine and Arginine Supplementation, Improves Gut Barrier Function during Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis in Rats. *Clin. Nutr.* **2014**, *33* (4), 694–701.
- (50) Beutheu, S.; Ghouzali, I.; Galas, L.; Déchelotte, P.; Coëffier, M. Glutamine and Arginine Improve Permeability and Tight Junction Protein Expression in Methotrexate-Treated Caco-2 Cells. *Clin. Nutr.* **2013**, *32* (5), 863–869.
- (51) Choi, K.; Lee, S. S.; Oh, S. J.; Lim, S. Y.; Lim, S. Y.; Jeon, W. K.; Oh, T. Y.; Kim, J. W. The Effect of Oral Glutamine on 5-Fluorouracil/Leucovorin-Induced Mucositis/Stomatitis Assessed by Intestinal Permeability Test. *Clin. Nutr.* **2007**, *26* (1), 57–62.
- (52) Daniele, B.; Perrone, F.; Gallo, C.; Pignata, S.; De Martino, S.; De Vivo, R.; Barletta, E.; Tambaro, R.; Abbiati, R.; D'Agostino, L. Oral Glutamine in the Prevention of Fluorouracil Induced Intestinal Toxicity: A Double Blind, Placebo Controlled, Randomised Trial. *Gut* **2001**, *48* (1), 28–33.
- (53) Hubert-Buron, A.; Leblond, J.; Jacquot, A.; Ducrotté, P.; Déchelotte, P.; Coëffier, M. Glutamine Pretreatment Reduces IL-8 Production in Human Intestinal Epithelial Cells by Limiting IkappaBalpha Ubiquitination. *J. Nutr.* **2006**, *136* (6), 1461–1465.
- (54) Bertrand, J.; Ghouzali, I.; Guérin, C.; Bôle-Feysot, C.; Gouteux, M.; Déchelotte, P.; Ducrotté, P.; Coëffier, M. Glutamine Restores Tight Junction Protein Claudin-1 Expression in Colonic Mucosa of Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *J. Parenter. Enteral Nutr.* **2016**, *40* (8), 1170–1176.
- (55) Zhou, Q.; Costinean, S.; Croce, C. M.; Brasier, A. R.; Merwat, S.; Larson, S. A.; Basra, S.; Verne, G. N. MicroRNA 29 Targets Nuclear Factor- κ B-Repressing Factor and Claudin 1 to Increase Intestinal Permeability. *Gastroenterology* **2015**, *148* (1), 158–169.e8.
- (56) Zhou, Q.; Verne, M. L.; Fields, J. Z.; Lefante, J. J.; Basra, S.; Salameh, H.; Verne, G. N. Randomised Placebo-Controlled Trial of Dietary Glutamine Supplements for Postinfectious Irritable Bowel Syndrome. *Gut* **2018**, DOI: 10.1136/gutjnl-2017-315136
- (57) Li, N.; Neu, J. Glutamine Deprivation Alters Intestinal Tight Junctions via a PI3-K/Akt Mediated Pathway in Caco-2 Cells. *J. Nutr.* **2009**, *139* (4), 710–714.
- (58) Coëffier, M.; Déchelotte, P.; Ducrotté, P. Intestinal Permeability in Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome: Is There a Place for Glutamine Supplementation? *Gastroenterology* **2015**, *148* (5), 1079–1080.
- (59) Zhou, Q.; Verne, G. N. Reply: To PMID 25277410. *Gastroenterology* **2015**, *148* (5), 1080–1081.
- (60) Cleynen, I.; Vazille, E.; Artieda, M.; Verspaget, H. W.; Szczypiorska, M.; Bringer, M.-A.; Lakatos, P. L.; Seibold, F.; Parnell, K.; Weersma, R. K.; et al. Genetic and Microbial Factors Modulating the Ubiquitin Proteasome System in Inflammatory Bowel Disease. *Gut* **2014**, *63* (8), 1265–1274.

III. MANUSCRIT 1

STRESS-INDUCED INTESTINAL BARRIER DYSFUNCTION IS EXACERBATED DURING DIET-INDUCED OBESITY.

Wafa Bahlouli, Jonathan Breton, Mauranne Lelouard, Clément L'Huillier, Pauline Tirelle, Emmeline Salameh, Asma Amamou, Karim Atmani, Alexis Goichon, Christine Bôle-Feysot, Philippe Ducrotté, David Ribet, Pierre Déchelotte, Moïse Coëffier.

Manuscrit en cours de soumission

L'hyperperméabilité intestinale, la dysbiose, l'inflammation intestinale ainsi que le dysfonctionnement de l'axe-intestin cerveau, font partie des facteurs fortement impliqués dans les troubles gastro-intestinaux retrouvés chez les patients SII. Ces facteurs sont également impliqués dans la physiopathologie de l'obésité, qui a longtemps été liée à la génétique ou bien encore à la diète et la sédentarité. Les données actuelles suggèrent que l'intestin pourrait représenter l'un des tissus clés à l'origine de l'obésité et serait impliqué dans les complications de l'obésité, y compris les complications métaboliques. Or, la prévalence du SII est fortement augmentée chez les patients ayant une obésité de grade III.

Le but de cette étude était donc de rechercher les mécanismes impliqués dans le lien entre l'obésité et le SII via deux modèles d'obésité (génétique et induite par HFD) en réponse au stress.

Ces modèles ont été réalisés chez des souris mâles C57Bl/6 soumises à une HFD ou bien chez des souris déficientes pour la leptine (ob/ob), pour lesquels nous avons évalué les paramètres de l'obésité, i.e. le poids, la masse corporelle et la glycémie, afin de valider le modèle d'obésité. Ces modèles une fois validés ont été exposés au stress, le WAS comme précédemment utilisé pour générer le modèle SII-Like. Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur l'évaluation de la perméabilité intestinale dans un modèle d'obésité en réponse au stress. D'autres

expériences complémentaires ont été réalisées pour tenter de comprendre les mécanismes impliqués : traitement des souris C57Bl/6 à la leptine ou bien à la metformine pour les souris HFD ainsi qu'une greffe du microbiote intestinal. Ces trois derniers modèles ont été exposés au WAS et la perméabilité intestinale a été évaluée.

Nous avons d'abord validé les deux modèles d'obésité ; une augmentation du poids corporel, de la masse grasse ainsi qu'une intolérance au glucose ont été constatées. Nous avons ensuite montré que l'obésité induite par une HFD exacerbe l'hyperperméabilité intestinale en réponse au stress. Ces résultats n'ont pas été retrouvés chez les souris ob/ob stressées. De plus, ni le traitement par la leptine ni le transfert de microbiote intestinal, n'ont pu reproduire les résultats de l'hyperperméabilité intestinale retrouvée chez les souris HFD stressées. Enfin, la metformine n'a pas limité cette réponse.

En conclusion sur cette étude, nous pouvons dire que le stress induit une rupture de la fonction de barrière intestinale significative dans le modèle d'obésité HFD, indépendamment de la leptine, de la glycémie et du microbiote intestinal.

Manuscrit 1 :

Stress-induced intestinal barrier dysfunction is exacerbated during diet-induced obesity.

Wafa Bahlouli^{1,2}, Jonathan Breton^{1,2}, Mauranne Lelouard^{1,2}, Clément L'Huillier^{1,2}, Pauline Tirelle^{1,2}, Emmeline Salameh^{1,2}, Asma Amamou^{1,2}, Karim Atmani^{1,2}, Alexis Goichon^{1,2}, Christine Bôle-Feysot^{1,2}, Philippe Ducrotté^{1,2,3†}, David Ribet^{1,2}, Pierre Déchelotte^{1,2,4}, Moïse Coëffier^{1,2,4*}.

¹ Normandie University, UNIROUEN, INSERM UMR 1073 “Nutrition, inflammation and gut-brain axis”, 76183 Rouen, France.

² Institute of Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), UNIROUEN, 76183 Rouen, France.

³ Department of Gastroenterology, Rouen University Hospital, 76183 Rouen, France

⁴ Department of Nutrition, Rouen University Hospital, 76183 Rouen, France

* Correspondence: moise.coeffier@univ-rouen.fr; Tel.: +33235148240;

Abstract

Obesity and irritable bowel syndrome (IBS) are two major public health issues. Interestingly previous data report a marked increase of IBS prevalence in morbid obese subjects compared with non-obese subjects but underlying mechanisms remain unknown. Obesity and IBS share common intestinal pathophysiological mechanisms such as gut dysbiosis, intestinal hyperpermeability and low-grade inflammatory response. We thus aimed to evaluate the link between obesity and IBS in animal models. Male C57Bl/6 mice received high fat diet (HFD) for 12 weeks and were then submitted to water avoidance stress (WAS). In response to WAS, HFD mice exhibited higher intestinal permeability and plasma corticosterone concentration than non-obese mice. We were not able to reproduce a similar response both in ob/ob mice and in leptin-treated non-obese mice. In addition, metformin limited fasting glycaemia both in unstressed and WAS diet-induced obese mice but only partially restored colonic permeability in unstressed HFD mice. Metformin failed to improve intestinal permeability in WAS HFD mice. Finally, cecal microbiota transplantation from HFD mice in antibiotics-treated recipient mice did not reproduce the effects observed in stressed HFD mice. In conclusion, stress induced a more marked intestinal barrier dysfunction in diet-induced obese mice compared with non-obese mice that seems to be independent of leptin, glycaemia and gut microbiota. These data should be further confirmed and the role of the dietary composition should be studied.

Introduction

Obesity, defined by abnormal accumulation of fat and a body mass index ≥ 30 kg/m², is a significant public health problem in both industrialized and emerging countries. The associated complications, particularly diabetes and cardiovascular diseases, result in the death of at least 2.8 million people each year. In Europe, the prevalence of overweight is estimated approximately at 50% [1] and the prevalence of obesity to be around 16% of the population [2]. Obesity is a multifactorial pathology, linked to genetic, metabolic and environmental factors. Disturbances in the microbiota-gut-brain axis during obesity, in particular intestinal dysbiosis [3, 4] and hyperpermeability [5] have been reported leading to modifications in the regulation of food intake, inflammation and metabolic homeostasis.

Similar mechanisms are also involved in the pathophysiology of irritable bowel syndrome (IBS), a functional gastrointestinal disorder (FGD) defined according to the Rome IV diagnostic criteria by chronic abdominal pain, associated with diarrhea and/or constipation and bloating. The prevalence of IBS is about 5-20% in industrialized countries [6, 7], which also makes it a public health issue, with a negative impact on the quality of life, the consumption of care and the stops working. The pathophysiology of IBS is multifactorial and includes visceral hypersensitivity, mucosal immune alterations [8], gut dysbiosis [9], enhanced intestinal permeability [10, 11] and psychosocial factors [7].

Some recent studies have suggested a link between obesity and FGDs [12]. A French study showed that the prevalence of IBS was significantly increased (30%) in patients with grade III obesity (BMI > 40) [13]. Conversely, in another retrospective study, grade I and II obesity appeared to be associated with reduced risk of IBS [14]. In IBS patients, the expression of occludin, a tight junction protein, was more severely reduced in patients with BMI > 30 [15]. All these studies highlight a relationship between obesity and IBS but mechanisms remain

misunderstood while obesity and IBS share pathophysiological factors such as gut dysbiosis, alteration of gut barrier function, low-grade inflammatory response, altered TLR expression.

We thus aimed to evaluate the interaction between obesity and IBS in mice by evaluating the response to stress in obese mice.

Material and Methods

Animal experimentation

Animal care and experimentation complied with both French and European Community regulations, followed ARRIVE guidelines [16] and the experiment was approved by the Regional Ethical Committee (#6686-2016071512471751 v8). All mice were purchased from Janvier Labs (Genest-St.-Isle, France) and acclimated to the animal facility (controlled temperature (20 +/-2°C) and with 12 h light–dark cycle) for one week before experimentation. Food and drinking water were free of access.

Water avoidance stress

The water avoidance stress (WAS) model was performed as previously described [17]. Briefly, mice were placed on a small platform in a tank of water (25°C) during 1 hour per day during 10 consecutive days. Fecal pellet output was monitored during each session. Control mice (C) were kept in standard cages.

Diet-induced and genetic obesity

Six week-old C57Bl/6 male mice were randomized into two groups receiving for 12 weeks either standard diet (RM1, SD group) or high fat diet supplying 60% of calories as fat mainly by lard, 20% as carbohydrates and 20% as protein (#D12492, Research Diets, New Brunswick, NJ). Body weight was measured every two weeks. Two month-old C57Bl/6 male obese *ob/ob* and littermate *ob/-* controls (lean) received standard diet (RM1). Body composition was measured by EchoMRI (EchoMRI, Houston, TX). The first experiment combined diet-induced obesity and WAS leading to four groups: Standard diet without stress called SD-C; Standard diet and WAS called SD-WAS; High fat diet without stress called HFD-C; High fat diet and WAS called HFD-WAS. The second experiment combined genetic obesity and WAS leading

to 3 groups: Lean without stress (Lean-C); ob/ob mice without stress (ob/ob – C); ob/ob mice with WAS (ob/ob – WAS)

Leptin experiment

Seventeen weeks old C57Bl / 6 mice were randomized into 2 groups; treated mice received an i.p. injection of leptin at 10 µg/kg/day (Bachem) for 20 days (10 days before exposure to WAS and 10 days during WAS). The control group received saline. Finally, we obtained 3 groups (n=8 per group): (1) CT-C; (2) Lept-C; (3) Lept-WAS. All mice had free access to a standard chow and water.

Metformin experiment

Eight weeks old C57Bl/6 male mice were randomized into two groups receiving for 12 weeks either SD or HFD as described above. After 10 weeks, HFD mice received metformin hydrochloride (500mg, Sigma Aldrich) dissolved in drinking water at 100 mg/kg/day for 20 days (10 days before the end of the diet and 10 days during the WAS exposure). The control group received only drinking water. Finally, we obtained six groups (n=8/group): (1) SD-wt-C; (2) SD-wt-WAS; (3) HFD-wt-C; (4) HFD-wt-WAS; (5) HFD-Met-C; (6) HFD-Met-WAS.

Microbiota experiment

Donor mice: After 12 weeks of SD or HFD, C57Bl/6 mice were euthanized, the cecal contents were collected and kept on ice till the transplantation. Briefly, the cecal contents were weighed, diluted in sterile phosphate-buffered saline (PBS; 4.75/1v of cecal content) and then centrifuged for 20 sec at 500 rpm. Supernatants were collected and pooled depending on the respective

groups (HFD, SD). Aliquots of each cecal content and 100 µl of each pool were stored at (-80 ° C) for further bacterial investigations.

Recipient mice: Conventional C57Bl/6 mice received by oral gavage (10 µL/g of body weight) a broad spectrum antibiotic cocktail [consisting of ampicillin (10 g/L; Sigma Aldrich), metronidazole (10 g/L; Sigma Aldrich), neomycin trisulfate salt hydrate (10 g/L; Sigma Aldrich), vancomycin hydrochloride hydrate (5 g/L; Sigma Aldrich) and amphotericin B (0.1 g/L; Sigma Aldrich)], twice a day, 7 days before receiving a transplant of the cecal content of donor mice. To limit the development of fungal species, antifungal solution of amphotericin B (0.1 g/L; Sigma) was administered twice a day over 3 days prior the antibiotic intervention. To counteract the gastric acidity, mice received a filtered solution of NaHCO₃ (0.1 g/mL; Sigma Aldrich) 30 min before the cecal microbiota transplant (MT). Then, recipient mice received 200 µl of the respective pools (HFD, SD) of cecal content (240 mg of content/ml) by oral gavage.

Five days after cecal transplantation, recipient mice were exposed or not to WAS. We obtained 4 groups: (1) SD^{MT}-C; (2) SD^{MT}-WAS; (3) HFD^{MT}-C; (4) HFD^{MT}-WAS.

Glucose tolerance test

After an overnight fasting with free access to water, mice were i.p. injected with glucose at 1 g/kg of body weight. Blood plasma glucose concentrations were measured from tail vein blood sampling at various times using a FreeStyle Papillon Vision glucometer (Abbott France, Rungis, France).

Tissue sampling

Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine/Largactil (40 and 1 mg.kg⁻¹, respectively). Blood samples were collected, centrifuged (4°C, 3000 rpm, 15 minutes) and

plasma was frozen at -80°C. Colonic samples were collected, washed with ice-cold PBS, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. Samples of cecal content and fresh colon were also collected to evaluate microbiota and paracellular permeability, respectively.

Whole intestinal and colonic permeability assessment

At the day 10 of WAS, after a 6-hour fasting period, FITC-dextran (4 kDa, 40 mg/mL) was administered by oral gavage at 10 µL/ g of body weight. Three hours later, the last WAS procedure was performed and mice were then immediately euthanized for blood collection.

Colonic permeability was assessed by measuring FITC-dextran (4 kDa) fluxes in Ussing chambers as previously described [17]. The fluorescence level of FITC-dextran either in serosal medium or in plasma (excitation at 485 nm, emission at 535 nm) was then measured in 96-well black plate with spectrometer Chameleon V (Hidex, Turku, Finland).

qRT-PCR

Mucosal total RNA was extracted from samples as previously described [18]. After reverse transcription of 1.5 µg total RNA into cDNA by using 200 units of **SuperScript™ II Reverse Transcriptase** (LifeTechnologies, Cergy-Pontoise, France), qPCR for quantification of pro-inflammatory cytokine (IL-1 β , TNF- α) was performed by SYBR™ Green technology on BioRad CFX96 real time PCR system (BioRad Laboratories, Marnes la Coquette, France) in duplicate for each sample. GAPDH was used as the endogenous reference gene and primers have been previously detailed [17].

Quantitative analysis of natural bacterial communities in cecal content

The total genomic DNA from each cecal content sample was extracted using a Qiagen QIAamp DNA stool kit by following a protocol recently adapted [19], then resuspended in 200 µl of Tris-EDTA buffer (10 mM Tris HC, pH 8, 0.5 mM EDTA), and quantified with an the nanodrop® 2000 / 2000c spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, US). We established *qPCR* assays for the specific quantification of 3 bacterial phyla: Eubacteria, Bacteroidetes, Firmicutes. Eubacteria was used as the endogenous reference gene.

Western blot analysis

Colonic mucosa was homogenized in ice-cold lysis buffer containing 0.1% protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich) and western blot was performed as previously described [20]. Briefly, proteins (25 µg) were separated on 4-20% glycine resolving gels (Biorad Laboratories) and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Orsay, France), which was blocked for 1 hour at room temperature with 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris Buffered Saline (TBS) (10 mmol/L Tris, pH 8; 150 mmol/L NaCl), plus 0.05% (w/v) Tween 20. Then, an overnight incubation at 4°C was performed with anti-occludin or anti-claudin 1 (1:1000, LifeTechnologies) or with mouse anti-β-actin (1:1000, Sigma Aldrich) antibodies. After three washes in a blocking solution of 5% (w/v) non-fat dry milk in TBS/0.05% and Tween 20, a 1hour incubation with peroxylase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (1:5000; Dako) was performed. After three additional washes, immuno-complexes were revealed by using the Enhanced ChemiLuminescence (ECL) detection system (GE Healthcare). Protein bands were quantified by densitometry using ImageScanner III and ImageQuant TL software (GE Healthcare).

Corticosterone assay

Corticosterone was measured by using a commercial serum corticosterone enzyme immunoassay kit according to the manufacturer's instructions (Abnova, Ann Arbor, MI).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc, San Diego, CA, USA). To compare two groups, t-test or Mann-Whitney test was used, as appropriate. If variances significantly differed between groups (Bartlett's test) or if normality test was not passed (Kolmogorov-Smirnov test), Mann-Whitney test was performed. To compare three groups or conditions, statistical analysis consisted in two-way ANOVA (WAS x Treatment (TT)) followed by Bonferroni post-tests. For all tests, $p < 0.05$ was considered significant.

Results

After 12 weeks, HFD induced 17.8 g of body weight compared to 7.5 g in SD that was only related to an increase of fat mass. Lean mass remained unchanged between HFD and SD groups (Figure 1A). Ob/ob mice showed higher body weight than HFD mice, as well as higher percentage of fat mass (Figure 1B, C). HFD mice had higher fasting glycaemia compared with SD and ob/ob mice (Figure 1D) even if both HFD and ob/ob mice showed glucose intolerance (Figure 1E, F). Indeed, plasma glucose was increased at 15, 30, 60 and 90 min in HFD mice and at 15, 60 and 90 min in ob/ob mice compared with SD.

We have then submitted HFD mice to WAS. To evaluate colonic motility, we monitored the number of output feces during WAS procedure. HFD and SD mice showed an increase of output feces number in response to WAS compared to HFD-C and SD-C, respectively (Figure 2A). However, the number of output feces was lower in HFD-WAS than in SD-WAS. Ob/ob mice showed a similar response with an increase of colonic motility in response to WAS (Figure 3A). Serum corticosterone was unchanged in SD-WAS compared to SD-C that is in accordance with previous data [17] and in HFD mice (Figure 2B). By contrast, HFD-WAS mice exhibited a marked increase of serum corticosterone compared with other groups. Both ob/ob-C and ob/ob-WAS mice had an increase of corticosterone compared with lean mice (Figure 3B). To evaluate whole intestinal permeability, mice were administered by oral gavage with FITC-dextran 4kDa that was then measured in plasma. Plasma FITC-D concentration was increased in HFD-C mice (+37%) but more markedly in HFD-WAS mice (+152%) compared with SD (Figure 2C). Indeed, HFD-WAS exhibited a significant increase of plasma FITC-D compared to other 3 groups. In ob/ob mice, we did not observe a similar pattern, since plasma FITC-D concentration remained unaffected both in ob/ob-C and ob/ob-WAS groups (Figure 3C). We then focused on colon to evaluate paracellular permeability by Ussing chambers. We observe a trend for an increase of colonic permeability in SD-WAS compared to SD, but difference did

reach significance ($p=0.085$). HFD mice exhibited a similar increase of colonic permeability whatever the presence of WAS or not (Figure 2D). Again, ob/ob mice showed different response compared to HFD. A trend for a decrease of colonic permeability was observed in ob/ob-C mice ($p=0.095$) whereas ob/ob-WAS exhibited higher colonic permeability than in ob/ob-C (+84%, $p<0.05$) but similar to lean-C group (Figure 3D). These discrepancies may be explained by different alterations of tight junction protein expression. Occludin expression was reduced in SD-WAS, HFD-C and HFD-WAS groups compared with SD-C (Figure 2E), while there was no difference in claudin-1 expression between groups. Both occludin and claudin-1 expression remained unchanged in ob/ob mice (Figure 3E, F). IL-1 β mRNA level, used as a marker of inflammatory response, was increased in HFD-C and HFD-WAS mice compared with SD-C (Figure 2F). We did not observe difference between HFD-C and HFD-WAS groups. Ob/ob mice did not show any significant difference for IL-1 β (Figure 3G).

As HFD and ob/ob mice showed different pattern of response to WAS, we choose to focus on the role of leptin because of leptin deficiency in ob/ob mice and on the role of glycaemia because of higher fasting glycaemia in HFD mice (Figure 1D).

To evaluate the role of leptin, we injected wild type C57bl/6 mice with leptin to reproduce increased plasma level of leptin in diet-induced obese mice. During WAS, leptin-treated mice exhibited increased number of output feces (Figure 4A), but no modification of plasma corticosterone concentration (data not shown), of whole intestinal permeability evaluated by plasma FITC-D (Figure 4B) and colonic permeability (Figure 4C). In accordance, tight junction protein expression (occludin and claudin-1) remained unaffected (data not shown). Leptin-treated mice only showed increased colonic IL-1 β mRNA in response to WAS (Figure 4E).

To evaluate the putative role of glycaemia in the regulation of intestinal permeability in HFD mice during WAS, we performed an additional experiment in HFD mice treated or not with

Metformin for 20 days. Similarly to the previous experiment, HFD induced body weight gain (Figure 5A) related to fat mass gain (Figure 5B). HFD mice exhibited higher fasting glycaemia and glucose intolerance compared with SD mice (Figure 5 C, D). After 20 days of metformin treatment, HFD mice showed a partial restoration of fasting glycaemia in both mice submitted to WAS (HFD-met-WAS) or not (HFD-Met-C). In mice submitted to WAS, fasting glycaemia was significantly reduced after metformin treatment compared to HFD-wt-WAS (Figure 6A). Interestingly, WAS induced a weight loss in both SD and HFD mice but metformin blunted body weight loss (Figure 6B). The number of output feces increased in SD-wt-WAS and HFD-wt-WAS mice compared with SD-wt-C and HFD-wt-C, respectively, as observed in the first experiment (Figure 6C). In metformin-treated mice, we observed an increase of output feces in both mice submitted to WAS or not (Figure 6C), suggesting an enhanced colonic motility in metformin-treated mice. Plasma corticosterone concentration was affected by WAS procedure (p (WAS) = 0.006, two-way ANOVA) but metformin had no effect (Figure 6D). Similarly, whole intestinal permeability was affected by WAS (p (WAS)=0.046, two-way ANOVA) without effect of metformin treatment (Figure 6E). Both WAS and HFD induced an increase of colonic paracellular permeability (Figure 6F). Interestingly, metformin partially restored colonic permeability only in HFD-Met-C mice but not in HFD-Met-WAS mice. However, metformin was not able to restore tight junction protein expression, occludin and claudin-1, in the colon of mice submitted or not to WAS (Figure 6 G, H). Concerning colonic inflammatory response, metformin only restored IL-1 β mRNA level in HFD mice submitted to WAS (Figure 6I).

Thus, our data showed that neither leptin injections were able to mimic HFD mice response to WAS nor metformin treatment reduced intestinal permeability suggesting that other mechanisms or pathways should be involved. We then evaluated the putative effects of gut microbiota. For this purpose, we performed microbiota transplantation (MT) experiment.

A third experiment was done with HFD that reproduced previous data with higher body weight gain (Figure 7A) and glucose intolerance (Figure 7 B,C) in HFD mice than in SD mice. In addition, HFD mice also exhibited increased colonic permeability compared with SD (Figure 7D). Cecal contents of SD and HFD mice were then taken and transferred to antibiotic-treated recipient mice. After 5 days, recipient mice were then submitted or not to WAS.

Mice receiving microbiota from SD (SD^{MT}) tended to loss body weight in response to WAS whereas mice receiving microbiota from HFD (HFD^{MT}) showed a trend for an increase. Consequently, body weight change was significantly different between SD^{MT}-WAS and HFD^{MT}-WAS groups (Figure 7E). In response to WAS, both SD^{MT} and HFD^{MT} exhibited an increase of the number of output feces (Figure 7F), while plasma corticosterone concentration remained unaffected (Figure 7G). Surprisingly, in response to WAS, we observed that whole intestinal permeability (Figure 7H) and colonic permeability (Figure 7I) decreased in both SD^{MT} and HFD^{MT} groups ($p(\text{WAS}) < 0.05$, two-way ANOVA). Colonic occludin expression was only reduced in HFD^{MT}-WAS mice compared to other groups (Figure 7J). Colonic claudin-1 expression (Figure 7K) and IL-1 β mRNA (Figure 7L) were increased in SD^{MT}-WAS and HFD^{MT}-C compared with SD^{MT}-C but not in HFD^{MT}-WAS. Mice receiving microbiota from HFD donor mice did not reproduce the phenotype of HFD mice in response to WAS while MT seemed to be effective. Indeed, Cecal DNA content was reduced both in HFD donor mice and in mice receiving microbiota from HFD (Figure 8 A, B). In addition, the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, which was increased in HFD donor mice, remained higher in recipient mice ($p(\text{HFD}) = 0.041$, two-way ANOVA, Figure 8 C, D)

Discussion

In the present study, we report that diet-induced obesity exacerbates intestinal hyperpermeability in response to stress that may partially explain the increased prevalence of IBS previously reported in severe obese patients [13]. In addition, our data also suggest that neither leptin nor glycaemia contribute to this response, as well as gut microbiota.

Recently, Schneck et al reported that the prevalence of IBS increased to 30% in severe obese patients [13] compared to 4.7% in general population in France [6]. Even if obesity and IBS share pathophysiological mechanisms at the intestinal level, this increased prevalence remains unexplained. In the present study, we showed that HFD mice submitted to WAS model exhibited enhanced intestinal permeability compared to obese mice and to non-obese WAS mice that was associated with increased plasma corticosterone. Previous data showed that both HFD-induced obesity [21] and WAS [17, 22] are associated with increased intestinal permeability. In IBS patients, increased intestinal permeability has been described in many studies [11, 23-25] with alterations both in the small intestine [26, 27] and in the colon [10, 15, 28]. In obese patients, increased intestinal permeability has also been reported in some studies [5, 29]. Interestingly, we previously showed that colonic occludin expression was more markedly decreased in obese IBS patients compared with non-obese IBS patients [15]. However, in the present study, colonic permeability was mainly affected by obesity and colonic occludin expression was similarly reduced in WAS, obese and WAS-obese mice. Interestingly, ob/ob mice did not reproduce the results observed in HFD mice. Intestinal permeability was not increased in ob/ob mice compared with littermate controls. Those data are in accordance with previous paper showing no difference of intestinal permeability between ob/ob mice and wild type mice of the same strain [30] while enhanced permeability has been reported in other papers [31, 32]. However, leptin injections was not able to reproduced HFD-induced intestinal hyperpermeability. Again, published data are controversial since leptin has been shown to

increase paracellular permeability *in vitro* [33, 34] but leptin alleviated gut barrier function *in vivo* [35]. Le Dréan et al speculate that leptin may have different effects on intestinal permeability whether leptin binds its receptor on apical or basal epithelial side [36]. These data suggest that leptin pathway seems to be not involved in the specific HFD mice response to stress.

Then, we focused on the role of glycaemia since HFD mice exhibited glucose intolerance but also high fasting glycaemia. In addition, Thaïss et al recently reported that hyperglycaemia drives intestinal barrier dysfunction [37]. Metformin is a widely-used drug that results in clear benefits in relation to glucose metabolism and diabetes-related complications [38]. In our study, metformin partially restored fasting glycaemia and colonic permeability in unstressed HFD mice. Recent data underlined that metformin reduced epithelial paracellular permeability in Caco-2 cells [39], or *in vivo* during inflammatory [40, 41] and stress models [42, 43]. Nevertheless, in our study, metformin failed to improve intestinal permeability in stressed HFD mice that was not yet described to our knowledge. These data suggest that stress and diet-induced obesity may interact limiting the effects of metformin.

Finally, we choose to focus on gut microbiota since gut dysbiosis has been reported both in IBS [9] and obese patients [44]. Cecal microbiota transplantation from HFD mice in antibiotics-treated recipient mice did not reproduce the effects observed in stressed HFD mice suggesting that the gut microbiota did not trigger the exacerbation of intestinal permeability in stressed HFD mice. Interestingly, the prevalence rates of dysbiosis has been evaluated in IBS patients with and without morbid obesity. The authors reported higher rates of dysbiosis in groups with morbid obesity whatever the presence or not of IBS [45].

Our study has some limitations. Indeed, we were not able to determine the exact mechanisms involved in the exacerbation of intestinal permeability occurring in stressed HFD mice. Leptin pathway and glycaemia seem to be not involved. However, dose-dependent effects and the route

of leptin and metformin administrations may explain the absence of specific effects on intestinal permeability, even if both leptin and metformin treatments have been effectively confirmed by colonic IL-1 β and glycaemia changes, respectively. In addition, our data should be confirmed by using other approaches like germ-free mice for instance. Finally, in the present study, due to the high fat diet, WAS procedure was performed in 5 months old mice. We cannot exclude that the response to WAS could be different compared to younger mice [17, 22].

In conclusion, stress induced a more marked intestinal barrier dysfunction in diet-induced obese mice compared with non-obese mice that seems to independent of leptin, glycaemia and gut microbiota. The exacerbated intestinal barrier dysfunction may contribute to the increase of IBS prevalence in morbid obese patients. These data should be further confirmed and the role of diet composition should be investigated.

Acknowledgements

This work was co-supported by the Microbiome foundation and by European Union and Normandie Regional Council (to W.B. and for equipment). Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF). These funders did not participate in the design, implementation, analysis, and interpretation of the data.

Author contributions

WB, JB, ML, CL, PT, ES, AA, KA, AG, CBF and DR performed experiments and analyses. WB, PDu and MC designed experiments. WB, PDe and MC interpreted the data. WB and MC wrote the main manuscript text and prepared figures. All authors reviewed the manuscript.

References

1. Gallus, S., et al., *Overweight and obesity in 16 European countries*. Eur J Nutr, 2015. **54**(5): p. 679-89.
2. Marques, A., et al., *Prevalence of adult overweight and obesity in 20 European countries, 2014*. Eur J Public Health, 2018. **28**(2): p. 295-300.
3. Turnbaugh, P.J., et al., *Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(4): p. 213-23.
4. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
5. Teixeira, T.F., et al., *Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors*. Clin Nutr, 2012. **31**(5): p. 735-40.
6. Le Pluart, D., et al., *Functional gastrointestinal disorders in 35,447 adults and their association with body mass index*. Aliment Pharmacol Ther, 2015. **41**(8): p. 758-67.
7. Ford, A.C., B.E. Lacy, and N.J. Talley, *Irritable Bowel Syndrome*. N Engl J Med, 2017. **376**(26): p. 2566-2578.
8. Bashashati, M., et al., *Colonic immune cells in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis*. Neurogastroenterol Motil, 2018. **30**.
9. Menees, S. and W. Chey, *The gut microbiome and irritable bowel syndrome*. F1000Res, 2018. **7**.
10. Piche, T., et al., *Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators*. Gut, 2009. **58**(2): p. 196-201.
11. Dunlop, S.P., et al., *Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(6): p. 1288-94.
12. Pickett-Blakely, O., *Obesity and irritable bowel syndrome: a comprehensive review*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2014. **10**(7): p. 411-6.
13. Schneck, A.S., et al., *Increased Prevalence of Irritable Bowel Syndrome in a Cohort of French Morbidly Obese Patients Candidate for Bariatric Surgery*. Obes Surg, 2016. **26**(7): p. 1525-30.
14. Carter, D., et al., *Predictive factors for the diagnosis of irritable bowel syndrome in a large cohort of 440,822 young adults*. J Clin Gastroenterol, 2015. **49**(4): p. 300-5.
15. Bertiaux-Vandaële, N., et al., *The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**: p. 2165-73.
16. Kilkenny, C., et al., *Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7824.
17. Ghouzali, I., et al., *Targeting immunoproteasome and glutamine supplementation prevent intestinal hyperpermeability*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1861**(1 Pt A): p. 3278-3288.
18. Coeffier, M., et al., *Increased Proteasome-Mediated Degradation of Occludin in Irritable Bowel Syndrome*. Am J Gastroenterol, 2010. **105**(5): p. 1181-1188.
19. Costea, P.I., et al., *Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies*. Nat Biotechnol, 2017. **35**(11): p. 1069-1076.
20. Jesus, P., et al., *Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice*. Clin Nutr, 2014. **33**: p. 1046-53.
21. de La Serre, C.B., et al., *Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(2): p. G440-8.
22. Goichon, A., et al., *Colonic Proteome Signature in Immunoproteasome-Deficient Stressed Mice and Its Relevance for Irritable Bowel Syndrome*. J Proteome Res, 2019. **18**(1): p. 478-492.

23. Zhou, Q., B. Zhang, and G.N. Verne, *Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome*. Pain, 2009. **146**(1-2): p. 41-6.
24. Zhou, Q., et al., *Randomised placebo-controlled trial of dietary glutamine supplements for postinfectious irritable bowel syndrome*. Gut, 2018.
25. Spiller, R.C., et al., *Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome*. Gut, 2000. **47**(6): p. 804-11.
26. Martinez, C., et al., *The jejunum of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome shows molecular alterations in the tight junction signaling pathway that are associated with mucosal pathobiology and clinical manifestations*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(5): p. 736-46.
27. Martinez, C., et al., *Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier*. Gut, 2013. **62**(8): p. 1160-8.
28. Annahazi, A., et al., *Luminal Cysteine-Proteases Degrade Colonic Tight Junction Structure and Are Responsible for Abdominal Pain in Constipation-Predominant IBS*. Am J Gastroenterol, 2013. **108**(8): p. 1322-31.
29. Damms-Machado, A., et al., *Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction*. Am J Clin Nutr, 2017. **105**(1): p. 127-135.
30. Stenman, L.K., et al., *Genetically obese mice do not show increased gut permeability or faecal bile acid hydrophobicity*. Br J Nutr, 2013. **110**(6): p. 1157-64.
31. Nagpal, R., et al., *Obesity-Linked Gut Microbiome Dysbiosis Associated with Derangements in Gut Permeability and Intestinal Cellular Homeostasis Independent of Diet*. J Diabetes Res, 2018. **2018**: p. 3462092.
32. Johnson, A.M., et al., *High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0122195.
33. Kim, C.Y. and K.H. Kim, *Curcumin prevents leptin-induced tight junction dysfunction in intestinal Caco-2 BBe cells*. J Nutr Biochem, 2014. **25**(1): p. 26-35.
34. Le Drean, G., et al., *Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway*. FASEB J, 2014. **28**(3): p. 1059-70.
35. Ye, C., et al., *Leptin alleviates intestinal mucosal barrier injury and inflammation in obese mice with acute pancreatitis*. Int J Obes (Lond), 2018. **42**(8): p. 1471-1479.
36. Le Drean, G. and J.P. Segain, *Connecting metabolism to intestinal barrier function: The role of leptin*. Tissue Barriers, 2014. **2**(4): p. e970940.
37. Thaiss, C.A., et al., *Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection*. Science, 2018. **359**(6382): p. 1376-1383.
38. Rena, G., D.G. Hardie, and E.R. Pearson, *The mechanisms of action of metformin*. Diabetologia, 2017. **60**(9): p. 1577-1585.
39. Zhou, H.Y., et al., *Metformin regulates tight junction of intestinal epithelial cells via MLCK-MLC signaling pathway*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017. **21**(22): p. 5239-5246.
40. Chen, L., et al., *Activating AMPK to Restore Tight Junction Assembly in Intestinal Epithelium and to Attenuate Experimental Colitis by Metformin*. Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 761.
41. Deng, J., et al., *Metformin protects against intestinal barrier dysfunction via AMPKalpha1-dependent inhibition of JNK signalling activation*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(1): p. 546-557.
42. Nozu, T., et al., *Metformin inhibits visceral allodynia and increased gut permeability induced by stress in rats*. J Gastroenterol Hepatol, 2019. **34**(1): p. 186-193.
43. Li, Y., et al., *Metformin prevents colonic barrier dysfunction by inhibiting mast cell activation in maternal separation-induced IBS-like rats*. Neurogastroenterol Motil, 2019. **31**(5): p. e13556.
44. Cotillard, A., et al., *Dietary intervention impact on gut microbial gene richness*. Nature, 2013. **500**(7464): p. 585-8.

45. Aasbrenn, M., J. Valeur, and P.G. Farup, *Evaluation of a faecal dysbiosis test for irritable bowel syndrome in subjects with and without obesity*. Scand J Clin Lab Invest, 2018. **78**(1-2): p. 109-113.

Figure legends

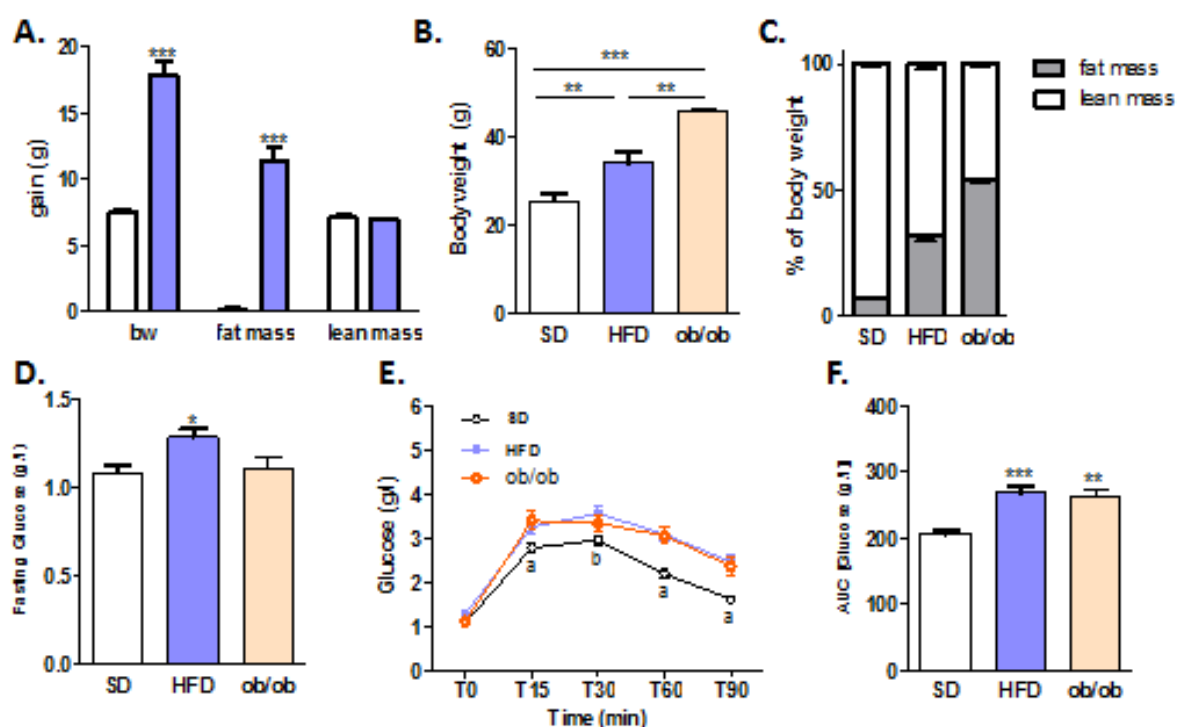


Figure 1: Body weight, body composition and glycaemia in mice with diet-induced and genetic obesity. Changes of body weight, fat mass and lean mass in mice receiving standard diet (SD, open bars) or high fat diet (HFD, blue bars) during 12 weeks (A). Body weight (B.), body composition (C.) and fasting glycaemia (D.) in mice receiving SD, HFD or in ob/ob mice. Glycaemia (E.) and area under the curve of glycaemia (F.) in response to i.p. glucose tolerance test in mice receiving SD, HFD or in ob/ob mice. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (E.) values without a common letter significantly differ, $p < 0.05$.

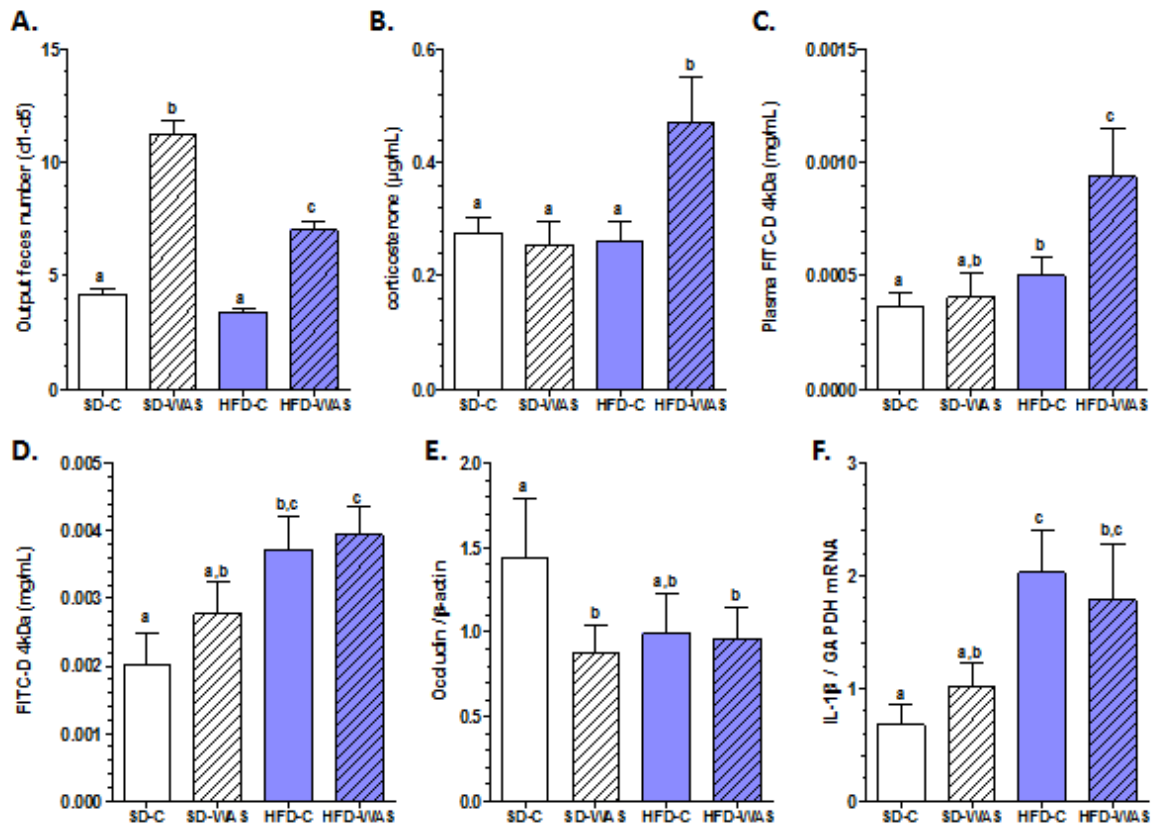


Figure 2: Response to water avoidance stress in mice with diet-induced obesity. Output feces number (A.), plasma corticosterone (B.) and plasma FITC-dextran 4kDa (C.) measured in mice receiving during 12 weeks standard diet (SD) or high fat diet (HFD) and submitted to water avoidance stress (WAS) or not (c). Colonic samples were obtained and placed in Ussing chambers or immediately frozen. Serosal side concentrations of FITC-dextran 4kDa of colonic samples placed in Ussing chambers (D.), colonic occludin expression (E.) and IL-1 β mRNA level (F.) in mice receiving during 12 weeks SD or HFD and submitted to WAS or not. Values without a common letter significantly differ, $p < 0.05$.

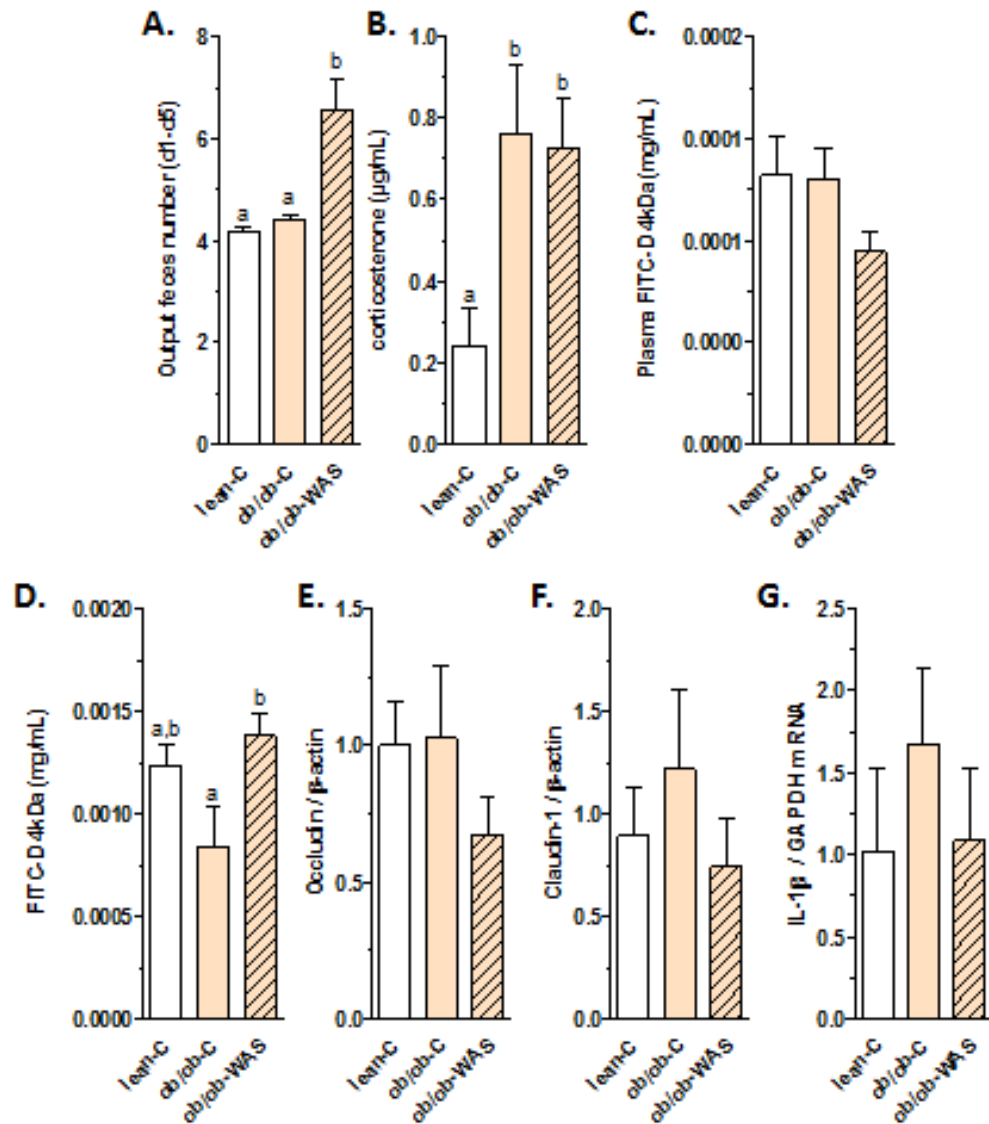


Figure 3: Response to water avoidance stress in mice with genetic obesity. Output feces number (A.), plasma corticosterone (B.) and plasma FITC-dextran 4kDa (C.) measured in lean and ob/ob mice submitted to water avoidance stress (WAS) or not (c). Colonic samples were obtained and placed in Ussing chambers or immediately frozen. Serosal side concentrations of FITC-dextran 4kDa of colonic samples placed in Ussing chambers (D.), colonic occludin (E.) and claudin-1 expression (F.) and IL-1 β mRNA level (G.) in lean and ob/ob mice submitted to WAS or not. Values without a common letter significantly differ, $p < 0.05$.

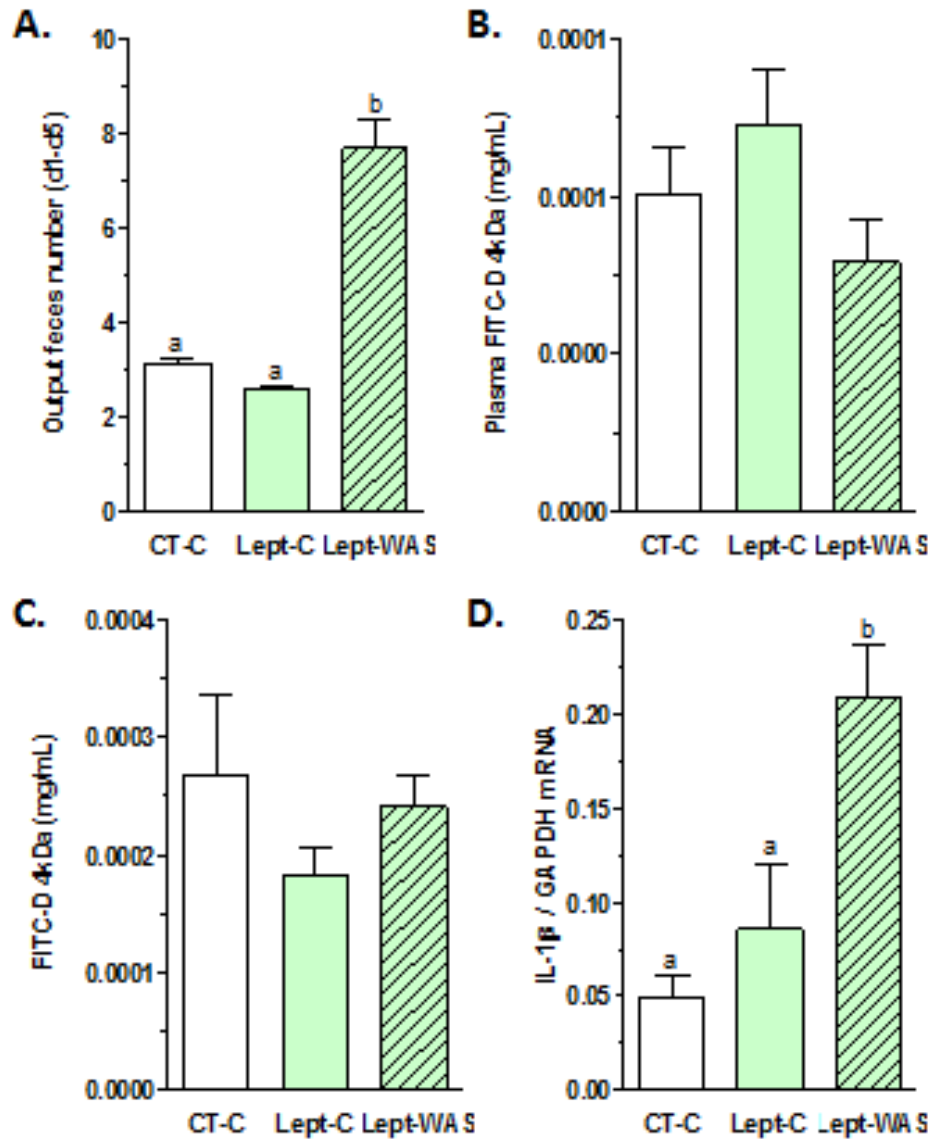


Figure 4: Response to water avoidance stress in mice receiving leptin injections. Output feces number (A.) and plasma FITC-dextran 4kDa (B.) measured in mice receiving during 20 days i.p. injections of vehicle (CT) or leptin (Lept) and submitted to water avoidance stress (WAS) or not (c). Colonic samples were obtained and placed in Ussing chambers or immediately frozen. Serosal side concentrations of FITC-dextran 4kDa of colonic samples placed in Ussing chambers (C.) and colonic IL-1 β mRNA level (E.) in vehicle or leptin treated mice submitted to WAS or not. Values without a common letter significantly differ, $p < 0.05$.

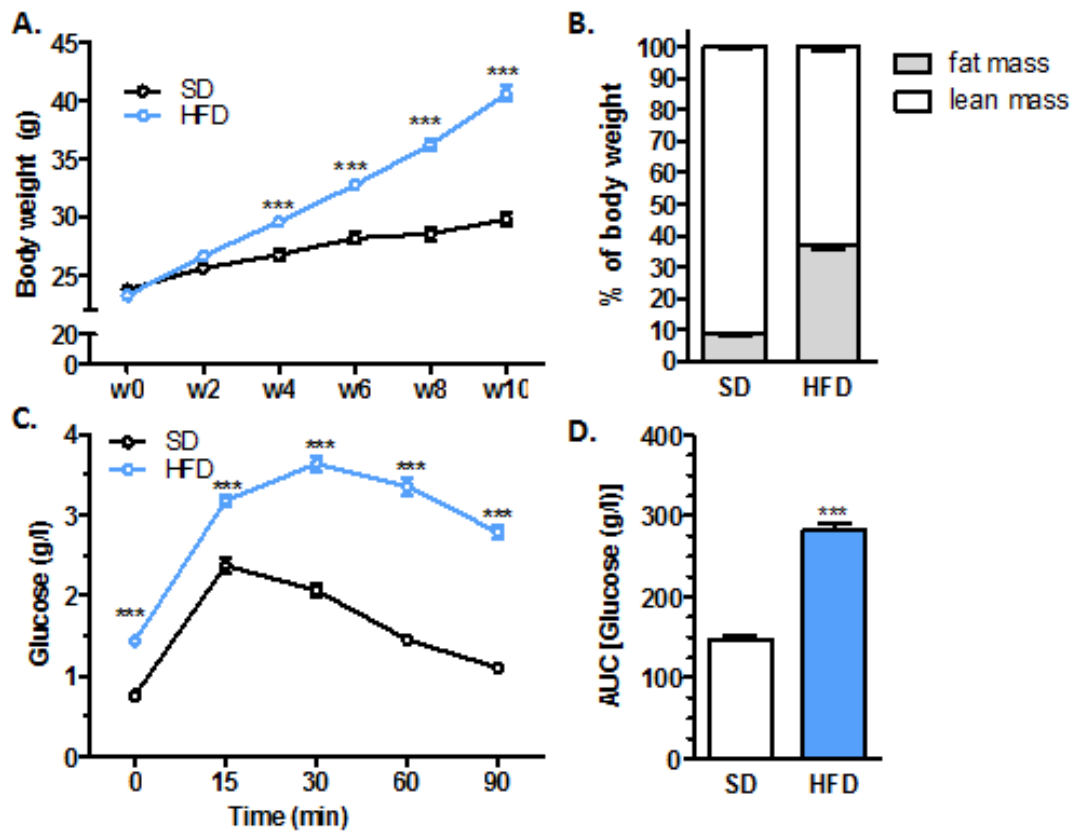


Figure 5: Body weight, body composition and glucose tolerance in diet-induced obese mice. Body weight (A.) and body composition (B.) in mice receiving standard diet (SD) or high fat diet (HFD) during 10 weeks. Glycaemia (C.) and area under the curve of glycaemia (D.) in response to i.p. glucose tolerance test in mice receiving SD or HFD. ***, $p < 0.001$ vs SD.

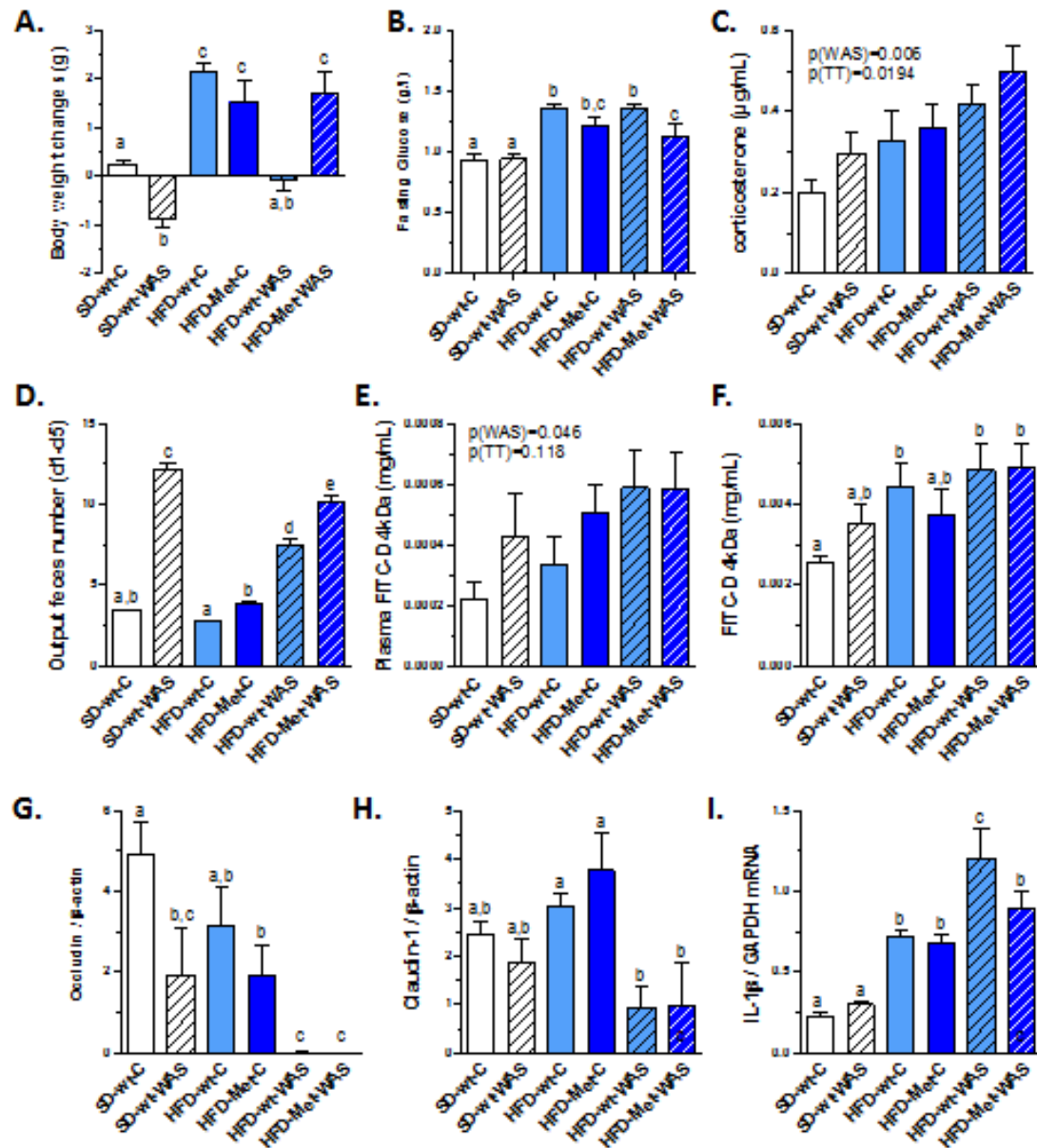


Figure 6: Response to water avoidance stress in diet-induced obese mice receiving metformin injections. Body weight changes (A.), fasting glycaemia (B.), plasma corticosterone (C.), output feces number (D.) and plasma FITC-dextran 4kDa (E.) measured in mice receiving standard diet (SD) or high fat diet (HFD) during 12 weeks, receiving drinking water alone (wt) or with metformin (Met) and submitted to water avoidance stress (WAS) or not (c). Colonic samples were obtained and placed in Ussing chambers or immediately frozen. Serosal side concentrations of FITC-dextran 4kDa of colonic samples placed in Ussing chambers (F.), colonic occludin (G.) and claudin-1 expression (H.) and IL-1 β mRNA level (I.) in mice receiving SD or HFD during 12 weeks, receiving or not Met and submitted or not to WAS. Values without a common letter significantly differ, $p < 0.05$.

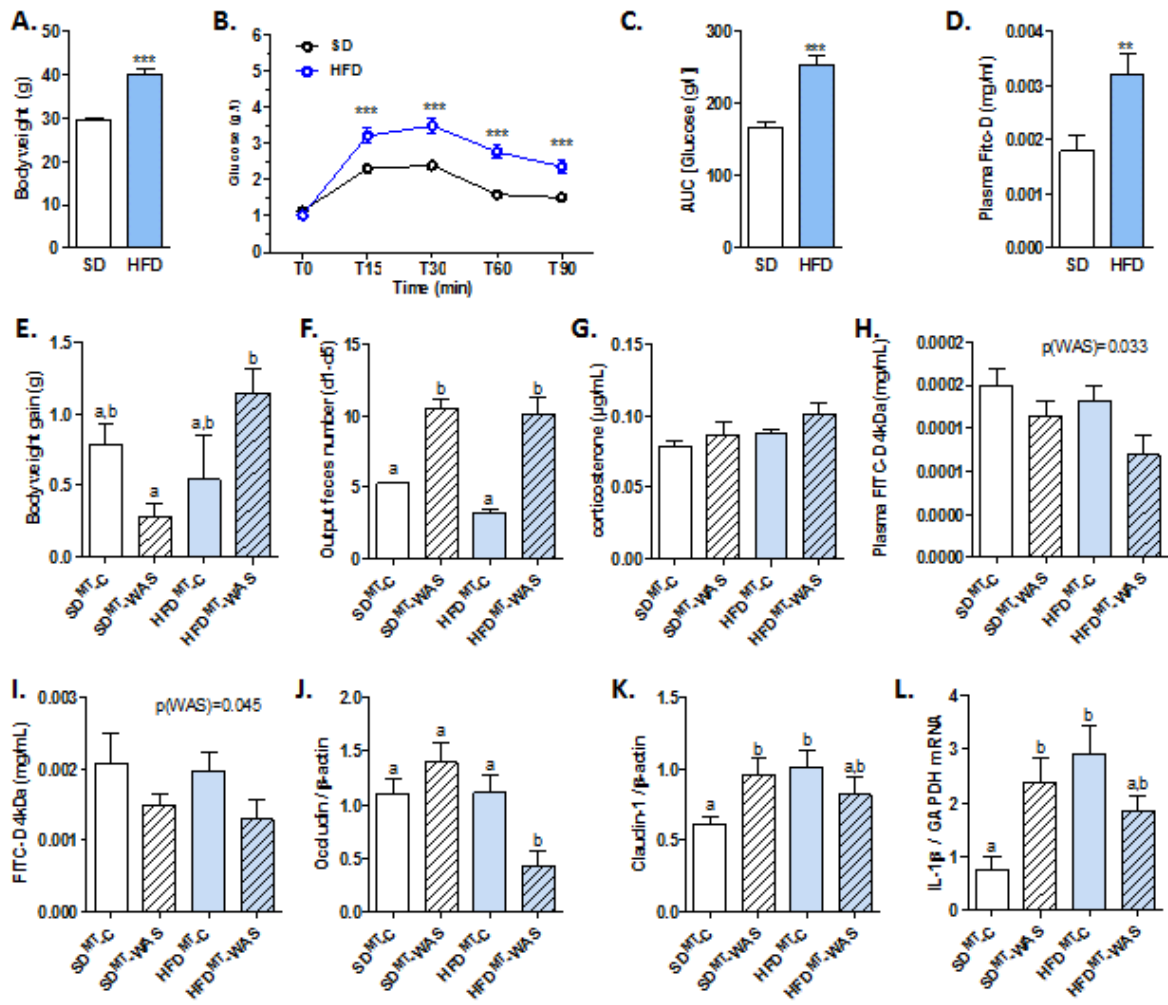


Figure 7: Response to water avoidance stress in mice receiving cecal microbiota from diet-induced obese mice. Body weight (A.), glucose tolerance test (B., C.) and plasma FITC-dextran 4 kDa in mice receiving standard diet (SD) or high fat diet (HFD) during 12 weeks. Body weight changes (E.), output feces number (F.), plasma corticosterone (G.), and plasma FITC-dextran 4kDa (H.) measured in mice receiving cecal microbiota from SD (SD^{MT}) or HFD (HFD^{MT}) mice and then submitted to water avoidance stress (WAS) or not (c). Colonic samples were obtained and placed in Ussing chambers or immediately frozen. Serosal side concentrations of FITC-dextran 4kDa of colonic samples placed in Ussing chambers (I.), colonic occludin (J.) and claudin-1 expression (K.) and IL-1β mRNA level (L.) in SD^{MT} and HFD^{MT} mice submitted or not to WAS. (A-D) **, p<0.01; ***, p<0.001 vs SD. (E-L) values without a common letter significantly differ, p<0.05.

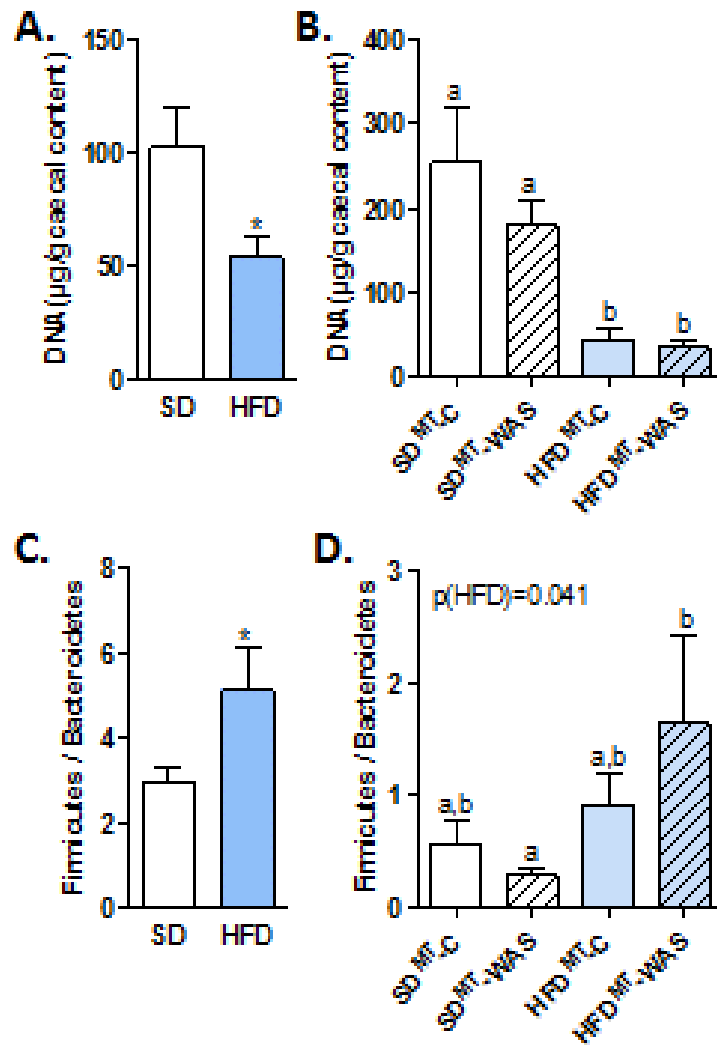


Figure 8: Cecal DNA content and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in mice receiving cecal microbiota from diet-induced obese mice. Donor mice receiving either standard diet (SD) or high fat diet (HFD) during 12 weeks. Recipient mice (SD^{MT} and HFD^{MT}) received, respectively, cecal microbiota from SD or HFD donor mice and were then submitted to water avoidance stress (WAS) or not (c). Cecal DNA content measured in donor (A.) and recipient mice (B.). Firmicutes/Bacteroidetes ratio measured in cecal content from donor (C.) and recipient (D.) mice. (A, C) *, $p < 0.05$ vs SD. (B, D) values without a common letter significantly differ, $p < 0.05$.

DISCUSSION GENERALE **ET PERSPECTIVES**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce projet de recherche s'intéresse au rôle de la barrière intestinale dans la physiopathologie des maladies présentant des troubles gastro-intestinaux. Parmi ces maladies, nous nous sommes focalisés sur le SII ainsi qu'au lien entre l'obésité et le SII qui constitue aujourd'hui un sujet de recherche en pleine expansion et qui fait l'intérêt de plusieurs études récemment publiées.

Dans la première étude, nous avons évalué la perméabilité intestinale dans deux modèles « SII-Like » mimant les symptômes retrouvés chez les sujets SII, puis le rôle du protéasome dans la régulation de la fonction de barrière intestinale dans ces deux modèles. Les modèles utilisés représentent deux aspect différents de la physiopathologie du SII : d'abord le SII-post inflammatoire représenté par le modèle post-TNBS qui a permis de reproduire les symptômes « SII-Like » présents chez les patients atteints de MICI lors des phases de rémission (334) ; puis le modèle WAS qui nous a permis d'évaluer l'effet du stress sur la fonction de barrière intestinale (335).

Par cette étude, nous avons pu valider les deux modèles SII-Like dans un premier temps puis montrer une augmentation de la perméabilité intestinale dans les deux modèles. Les résultats de cette étude ont également pu mettre en évidence des altérations de l'activité et de la composition du protéasome. En effet, une augmentation de l'activité trypsine-like et du ratio $\beta 2i / \beta 2$ était retrouvée dans les deux modèles WAS et post-TNBS. Ces altérations semblent similaires à celles précédemment décrites, dans une étude réalisée par notre laboratoire, au niveau de la muqueuse colique de patients SII (336). De plus, comme dans le type de SII-post inflammatoire, une activation de l'activité chymotrypsine-like a été décrite chez les patients MICI en rémission (111). Ces altérations au niveau du protéasome semblent être corrélées à une augmentation de la perméabilité intestinale démontrée par une diminution de l'expression de l'occludine au niveau colique. Penser à l'inhibition du protéasome était donc une éventuelle solution afin de limiter l'hyperperméabilité intestinale qui semble être dépendante du protéasome. Nous avons pu montrer par la suite, qu'une inhibition pharmacologique sélective de l'immunoprotéasome diminuait l'hyperperméabilité intestinale dans les deux modèles SII-Like, avec une restauration de l'expression de l'occludine. De façon similaire, l'inhibition génétique par l'utilisation de souris invalidées pour le gène codant la sous-unité $\beta 2i$ du protéasome ($\beta 2i^{-/-}$), a appuyé le rôle du protéasome dans la régulation de la perméabilité intestinale dans le modèle WAS. L'expression de l'occludine a également été restaurée chez la

souris ($\beta 2i^{-/-}$). En effet, au niveau de la muqueuse colique de patients SII, une étude réalisée par notre laboratoire a décrit une augmentation de la dégradation de l'occludine qui était dépendante du protéasome (336).

Pour mieux comprendre le rôle du protéasome dans la physiopathologie du SII, nous avons décidé donc de comparer le protéome colique de souris ($\beta 2i^{-/-}$) à celui des souris sauvages en réponse au WAS, ce qui pourrait permettre d'identifier les voies régulées par le protéasome au cours du SII. Dans cette étude, nous avons pu montrer une altération du protéome colique chez les souris stressées (WAS), principalement les protéines du système ubiquitine-protéasome impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondriale ainsi que dans la voie de signalisation NF- κ B. Nous avons également pu montrer que l'utilisation des souris ($\beta 2i^{-/-}$) modifie le profil du protéome au stress en augmentant l'expression d'une enzyme de débubiquitination nommée UCH-L3 qui semble être impliquée dans la réponse inflammatoire. En effet, la surexpression de UCH-L3 inhibe l'activité du complexe de l'ubiquitine ligase cellulaire SCF β – TrCP E3. Cette dernière induit l'ubiquitination et la dégradation de substrats phosphorylés, dont I- κ B, l'inhibiteur du NF- κ B (337). Fait intéressant, l'ubiquitome des patients SII semble être altéré. Effectivement, une diminution de plusieurs protéines ubiquitinées impliquées dans la voie de signalisation NF- κ B est décrite par notre étude. En outre, les souris ($\beta 2i^{-/-}$) présentent également une diminution de la protéine GDH1, une enzyme impliquée dans le métabolisme énergétique de la mitochondrie particulièrement dans la néoglucogénèse assurant la conversion de la glutamine en glutamate. Il a été démontré par différentes études, dans des conditions expérimentales inflammatoires, une amélioration de la fonction de barrière intestinale (338), une régulation du système ubiquitine-protéasome (339) et une restauration de l'expression des protéines de JS du côlon (222) à la suite d'une supplémentation en glutamine.

En effet, dans les deux études présentées, nous avons évalué l'effet de la glutamine sur la fonction de barrière intestinale et l'inflammation intestinale. Une supplémentation en glutamine chez la souris a permis de limiter l'hyperperméabilité intestinale dans les deux modèles « SII-Like », probablement en restaurant l'expression de l'occludine, ce qui corrobore des données préalablement publiées (338). L'inflammation intestinale était diminuée et une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires était observée. Zhou et al, ont récemment montré qu'une réduction de la glutamine synthase au niveau du colon des patients SII-D peut conduire à une diminution de l'expression de la claudine-1 et par conséquent une augmentation de la perméabilité intestinale (221). De plus, lors d'une étude réalisée dans notre

laboratoire, il a été démontré, *ex vivo*, qu'une supplémentation en glutamine permettait d'augmenter l'expression de la claudine-1 au niveau de la muqueuse colique de patients SII-D (222). Ces travaux sont en accord avec une étude clinique randomisée récente montrant les effets bénéfiques d'une supplémentation en glutamine par voie orale pendant 8 semaines chez les patients SII (340). La glutamine semble donc jouer un rôle important au niveau intestinal, cependant, les mécanismes d'action restent à élucider.

Par conséquent, les souris exposées au WAS représentent bien un bon modèle SII-Like, avec une augmentation de la motricité colique, une inflammation de bas grade ainsi qu'une hyperperméabilité intestinale qui ont été retrouvées au niveau colique. Des TFI qui semblent être les conséquences de la perturbation de la barrière intestinale.

Dernièrement, une augmentation des TFI a été également révélée chez des patients obèses de grade III. En effet, l'obésité aujourd'hui n'est plus qu'une conséquence à l'augmentation de la prise alimentaire mais s'avère d'une physiopathologie complexe et multifactorielle et implique la réponse intestinale. Une association entre l'obésité et le SII qui semble significative, a été soutenue par plusieurs études (341,342). D'autres études ont échoué à montrer cette association (343). De plus, il a été montré par différentes études une prévalence du SII de 18% chez les patients obèses candidats à la chirurgie bariatrique (augmentation marquée chez les femmes: 24% pour les femmes / 12% pour les hommes (344) voire 30% dans une autre étude (231), une prévalence très élevée par rapport à celle chez les sujets non obèses qui est évaluée à 4,7% (345). Différents mécanismes pourront être impliqués dans l'augmentation de la prévalence du SII chez les patients obèses dont les facteurs psychosociaux tels que le stress impliquant des troubles psychologiques, le régime alimentaire, la dysbiose ou encore l'inflammation.

La perméabilité intestinale a fait l'objet de recherche de plusieurs études y compris dans l'obésité et le syndrome de l'intestin irritable. En effet, dans notre dernière étude, notre modèle animal d'obésité induite par une HFD montre, en réponse au WAS, une hyperperméabilité intestinale exacerbée, qui était associée à une augmentation de la corticostérone plasmatique. L'expression de l'occludine était également diminuée chez les souris WAS-non-obèses, obèses et WAS-obèses. Fait intéressant, il a été démontré dans plusieurs études dans le cas d'une obésité ou d'un SII, une augmentation de la perméabilité intestinale. Dans des études précédentes, nous avons montré une diminution significative de

l'expression de l'occludine dans les biopsies coliques de patients SII-obèses comparés aux patients SII-non obèses (346). Pour appuyer ces résultats, nous avons ensuite cherché à étudier la réponse des souris génétiquement obèses (ob/ob) au WAS. Le modèle d'obésité génétique n'a pas reproduit les résultats observés chez les souris HFD. Si les données de l'hyperperméabilité intestinale sont concordantes chez les rongeurs nourris avec une HFD, celles concernant les souris génétiquement obèses restent contradictoires. Certaines d'entre elles montrent une hyperperméabilité intestinale chez les souris ob/ob (347). Cependant, d'autres études ne montrent pas de différence dans la perméabilité intestinale entre les souris ob/ob et leurs contrôles de même fond génétique (348). Il faut savoir que nos deux modèles d'obésité présentaient une augmentation du poids corporel et de la masse grasse. Ils présentaient également une augmentation de la glycémie qui était plus marquée chez les souris HFD. Nous avons donc pensé à 3 facteurs pouvant influencer sur la perméabilité intestinale dans l'obésité associée au stress : la leptine, la glycémie, ou le microbiote intestinal.

Nous savons d'ores et déjà que les sujets obèses présentent un taux élevé de la leptine au niveau plasmatique alors que les souris ob/ob sont déficientes pour le gène de la leptine. Ces données en plus de nos résultats, nous ont mené à étudier le rôle de la leptine dans la régulation de la perméabilité intestinale. Il faut savoir que les données sur l'effet de la leptine sur la barrière intestinale sont controversées. Certaines études démontrent que la leptine est capable de modifier la structure épithéliale. En effet, la paroi cellulaire épithéliale exposée à la leptine présente une anomalie structurelle (349). De plus, il a été démontré, *in vitro*, que le traitement des cellules Caco-2 par la leptine entraînait une altération des JS et par conséquent une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Cet effet de la leptine semble être médié par l'activation de la voie de signalisation JAK2 / STAT3, dépendante du récepteur de la leptine, impliquant une cascade de signalisation telles que PI3K / Akt / ERK1 / 2 (350). Dans une autre étude, la leptine apicale semble diminuer les taux d'expression des gènes codant pour les protéines de JS, telles que la ZO-3, la Claudine-5 et l'occludine, et augmenter l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et le TNF- α (350). En revanche, d'autres études *in vivo*, montre un effet anti-inflammatoire après traitement à la leptine, ainsi qu'une amélioration de la fonction de barrière intestinale (351). Le Dréan et al, propose que la leptine pourrait avoir des effets différents sur la perméabilité intestinale, selon la liaison à son récepteur du côté épithélial apical ou basal (352). Néanmoins, dans notre étude, l'injection de la leptine n'a pas reproduit l'hyperperméabilité intestinale retrouvée chez les souris HFD stressées. Ces données

suggèrent que la voie de la leptine ne semble pas être impliquée dans la réponse au stress des souris HFD.

En outre, notre modèle de souris HFD présentait une intolérance au glucose mais aussi une glycémie à jeun élevée, raison pour laquelle nous nous sommes focalisés sur le rôle de la glycémie dans la régulation de la fonction de barrière intestinale. En effet, l'hyperglycémie retrouvée dans des modèles murins d'obésité et de diabète, semble déterminer la perméabilité de la barrière intestinale, par la reprogrammation transcriptionnelle dépendante de GLUT2 des cellules épithéliales intestinales et par la modification de l'intégrité des JS (353). En effet, l'hyperglycémie provoque un transport rétrograde du glucose dans les cellules épithéliales intestinales *via* GLUT2, suivi d'une altération du métabolisme du glucose intracellulaire. Ce phénomène implique la N-glycosylation de protéines dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, une voie considérée comme régulateur clé d'une multitude de fonctions épithéliales (354). Le traitement de l'hyperglycémie, par la suppression de GLUT2 spécifique de l'épithélium intestinal ou de l'inhibition du métabolisme du glucose, rétablit la fonction de barrière intestinale. Des données récentes ont souligné que la metformine, un antidiabétique, réduisait la perméabilité paracellulaire épithéliale dans les cellules Caco-2 (355) ou *in vivo* au cours de modèles inflammatoires (356,357) et de stress (358,359). Dans notre étude, le traitement de l'hyperglycémie par la metformine, a partiellement restauré la glycémie à jeun et la perméabilité colique chez des souris HFD non stressées mais n'a pas réussi à améliorer la perméabilité intestinale chez des souris HFD stressées. Ces données suggèrent que le stress et l'obésité d'origine alimentaire peuvent interagir, limitant ainsi les effets de la metformine.

Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle du microbiote intestinal. Il a été démontré dans plusieurs études une dysbiose intestinale au cours de l'obésité et du SII. En effet, la dysbiose peut entraîner une perturbation de la barrière épithéliale (360). D'après Nagpal et al, il existe un lien étroit entre la dysbiose et l'obésité, qui provoque des perturbations dans l'homéostasie du turnover cellulaire intestinal et des fonctions régulatrices de la perméabilité intestinale (361). Dans une autre étude, il a été démontré que le gavage oral de lait contenant du *Lactobacillus plantarum* augmentait l'expression des protéines de JS, diminuant ainsi la perméabilité de l'intestin grêle dans un modèle expérimental de MICI (362). De plus, au cours du SII, l'intervention par les probiotiques semble normaliser la motricité intestinale, améliorer la fonction de barrière intestinale, réduire les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires et améliorer l'hypersensibilité viscérale (194). Ces modèles animaux supplémentés avec des

probiotiques et évalués pour la perméabilité intestinale ont permis de confirmer le potentiel du microbiote à interférer avec la fonction de barrière intestinale. Dans notre étude, les souris HFD présentaient une dysbiose intestinale évaluée au niveau du contenu caecal. Cette dysbiose était évaluée par une augmentation du ratio *Firmicutes* / *Bactéroides*. Ce profil du microbiote intestinal a déjà été démontré chez les obèses (251,363). Afin d'évaluer le rôle du microbiote intestinal dans la régulation de la perméabilité intestinale, nous avons réalisé une transplantation du contenu caecal des souris HFD chez des souris receveuses C57Bl/6 déplétés à 99% de leur propre microbiote intestinal après traitement par un cocktail d'antibiotiques. Les souris receveuses ont ensuite été exposées au WAS. Il a été démontré précédemment que la transplantation du microbiote fécal de souris ob/ob et de souris obèses induites par différents régimes, provoque l'obésité chez les souris receveuses, ce qui conforte l'idée que le microbiote intestinal reproduit le même phénotype, dans cette étude voire l'obésité (364). En effet, dans notre étude les souris receveuses présentent également une augmentation du ratio *Firmicutes* / *Bactéroides* retrouvée chez les souris HFD donneuses, ce qui laisse penser à la réussite de la greffe du microbiote intestinal. Il est intéressant de noter que les taux de prévalence de la dysbiose ont été évalués, dans une étude chez des patients SII atteints ou non d'obésité massive. Les auteurs ont rapporté des taux plus élevés de dysbiose dans les groupes souffrant d'obésité massive, quelle que soit la présence ou non du SII (365). Néanmoins, notre modèle n'a pas reproduit l'hyperperméabilité retrouvée chez les souris HFD stressées.

Notre étude montre quelques limites. En effet, nous n'avons pas été en mesure de déterminer les mécanismes exacts impliqués dans l'exacerbation de la perméabilité intestinale survenant chez des souris HFD stressées. La voie de la leptine et la glycémie ne semblent pas être impliquées. Cependant, des effets dose-dépendants et la voie d'administration de la leptine et de la metformine peuvent expliquer l'absence d'effets spécifiques sur la perméabilité intestinale, même si les traitements à la leptine et à la metformine ont été confirmés, respectivement, par des modifications de l'IL-1 β colique et de la glycémie. De plus, nos données devront être confirmées en utilisant d'autres approches, comme des souris axéniques. Enfin, dans la présente étude, en raison du régime alimentaire riche en graisses, la procédure WAS a été réalisée chez des souris âgées de 5 mois. Nous ne pouvons pas exclure que la réponse au WAS puisse être différente de celle des souris plus jeunes (366,367). En effet, des études précédentes évaluant le lien entre l'obésité et le SII, ont échoué à montrer une association expliquant ces résultats négatifs par le fait que les sujets obèses étudiés étaient très jeunes (343), supposant une apparition du SII chez les personnes obèses généralement d'un âge moyen,

probablement parce que des altérations intestinales ne se développent qu'après plusieurs années d'obésité (343). Selon une autre étude réalisée dans une population pédiatrique, l'âge ne semble pas être un facteur impliqué dans cette association. Ils montrent une augmentation de la prévalence du SII chez les enfants obèses comparés aux sujets d'un poids normal (368). Finalement l'effet de l'âge dans les altérations intestinales restent mitigées.

Dans notre étude, nous avons pu montrer l'implication du protéasome dans le dysfonctionnement de la barrière intestinale au cours du SII. Il semble être également impliqué dans la pathogénèse de l'obésité. En effet, il a été démontré des altérations dans la fonction du protéasome dans l'obésité, au niveau hépatique mais également dans une autre étude au niveau des adipocytes, conduisant au développement de l'insulino-résistance et de la stéatose hépatique (369,370). Il a également été montré qu'un taux faible de l'ubiquitine au niveau plasmatique était associé à une augmentation du TNF- α dans le sang au cours de l'obésité (371). Ignacio-Souza et al, montrent qu'un dysfonctionnement du protéasome au niveau de l'hypothalamus des souris HFD conduit à l'accumulation d'agrégats protéiques, probablement impliquées dans la régulation de l'appétit, et par conséquent accélère la prise alimentaire et le gain de poids (372). De plus, il a été suggéré que les inhibiteurs du protéasome pourraient s'avérer utiles pour les patients diabétiques en améliorant à la fois la fonction des cellules β et en diminuant la résistance à l'insuline (373). Toutes ces études montrent une implication du protéasome dans l'obésité et les complications métaboliques associées. Néanmoins son implication au niveau intestinal au cours de l'obésité n'a pas encore été étudiée.

Enfin, les effets sur la sensibilité viscérale devront être évalués dans de projets futurs. En effet, la sensibilité viscérale est un symptôme important dans la physiopathologie du SII, qui semble être également révélé chez les patients avec une obésité massive. Il semble donc important d'étudier la sensibilité viscérale dans les modèles SII-Like et les modèles d'obésité induite par des régimes.

En perspectives, le stress induit un dysfonctionnement de la barrière intestinale plus marqué chez les souris obèses induites par un régime, comparé aux souris non obèses, qui semble indépendant de la leptine, de la glycémie et du microbiote intestinal. Le dysfonctionnement de la barrière intestinale exacerbé peut contribuer à l'augmentation de la

prévalence du SII chez les patients souffrant d'obésité massive. Ces données devraient être confirmées et le rôle de la composition du régime alimentaire devrait également être étudié.

En effet, le régime alimentaire est un important facteur du remaniment du microbiome intestinal. Par exemple, une alimentation riche en graisses (HFD) développe une dysbiose parallèlement à des anomalies systémiques dans le métabolisme de l'hôte, entraînant l'obésité et le diabète de type 2 (374). De plus, le traitement des rats avec des antibiotiques, ayant suivi un régime riche en graisses, semble avoir altéré le microbiote et réduit les endotoxines et la perméabilité intestinale, ce qui a permis de conclure que le régime alimentaire module les bactéries intestinales, qui à leur tour, participe au contrôle de la perméabilité intestinale et à la survenue d'endotoxémie métabolique (Cani et al., 2008). Il a récemment été suggéré qu'une alimentation riche en lipide modifie directement l'intégrité de la barrière intestinale en interagissant avec les CEI (375). De plus, des études précédemment publiées montrent une exacerbation de la colite expérimentale dans des modèles murins alimentaires et génétiques de MICI, favorisée par la consommation d'une alimentation riche en graisses (376,377). Les graisses alimentaires ont été au centre des recherches sur la régulation de la barrière intestinale en raison de son caractère omniprésent, en particulier dans les pays occidentaux. En effet, chez l'Homme, une alimentation à l'occidentale est associée à un risque accru de développer une MICI, une maladie caractérisée par une hyperperméabilité intestinale (4,378).

L'ensemble de ces études montre un rôle essentiel des graisses alimentaires dans la pathogenèse des maladies intestinales, d'où la nécessité de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la perméabilité intestinale à médiation par les graisses alimentaires.

Enfin, par l'ensemble de ces travaux, nous avons pu montrer une augmentation de la perméabilité intestinale dans les deux modèles « SII-Like », WAS et post-TNBS, des altérations du protéasome et du protéome colique, impliquant ainsi un éventuel rôle du protéasome dans la dégradation des protéines de JS ou bien encore des protéines inhibitrices de la voie inflammatoire. L'inhibition du protéasome et/ou l'utilisation de la glutamine comme substrat, semble limiter l'hyperperméabilité colique et modifie le profil protéique colique dans le modèle « SII-Like ». En outre, notre étude montre une hyperperméabilité exacerbée chez le modèle d'obésité induite par HFD, en réponse au WAS, indépendamment de la voie de la leptine, de la glycémie et du microbiote intestinal. Ces travaux ouvrent donc de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à rétablir la fonction de barrière intestinale, soit en ciblant le protéasome soit par une approche nutritionnelle en utilisant la glutamine. En effet, une étude récemment publiée, montre dans l'obésité chez l'Homme et l'animal, qu'une supplémentation en glutamine

peut induire des modifications du microbiote intestinal et de la perméabilité intestinale, réduisant ainsi le taux de LPS circulants, ce qui contribue à diminuer l'insulino-résistance (379). En revanche, l'implication du protéasome au niveau intestinal dans l'obésité n'a pas encore été étudiée et devrait faire l'objet d'études futures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **ET ANNEXES**

REFERENCES

1. Swiatecka D, Mackie A. The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models. S.L.: Springer; 2015.
2. Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res*. 2011 Nov 15;317(19):2702–10.
3. Cox HM. Neuroendocrine peptide mechanisms controlling intestinal epithelial function. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;31:50–6.
4. Michielan A, D'Incà R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:628157.
5. Camilleri M, Gorman H. Intestinal permeability and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*. 2007 Jul;19(7):545–52.
6. Yen T-H, Wright NA. The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Rev*. 2006;2(3):203–12.
7. Bullen TF, Forrest S, Campbell F, Dodson AR, Hershman MJ, Pritchard DM, et al. Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab Invest*. 2006 Oct;86(10):1052–63.
8. Watson AJM, Chu S, Sieck L, Gerasimenko O, Bullen T, Campbell F, et al. Epithelial barrier function in vivo is sustained despite gaps in epithelial layers. *Gastroenterology*. 2005 Sep;129(3):902–12.
9. Hsiao J-K, Huang C-Y, Lu Y-Z, Yang C-Y, Yu LC-H. Magnetic resonance imaging detects intestinal barrier dysfunction in a rat model of acute mesenteric ischemia/reperfusion injury. *Invest Radiol*. 2009 Jun;44(6):329–35.
10. Huang C-Y, Hsiao J-K, Lu Y-Z, Lee T-C, Yu LC-H. Anti-apoptotic PI3K/Akt signaling by sodium/glucose transporter 1 reduces epithelial barrier damage and bacterial translocation in intestinal ischemia. *Lab Invest*. 2011 Feb;91(2):294–309.
11. Omatsu T, Naito Y, Handa O, Hayashi N, Mizushima K, Qin Y, et al. Involvement of reactive oxygen species in indomethacin-induced apoptosis of small intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol*. 2009;44 Suppl 19:30–4.
12. Redlak MJ, Power JJ, Miller TA. Prevention of deoxycholate-induced gastric apoptosis by aspirin: roles of NF-kappaB and PKC signaling. *J Surg Res*. 2008 Mar;145(1):66–73.
13. Oumouna-Benachour K, Oumouna M, Zerfaoui M, Hans C, Fallon K, Boulares AH. Intrinsic resistance to apoptosis of colon epithelial cells is a potential determining factor in the susceptibility of the A/J mouse strain to dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis. *Mol Carcinog*. 2007 Dec;46(12):993–1002.
14. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Sep;11(9):821–34.

15. Macfarlane S, Woodmansey EJ, Macfarlane GT. Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Nov;71(11):7483–92.
16. Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev.* 2014 Jul;260(1):8–20.
17. Jakobsson HE, Rodríguez-Piñeiro AM, Schütte A, Ermund A, Boysen P, Bemark M, et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep.* 2015 Feb;16(2):164–77.
18. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 May 28;110(22):9066–71.
19. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Jul;124(1):3–20; quiz 21–2.
20. Kiso-Singh V, Moreau F, Trusevych E, Chadee K. *Entamoeba histolytica* exacerbates epithelial tight junction permeability and proinflammatory responses in Muc2(-/-) mice. *Am J Pathol.* 2013 Mar;182(3):852–65.
21. Hino S, Takemura N, Sonoyama K, Morita A, Kawagishi H, Aoe S, et al. Small intestinal goblet cell proliferation induced by ingestion of soluble and insoluble dietary fiber is characterized by an increase in sialylated mucins in rats. *J Nutr.* 2012 Aug;142(8):1429–36.
22. Faure M, Moënnos D, Montigon F, Mettraux C, Mercier S, Schiffrin EJ, et al. Mucin production and composition is altered in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2003 Jul;48(7):1366–73.
23. Faure M, Mettraux C, Moënnos D, Godin J-P, Vuichoud J, Rochat F, et al. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. *J Nutr.* 2006 Jun;136(6):1558–64.
24. Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr.* 2011 May;141(5):769–76.
25. Li H, Shi B. Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation. *Cell Mol Immunol.* 2015 Jan;12(1):24–30.
26. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Feb 1;70(4):631–59.
27. Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Aug;1(2):a002584.
28. Choi W, Yeruva S, Turner JR. Contributions of intestinal epithelial barriers to health and disease. *Exp Cell Res.* 2017 Sep 1;358(1):71–7.

29. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol.* 1986 Sep;103(3):755–66.
30. Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res.* 2015 Jan;13(1):11–8.
31. Tsukita S, Katsuno T, Yamazaki Y, Umeda K, Tamura A, Tsukita S. Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 May;1165:44–52.
32. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777–88.
33. Odenwald MA, Choi W, Buckley A, Shashikanth N, Joseph NE, Wang Y, et al. ZO-1 interactions with F-actin and occludin direct epithelial polarization and single lumen specification in 3D culture. *J Cell Sci.* 2017 01;130(1):243–59.
34. Murakami T, Felinski EA, Antonetti DA. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem.* 2009 Jul 31;284(31):21036–46.
35. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell.* 2000 Dec;11(12):4131–42.
36. McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, et al. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci.* 1996 Sep;109 (Pt 9):2287–98.
37. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 1998 Jun 29;141(7):1539–50.
38. Liu F, Koval M, Ranganathan S, Fanayan S, Hancock WS, Lundberg EK, et al. Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. *J Proteome Res.* 2016 Feb 5;15(2):339–59.
39. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 2013 Apr;93(2):525–69.
40. Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, Anderson JM. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns.* 2006 Aug;6(6):581–8.
41. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002 Mar 18;156(6):1099–111.
42. Tamura A, Hayashi H, Imasato M, Yamazaki Y, Hagiwara A, Wada M, et al. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology.* 2011 Mar;140(3):913–23.

43. Martínez C, González-Castro A, Vicario M, Santos J. Cellular and molecular basis of intestinal barrier dysfunction in the irritable bowel syndrome. *Gut Liver*. 2012 Jul;6(3):305–15.
44. Rigor RR, Shen Q, Pivetti CD, Wu MH, Yuan SY. Myosin light chain kinase signaling in endothelial barrier dysfunction. *Med Res Rev*. 2013 Sep;33(5):911–33.
45. Borchardt RT, Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T.: Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology*, 96, 736-749, 1989--the backstory. *AAPS J*. 2011 Sep;13(3):323–7.
46. Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci*. 1990 Jun;79(6):476–82.
47. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*. 1951 Aug 25;23(2–3):110–27.
48. Meddings JB, Gibbons I. Discrimination of site-specific alterations in gastrointestinal permeability in the rat. *Gastroenterology*. 1998 Jan;114(1):83–92.
49. Travis S, Menzies I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clin Sci*. 1992 May;82(5):471–88.
50. Stephens RH, O'Neill CA, Warhurst A, Carlson GL, Rowland M, Warhurst G. Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Feb;296(2):584–91.
51. Clark SL. The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice. *J Biophys Biochem Cytol*. 1959 Jan 25;5(1):41–50.
52. Haines RJ, Beard RS, Eitner RA, Chen L, Wu MH. TNF α /IFN γ Mediated Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction Is Attenuated by MicroRNA-93 Downregulation of PTK6 in Mouse Colonic Epithelial Cells. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0154351.
53. Mao J-W, Tang H-Y, Zhao T, Tan X-Y, Bi J, Wang B-Y, et al. Intestinal mucosal barrier dysfunction participates in the progress of nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(4):3648–58.
54. Zünd G, Madara JL, Dzusz AL, Awtrey CS, Colgan SP. Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion. *J Biol Chem*. 1996 Mar 29;271(13):7460–4.
55. Wisner DM, Harris LR, Green CL, Poritz LS. Opposing regulation of the tight junction protein claudin-2 by interferon-gamma and interleukin-4. *J Surg Res*. 2008 Jan;144(1):1–7.
56. Ye D, Guo S, Al-Sadi R, Ma TY. MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology*. 2011 Oct;141(4):1323–33.
57. Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A, et al. Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008 Jul;135(1):173–84.
58. Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*. 1995 Jun 8;375(6531):500–3.

59. Nayak G, Lee SI, Yousaf R, Edelmann SE, Trincot C, Van Itallie CM, et al. Tricellulin deficiency affects tight junction architecture and cochlear hair cells. *J Clin Invest*. 2013 Sep;123(9):4036–49.
60. Sambrotta M, Strautnieks S, Papouli E, Rushton P, Clark BE, Parry DA, et al. Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. *Nat Genet*. 2014 Apr;46(4):326–8.
61. Adams RB, Planchon SM, Roche JK. IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J Immunol*. 1993 Mar 15;150(6):2356–63.
62. Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*. 2007 Apr 1;178(7):4641–9.
63. Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD, Fedorak RN. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis*. 1999 Nov;5(4):262–70.
64. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Jan;14(1):20–32.
65. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7;21(29):8787–803.
66. Sommer F, Bäckhed F. Know your neighbor: Microbiota and host epithelial cells interact locally to control intestinal function and physiology. *Bioessays*. 2016 May;38(5):455–64.
67. McNeil NI. The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *Am J Clin Nutr*. 1984 Feb;39(2):338–42.
68. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan 23;505(7484):559–63.
69. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006 Jun 2;312(5778):1355–9.
70. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O’Connell TM, Bunker MK, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab*. 2011 May 4;13(5):517–26.
71. Berer K, Krishnamoorthy G. Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta Neuropathol*. 2012 May;123(5):639–51.
72. Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):228–31.
73. Kamada N, Núñez G. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology*. 2014 May;146(6):1477–88.
74. Sartor RB. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2008 Feb 1;134(2):577–94.

75. Kamada N, Núñez G. Role of the gut microbiota in the development and function of lymphoid cells. *J Immunol.* 2013 Feb 15;190(4):1389–95.
76. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Jul 6;107(27):12204–9.
77. Säemann MD, Böhmig GA, Osterreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J.* 2000 Dec;14(15):2380–2.
78. Menzel T, Lührs H, Zirlik S, Schaubert J, Kudlich T, Gerke T, et al. Butyrate inhibits leukocyte adhesion to endothelial cells via modulation of VCAM-1. *Inflamm Bowel Dis.* 2004 Mar;10(2):122–8.
79. Klampfer L, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L. Inhibition of interferon gamma signaling by the short chain fatty acid butyrate. *Mol Cancer Res.* 2003 Sep;1(11):855–62.
80. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients.* 2011;3(10):858–76.
81. Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun.* 2014 May;38:1–12.
82. Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology.* 2011 Aug;141(2):599–609, 609.e1-3.
83. Montiel-Castro AJ, González-Cervantes RM, Bravo-Ruiseco G, Pacheco-López G. The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Front Integr Neurosci.* 2013 Oct 7;7:70.
84. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature.* 2007 Mar 29;446(7135):557–61.
85. Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol.* 2010 Nov;105(11):2420–8.
86. Sun J, Shen X, Li Y, Guo Z, Zhu W, Zuo L, et al. Therapeutic Potential to Modify the Mucus Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients.* 2016 Jan 14;8(1).
87. Moreira APB, Texeira TFS, Ferreira AB, Peluzio M do CG, Alfenas R de CG. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr.* 2012 Sep;108(5):801–9.
88. Teixeira TFS, Collado MC, Ferreira CLLF, Bressan J, Peluzio M do CG. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutr Res.* 2012 Sep;32(9):637–47.
89. Brignardello J, Morales P, Diaz E, Romero J, Brunser O, Gotteland M. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010 Dec;32(11–12):1307–14.

90. Teixeira TFS, Souza NCS, Chiarello PG, Franceschini SCC, Bressan J, Ferreira CLLF, et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clin Nutr*. 2012 Oct;31(5):735–40.
91. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palù G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Feb;292(2):G518–525.
92. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008 Jun;57(6):1470–81.
93. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009 Aug;58(8):1091–103.
94. Martinez-Medina M, Denizot J, Dreux N, Robin F, Billard E, Bonnet R, et al. Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut*. 2014 Jan;63(1):116–24.
95. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. 2006 Apr;41(4):408–19.
96. Ghia J-E, Blennerhassett P, Deng Y, Verdu EF, Khan WI, Collins SM. Reactivation of inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. *Gastroenterology*. 2009 Jun;136(7):2280–2288.e1–4.
97. Ventura MT, Polimeno L, Amoruso AC, Gatti F, Annoscia E, Marinaro M, et al. Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Dig Liver Dis*. 2006 Oct;38(10):732–6.
98. Heyman M. Gut barrier dysfunction in food allergy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Dec;17(12):1279–85.
99. Li X, Kan EM, Lu J, Cao Y, Wong RK, Keshavarzian A, et al. Combat-training increases intestinal permeability, immune activation and gastrointestinal symptoms in soldiers. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Apr;37(8):799–809.
100. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009 Jan;19(1):92–105.
101. Zhou Q, Souba WW, Croce CM, Verne GN. MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 2010 Jun;59(6):775–84.
102. Hou Q, Huang Y, Zhu S, Li P, Chen X, Hou Z, et al. MiR-144 Increases Intestinal Permeability in IBS-D Rats by Targeting OCLN and ZO1. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(6):2256–68.
103. Adammek M, Greve B, Kässens N, Schneider C, Brüggemann K, Schüring AN, et al. MicroRNA miR-145 inhibits proliferation, invasiveness, and stem cell phenotype of an in vitro endometriosis model by targeting multiple cytoskeletal elements and pluripotency factors. *Fertil Steril*. 2013 Apr;99(5):1346–1355.e5.

104. Ciechanover A. The unravelling of the ubiquitin system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(5):322–4.
105. Kish-Trier E, Hill CP. Structural biology of the proteasome. *Annu Rev Biophys.* 2013;42:29–49.
106. Leestemaker Y, Ovaa H. Tools to investigate the ubiquitin proteasome system. *Drug Discovery Today: Technologies.* 2017 Dec 1;26:25–31.
107. Bardag-Gorce F. Effects of ethanol on the proteasome interacting proteins. *World J Gastroenterol.* 2010 Mar 21;16(11):1349–57.
108. Ferrington DA, Gregerson DS. Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;109:75–112.
109. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002 Apr;82(2):373–428.
110. Leblond J, Hubert-Buron A, Bole-Feysot C, Ducrotté P, Déchelotte P, Coëffier M. Regulation of proteolysis by cytokines in the human intestinal epithelial cell line HCT-8: role of IFN γ . *Biochimie.* 2006 Jul;88(7):759–65.
111. Visekruna A, Joeris T, Seidel D, Kroesen A, Loddenkemper C, Zeitz M, et al. Proteasome-mediated degradation of I κ B α and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12):3195–203.
112. Hubert-Buron A, Leblond J, Jacquot A, Ducrotté P, Déchelotte P, Coëffier M. Glutamine pretreatment reduces IL-8 production in human intestinal epithelial cells by limiting I κ B α ubiquitination. *J Nutr.* 2006 Jun;136(6):1461–5.
113. Kubickova L, Pour L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J Cell Mol Med.* 2014 Jun;18(6):947–61.
114. Holkova B, Grant S. Proteasome inhibitors in mantle cell lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2012 Jun;25(2):133–41.
115. Mato AR, Feldman T, Goy A. Proteasome inhibition and combination therapy for non-Hodgkin's lymphoma: from bench to bedside. *Oncologist.* 2012;17(5):694–707.
116. Kouroukis TC, Baldassarre FG, Haynes AE, Imrie K, Reece DE, Cheung MC. Bortezomib in multiple myeloma: systematic review and clinical considerations. *Curr Oncol.* 2014 Aug;21(4):e573-603.
117. Boccadoro M, Morgan G, Cavenagh J. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int.* 2005 Jun 1;5(1):18.
118. Loeuillard E, Bertrand J, Herranen A, Melchior C, Guérin C, Coëffier M, et al. 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colitis with fibrosis and modulation of TGF- β 1 signaling. *World J Gastroenterol.* 2014 Dec 28;20(48):18207–15.
119. Basler M, Dajee M, Moll C, Groettrup M, Kirk CJ. Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome. *J Immunol.* 2010 Jul 1;185(1):634–41.

120. Gruber R, Börnchen C, Rose K, Daubmann A, Volksdorf T, Wladykowski E, et al. Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. *Am J Pathol.* 2015 Oct;185(10):2777–89.
121. Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Ohashi M, Oda Y, Tsukita S, et al. The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. *J Cell Sci.* 2009 Apr 1;122(Pt 7):985–94.
122. Coëffier M, Gloro R, Boukhattala N, Aziz M, Lecleire S, Vandaele N, et al. Increased Proteasome-Mediated Degradation of Occludin in Irritable Bowel Syndrome: *American Journal of Gastroenterology.* 2010 May;105(5):1181–8.
123. Traweger A, Fang D, Liu Y-C, Stelzhammer W, Krizbai IA, Fresser F, et al. The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem.* 2002 Mar 22;277(12):10201–8.
124. Saha L. Irritable bowel syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment, and evidence-based medicine. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 14;20(22):6759–73.
125. El-Salhy M, Gilja OH, Gundersen D, Hatlebakk JG, Hausken T. Endocrine cells in the ileum of patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014 Mar 7;20(9):2383–91.
126. Marlicz W, Zawada I, Starzyńska T. [Irritable bowel syndrome--irritable bowel or irritable mind?]. *Pol Merkur Lekarski.* 2012 Jan;32(187):64–9.
127. Le Pluart D, Sabaté J-M, Bouchoucha M, Hercberg S, Benamouzig R, Julia C. Functional gastrointestinal disorders in 35,447 adults and their association with body mass index. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015 Apr;41(8):758–67.
128. El-Salhy M. Irritable bowel syndrome: diagnosis and pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2012 Oct 7;18(37):5151–63.
129. Horwitz BJ, Fisher RS. The irritable bowel syndrome. *N Engl J Med.* 2001 Jun 14;344(24):1846–50.
130. Manning AP, Thompson WG, Heaton KW, Morris AF. Towards positive diagnosis of the irritable bowel. *Br Med J.* 1978 Sep 2;2(6138):653–4.
131. Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome II process. *Gut.* 1999 Sep;45 Suppl 2:II1-5.
132. Drossman DA. Rome III: the new criteria. *Chin J Dig Dis.* 2006;7(4):181–5.
133. Mearin F, Lacy BE, Chang L, Chey WD, Lembo AJ, Simren M, et al. Bowel Disorders. *Gastroenterology.* 2016 Feb 18;
134. Drossman DA. Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features and Rome IV. *Gastroenterology.* 2016 Feb 19;
135. Francis CY, Morris J, Whorwell PJ. The irritable bowel severity scoring system: a simple method of monitoring irritable bowel syndrome and its progress. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997 Apr;11(2):395–402.

136. Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2009 May;136(6):1979–88.
137. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(5):1480–91.
138. Chey WD, Kurlander J, Eswaran S. Irritable bowel syndrome: a clinical review. *JAMA*. 2015 Mar 3;313(9):949–58.
139. Ford AC, Forman D, Bailey AG, Axon ATR, Moayyedi P. Irritable bowel syndrome: a 10-yr natural history of symptoms and factors that influence consultation behavior. *Am J Gastroenterol*. 2008 May;103(5):1229–39; quiz 1240.
140. Peery AF, Crockett SD, Barritt AS, Dellon ES, Eluri S, Gangarosa LM, et al. Burden of Gastrointestinal, Liver, and Pancreatic Diseases in the United States. *Gastroenterology*. 2015 Dec;149(7):1731-1741.e3.
141. Chang JY, Locke GR, McNally MA, Halder SL, Schleck CD, Zinsmeister AR, et al. Impact of functional gastrointestinal disorders on survival in the community. *Am J Gastroenterol*. 2010 Apr;105(4):822–32.
142. Canavan C, West J, Card T. Review article: the economic impact of the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 Nov;40(9):1023–34.
143. Camilleri M. Peripheral mechanisms in irritable bowel syndrome. *N Engl J Med*. 2013 07;368(6):578–9.
144. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest*. 2015 Mar 2;125(3):926–38.
145. Gaman A, Kuo B. Neuromodulatory processes of the brain-gut axis. *Neuromodulation*. 2008 Oct 1;11(4):249–59.
146. Moloney RD, Johnson AC, O’Mahony SM, Dinan TG, Greenwood-Van Meerveld B, Cryan JF. Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome. *CNS Neurosci Ther*. 2016 Feb;22(2):102–17.
147. Brookes SJH, Spencer NJ, Costa M, Zagorodnyuk VP. Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 May;10(5):286–96.
148. Boeckstaens G, Camilleri M, Sifrim D, Houghton LA, Elsenbruch S, Lindberg G, et al. Fundamentals of Neurogastroenterology: Physiology/Motility - Sensation. *Gastroenterology*. 2016 Feb 18;
149. Vanner S, Greenwood-Van Meerveld B, Mawe G, Shea-Donohue T, Verdu EF, Wood J, et al. Fundamentals of Neurogastroenterology: Basic Science. *Gastroenterology*. 2016 Feb 18;
150. Collins SM. Is the irritable gut an inflamed gut? *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1992;192:102–5.
151. Barbara G, Feinle-Bisset C, Ghoshal UC, Quigley EM, Santos J, Vanner S, et al. The Intestinal Microenvironment and Functional Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology*. 2016 Feb 18;

152. Jarrett ME, Burr RL, Cain KC, Hertig V, Weisman P, Heitkemper MM. Anxiety and depression are related to autonomic nervous system function in women with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci*. 2003 Feb;48(2):386–94.
153. Kerckhoffs APM, Ter Linde JJM, Akkermans LMA, Samsom M. Trypsinogen IV, serotonin transporter transcript levels and serotonin content are increased in small intestine of irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil*. 2008 Aug;20(8):900–7.
154. Ren T-H, Wu J, Yew D, Ziea E, Lao L, Leung W-K, et al. Effects of neonatal maternal separation on neurochemical and sensory response to colonic distension in a rat model of irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Mar;292(3):G849-856.
155. Thijssen AY, Jonkers DMAE, Leue C, van der Veek PPJ, Vidakovic-Vukic M, van Rood YR, et al. Dysfunctional cognitions, anxiety and depression in irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol*. 2010 Dec;44(10):e236-241.
156. Taché Y, Kiank C, Stengel A. A role for corticotropin-releasing factor in functional gastrointestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep*. 2009 Aug;11(4):270–7.
157. Trimble N, Johnson AC, Foster A, Greenwood-van Meerveld B. Corticotropin-releasing factor receptor 1-deficient mice show decreased anxiety and colonic sensitivity. *Neurogastroenterol Motil*. 2007 Sep;19(9):754–60.
158. Castagliuolo I, Lamont JT, Qiu B, Fleming SM, Bhaskar KR, Nikulasson ST, et al. Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 1):G884-892.
159. Saunders PR, Hanssen NP, Perdue MH. Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol*. 1997 Aug;273(2 Pt 1):G486-490.
160. Santos J, Yang P-C, Söderholm JD, Benjamin M, Perdue MH. Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut*. 2001 May 1;48(5):630–6.
161. Barreau F, Cartier C, Leveque M, Ferrier L, Moriez R, Laroute V, et al. Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *J Physiol (Lond)*. 2007 Apr 1;580(Pt 1):347–56.
162. Overman EL, Rivier JE, Moeser AJ. CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF- α . *PLoS ONE*. 2012;7(6):e39935.
163. Wallon C, Yang P-C, Keita AV, Ericson A-C, McKay DM, Sherman PM, et al. Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. *Gut*. 2008 Jan;57(1):50–8.
164. Radovanovic-Dinic B, Tesic-Rajkovic S, Grgov S, Petrovic G, Zivkovic V. Irritable bowel syndrome - from etiopathogenesis to therapy. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2018 Mar;162(1):1–9.
165. Farzaei MH, Bahramsoltani R, Abdollahi M, Rahimi R. The Role of Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome: Pharmacological Targets and Novel Treatments. *J Neurogastroenterol Motil*. 2016 Oct 30;22(4):558–74.

166. Sikander A, Rana SV, Prasad KK. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clin Chim Acta*. 2009 May;403(1–2):47–55.
167. Kim DY, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol*. 2000 Oct;95(10):2698–709.
168. Talley NJ, Phillips SF, Haddad A, Miller LJ, Twomey C, Zinsmeister AR, et al. GR 38032F (ondansetron), a selective 5HT₃ receptor antagonist, slows colonic transit in healthy man. *Dig Dis Sci*. 1990 Apr;35(4):477–80.
169. Steadman CJ, Talley NJ, Phillips SF, Zinsmeister AR. Selective 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonism with ondansetron as treatment for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. *Mayo Clin Proc*. 1992 Aug;67(8):732–8.
170. Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Aug;10(8):473–86.
171. Hoffman JM, Tyler K, MacEachern SJ, Balemba OB, Johnson AC, Brooks EM, et al. Activation of colonic mucosal 5-HT₄ receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):844–854.e4.
172. Lyubashina OA, Busygina II, Panteleev SS, Nozdrachev AD. The 5HT₄ receptor agonist prucalopride suppresses abdominal nociception. *Dokl Biol Sci*. 2015;461:76–9.
173. Caenepeel P, Janssens J, Vantrappen G, Eyssen H, Coremans G. Interdigestive myoelectric complex in germ-free rats. *Dig Dis Sci*. 1989 Aug;34(8):1180–4.
174. Husebye E, Hellström PM, Sundler F, Chen J, Midtvedt T. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Mar;280(3):G368–380.
175. Zhou Q, Verne GN. New insights into visceral hypersensitivity--clinical implications in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jun;8(6):349–55.
176. Ohman L, Simrén M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Mar;7(3):163–73.
177. Tran L, Schulkin J, Greenwood-Van Meerveld B. Importance of CRF receptor-mediated mechanisms of the bed nucleus of the stria terminalis in the processing of anxiety and pain. *Neuropsychopharmacology*. 2014 Oct;39(11):2633–45.
178. Liu S, Chang J, Long N, Beckwith K, Talhouarne G, Brooks JJ, et al. Endogenous CRF in rat large intestine mediates motor and secretory responses to stress. *Neurogastroenterol Motil*. 2016 Feb;28(2):281–91.
179. Schwetz I, McRoberts JA, Coutinho SV, Bradesi S, Gale G, Fanselow M, et al. Corticotropin-releasing factor receptor 1 mediates acute and delayed stress-induced visceral hyperalgesia in maternally separated Long-Evans rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Oct;289(4):G704–712.
180. Tran L, Schulkin J, Ligon CO, Greenwood-Van Meerveld B. Epigenetic modulation of chronic anxiety and pain by histone deacetylation. *Mol Psychiatry*. 2015 Oct;20(10):1219–31.

181. Tran L, Chaloner A, Sawalha AH, Greenwood Van-Meerveld B. Importance of epigenetic mechanisms in visceral pain induced by chronic water avoidance stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2013 Jun;38(6):898–906.
182. Hong S, Zheng G, Wiley JW. Epigenetic regulation of genes that modulate chronic stress-induced visceral pain in the peripheral nervous system. *Gastroenterology*. 2015 Jan;148(1):148-157.e7.
183. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 Oct 23;389(6653):816–24.
184. Akbar A, Yiangou Y, Facer P, Walters JRF, Anand P, Ghosh S. Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut*. 2008 Jul;57(7):923–9.
185. Zhou Q, Yang L, Larson S, Basra S, Merwat S, Tan A, et al. Decreased miR-199 augments visceral pain in patients with IBS through translational upregulation of TRPV1. *Gut*. 2016 May;65(5):797–805.
186. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2004 Mar;126(3):693–702.
187. Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, et al. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):636–47.
188. Distrutti E, Monaldi L, Ricci P, Fiorucci S. Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 21;22(7):2219–41.
189. Jeffery IB, O'Toole PW, Öhman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EMM, et al. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut*. 2012 Jul;61(7):997–1006.
190. Zhuang X, Xiong L, Li L, Li M, Chen M. Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jan;32(1):28–38.
191. Malinen E, Rinttilä T, Kajander K, Mättö J, Kassinen A, Krogus L, et al. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol*. 2005 Feb;100(2):373–82.
192. Kassinen A, Krogus-Kurikka L, Mäkituokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, et al. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*. 2007 Jul;133(1):24–33.
193. Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, Ringel Y. Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*. 2012 Jun;24(6):521–30, e248.
194. Lacy BE, Chey WD, Lembo AJ. New and Emerging Treatment Options for Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2015 Apr;11(4 Suppl 2):1–19.

195. Ford AC, Quigley EMM, Lacy BE, Lembo AJ, Saito YA, Schiller LR, et al. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014 Oct;109(10):1547–61; quiz 1546, 1562.
196. Bercik P, Collins SM, Verdu EF. Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterol Motil*. 2012 May;24(5):405–13.
197. Kim G, Deepinder F, Morales W, Hwang L, Weitsman S, Chang C, et al. *Methanobrevibacter smithii* is the predominant methanogen in patients with constipation-predominant IBS and methane on breath. *Dig Dis Sci*. 2012 Dec;57(12):3213–8.
198. Jahng J, Jung IS, Choi EJ, Conklin JL, Park H. The effects of methane and hydrogen gases produced by enteric bacteria on ileal motility and colonic transit time. *Neurogastroenterol Motil*. 2012 Feb;24(2):185–90, e92.
199. Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*. 2010 May;22(5):512–9, e114-115.
200. Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Corinaldesi R. A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut*. 2002 Jul;51 Suppl 1:i41-44.
201. Park M-I, Camilleri M. Is there a role of food allergy in irritable bowel syndrome and functional dyspepsia? A systematic review. *Neurogastroenterol Motil*. 2006 Aug;18(8):595–607.
202. Camilleri M, Nadeau A, Tremaine WJ, Lamsam J, Burton D, Odunsi S, et al. Measurement of serum 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (or 7 α HC4), a surrogate test for bile acid malabsorption in health, ileal disease and irritable bowel syndrome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Neurogastroenterol Motil*. 2009 Jul;21(7):734-e43.
203. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BMR, Spiller RC, Vanner S, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut*. 2013 Jan;62(1):159–76.
204. Törnblom H, Lindberg G, Nyberg B, Veress B. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2002 Dec;123(6):1972–9.
205. Vázquez-Frias R, Gutiérrez-Reyes G, Urbán-Reyes M, Velázquez-Guadarrama N, Fortoul-van der Goes TI, Reyes-López A, et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine profile in pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Rev Gastroenterol Mex*. 2015 Mar;80(1):6–12.
206. Choghakhori R, Abbasnezhad A, Hasanvand A, Amani R. Inflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers in irritable bowel syndrome: Association with digestive symptoms and quality of life. *Cytokine*. 2017;93:34–43.
207. Bennet SMP, Polster A, Törnblom H, Isaksson S, Capronnier S, Tessier A, et al. Global Cytokine Profiles and Association With Clinical Characteristics in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2016;111(8):1165–76.

208. Belmonte L, Beutheu Youmba S, Bertiaux-Vandaële N, Antonietti M, Lecleire S, Zalar A, et al. Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e42777.
209. Dlugosz A, Nowak P, D'Amato M, Mohammadian Kermani G, Nyström J, Abdurahman S, et al. Increased serum levels of lipopolysaccharide and anti-flagellin antibodies in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*. 2015 Dec;27(12):1747–54.
210. Wang L-H, Fang X-C, Pan G-Z. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut*. 2004 Aug;53(8):1096–101.
211. Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, et al. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut*. 2000 Dec;47(6):804–11.
212. Öhman L, Törnblom H, Simrén M. Crosstalk at the mucosal border: importance of the gut microenvironment in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jan;12(1):36–49.
213. Rothmeier AS, Ruf W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Semin Immunopathol*. 2012 Jan;34(1):133–49.
214. Bueno L, Fioramonti J. Protease-activated receptor 2 and gut permeability: a review. *Neurogastroenterol Motil*. 2008 Jun;20(6):580–7.
215. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*. 2004 Apr;84(2):579–621.
216. Zhong CJ, Wang K, Zhang L, Yang CQ, Zhang K, Zhou SP, et al. Mast cell activation is involved in stress-induced epithelial barrier dysfunction in the esophagus. *J Dig Dis*. 2015 Apr;16(4):186–96.
217. Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, et al. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut*. 2009 Feb;58(2):196–201.
218. Annaházi A, Ferrier L, Bézirard V, Lévêque M, Eutamène H, Ait-Belgnaoui A, et al. Luminal cysteine-proteases degrade colonic tight junction structure and are responsible for abdominal pain in constipation-predominant IBS. *Am J Gastroenterol*. 2013 Aug;108(8):1322–31.
219. Pozuelo M, Panda S, Santiago A, Mendez S, Accarino A, Santos J, et al. Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Sci Rep*. 2015 Aug 4;5:12693.
220. Plöger S, Stumpff F, Penner GB, Schulzke J-D, Gäbel G, Martens H, et al. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Jul;1258:52–9.
221. Zhou Q, Costinean S, Croce CM, Brasier AR, Merwat S, Larson SA, et al. MicroRNA 29 targets nuclear factor- κ B-repressing factor and Claudin 1 to increase intestinal permeability. *Gastroenterology*. 2015 Jan;148(1):158-169.e8.

222. Bertrand J, Ghouzali I, Guérin C, Bôle-Feysot C, Gouteux M, Déchelotte P, et al. Glutamine Restores Tight Junction Protein Claudin-1 Expression in Colonic Mucosa of Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2016;40(8):1170–6.
223. Labow BI, Souba WW. Glutamine. *World J Surg*. 2000 Dec;24(12):1503–13.
224. Coëffier M, Marion-Letellier R, Déchelotte P. Potential for amino acids supplementation during inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Mar;16(3):518–24.
225. Coëffier M, Marion R, Ducrotté P, Déchelotte P. Modulating effect of glutamine on IL-1beta-induced cytokine production by human gut. *Clin Nutr*. 2003 Aug;22(4):407–13.
226. Boukhattala N, Claeysens S, Bensifi M, Maurer B, Abed J, Lavoinne A, et al. Effects of essential amino acids or glutamine deprivation on intestinal permeability and protein synthesis in HCT-8 cells: involvement of GCN2 and mTOR pathways. *Amino Acids*. 2012 Jan;42(1):375–83.
227. Alverdy JC. Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1990 Aug;14(4 Suppl):109S-113S.
228. DeMarco VG, Li N, Thomas J, West CM, Neu J. Glutamine and barrier function in cultured Caco-2 epithelial cell monolayers. *J Nutr*. 2003 Jul;133(7):2176–9.
229. Li N, Lewis P, Samuelson D, Liboni K, Neu J. Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Sep;287(3):G726-733.
230. Pickett-Blakely O. Obesity and irritable bowel syndrome: a comprehensive review. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2014 Jul;10(7):411–6.
231. Schenck S, Niewerth M, Sengler C, Trauzeddel R, Thon A, Minden K, et al. Prevalence of overweight in children and adolescents with juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2015;44(4):288–95.
232. Bray GA, Kim KK, Wilding JPH, World Obesity Federation. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes Rev*. 2017;18(7):715–23.
233. Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Sep;32(9):1431–7.
234. WHO | Obesity: preventing and managing the global epidemic [Internet]. WHO. [cited 2019 Jul 9]. Available from: http://www.who.int/entity/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/index.html
235. Khayatzadeh-Mahani A, Ruckert A, Labonté R. Could the WHO's Framework on Engagement with Non-State Actors (FENSA) be a threat to tackling childhood obesity? *Glob Public Health*. 2018 Sep;13(9):1337–40.
236. Monteiro CA, Moubarac J-C, Cannon G, Ng SW, Popkin B. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. *Obes Rev*. 2013 Nov;14 Suppl 2:21–8.
237. Khan WI, Collins SM. Gut motor function: immunological control in enteric infection and inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2006 Mar;143(3):389–97.

238. Ho W, Spiegel BMR. The relationship between obesity and functional gastrointestinal disorders: causation, association, or neither? *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2008 Aug;4(8):572–8.
239. Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, et al. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut*. 2003 Jan;52(1):84–90.
240. Di Giovangiulio M, Verheijden S, Bosmans G, Stakenborg N, Boeckxstaens GE, Matteoli G. The Neuromodulation of the Intestinal Immune System and Its Relevance in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*. 2015;6:590.
241. Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, Stevanovic K, Berres M-L, Hashimoto D, et al. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell*. 2014 Jul 17;158(2):300–13.
242. Lomax AE, Fernández E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil*. 2005 Feb;17(1):4–15.
243. Fu X-Y, Li Z, Zhang N, Yu H-T, Wang S-R, Liu J-R. Effects of gastrointestinal motility on obesity. *Nutr Metab (Lond)*. 2014 Jan 7;11(1):3.
244. Delgado-Aros S, Locke GR, Camilleri M, Talley NJ, Fett S, Zinsmeister AR, et al. Obesity is associated with increased risk of gastrointestinal symptoms: a population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2004 Sep;99(9):1801–6.
245. Talley NJ, Quan C, Jones MP, Horowitz M. Association of upper and lower gastrointestinal tract symptoms with body mass index in an Australian cohort. *Neurogastroenterol Motil*. 2004 Aug;16(4):413–9.
246. Anitha M, Reichardt F, Tabatabavakili S, Nezami BG, Chassaing B, Mwangi S, et al. Intestinal dysbiosis contributes to the delayed gastrointestinal transit in high-fat diet fed mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016 May;2(3):328–39.
247. Reichardt F, Chassaing B, Nezami BG, Li G, Tabatabavakili S, Mwangi S, et al. Western diet induces colonic nitrergic myenteric neuropathy and dysmotility in mice via saturated fatty acid- and lipopolysaccharide-induced TLR4 signalling. *J Physiol (Lond)*. 2017 01;595(5):1831–46.
248. Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut*. 2016 Jan;65(1):57–62.
249. Ge X, Zhao W, Ding C, Tian H, Xu L, Wang H, et al. Potential role of fecal microbiota from patients with slow transit constipation in the regulation of gastrointestinal motility. *Sci Rep*. 2017 27;7(1):441.
250. Deng Y, Li M, Mei L, Cong LM, Liu Y, Zhang BB, et al. Manipulation of intestinal dysbiosis by a bacterial mixture ameliorates loperamide-induced constipation in rats. *Benef Microbes*. 2018 Apr 25;9(3):453–64.
251. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol*. 2017 22;17(1):120.

252. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Nov;32(11):1720–4.
253. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1027–31.
254. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Nov 2;101(44):15718–23.
255. Muñiz Pedrego DA, Jensen MD, Van Dyke CT, Murray JA, Woods JA, Chen J, et al. Gut Microbial Carbohydrate Metabolism Hinders Weight Loss in Overweight Adults Undergoing Lifestyle Intervention With a Volumetric Diet. *Mayo Clin Proc*. 2018;93(8):1104–10.
256. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007 Nov;50(11):2374–83.
257. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 2011 Jul;94(1):58–65.
258. Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sá C, André S, Poitou C, Allatif O, et al. Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab*. 2015 Jul 7;22(1):113–24.
259. Kim K-A, Gu W, Lee I-A, Joh E-H, Kim D-H. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e47713.
260. Gulhane M, Murray L, Lourie R, Tong H, Sheng YH, Wang R, et al. High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Sci Rep*. 2016 28;6:28990.
261. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 Jul;56(7):1761–72.
262. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Aug;299(2):G440–448.
263. Li H, Lelliott C, Håkansson P, Ploj K, Tuneld A, Verolin-Johansson M, et al. Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metab Clin Exp*. 2008 Dec;57(12):1704–10.
264. Antonioli L, Pellegrini C, Fornai M, Tirotta E, Gentile D, Benvenuti L, et al. Colonic motor dysfunctions in a mouse model of high-fat diet-induced obesity: an involvement of A2B adenosine receptors. *Purinergic Signal*. 2017 Dec;13(4):497–510.
265. Antonioli L, Caputi V, Fornai M, Pellegrini C, Gentile D, Giron MC, et al. Interplay between colonic inflammation and tachykininergic pathways in the onset of colonic dysmotility in a mouse model of diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2019 Feb;43(2):331–43.

266. Pendyala S, Neff LM, Suárez-Fariñas M, Holt PR. Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011 Feb;93(2):234–42.
267. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J-D, Serino M, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*. 2014 Nov 18;14:189.
268. Serino M, Luche E, Gres S, Baylac A, Bergé M, Cenac C, et al. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*. 2012 Apr;61(4):543–53.
269. Spruss A, Bergheim I. Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2009 Sep;20(9):657–62.
270. Wang Z, Xiao G, Yao Y, Guo S, Lu K, Sheng Z. The role of bifidobacteria in gut barrier function after thermal injury in rats. *J Trauma*. 2006 Sep;61(3):650–7.
271. Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *Br J Nutr*. 2003 May;89(5):597–606.
272. Cani PD, Neyrinck AM, Maton N, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res*. 2005 Jun;13(6):1000–7.
273. Tsai CH, Hill M, Asa SL, Brubaker PL, Drucker DJ. Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am J Physiol*. 1997 Jul;273(1 Pt 1):E77-84.
274. Johnson AMF, Costanzo A, Gareau MG, Armando AM, Quehenberger O, Jameson JM, et al. High Fat Diet Causes Depletion of Intestinal Eosinophils Associated with Intestinal Permeability. *PLOS ONE*. 2015 Apr 2;10(4):e0122195.
275. Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2010 Mar 12;7:19.
276. Chen J, Li J, Lim FC, Wu Q, Douek DC, Scott DK, et al. Maintenance of naïve CD8 T cells in nonagenarians by leptin, IGFBP3 and T3. *Mech Ageing Dev*. 2010 Jan;131(1):29–37.
277. Ajuwon KM, Kuske JL, Ragland D, Adeola O, Hancock DL, Anderson DB, et al. The regulation of IGF-1 by leptin in the pig is tissue specific and independent of changes in growth hormone. *J Nutr Biochem*. 2003 Sep;14(9):522–30.
278. D’Addio F, La Rosa S, Maestroni A, Jung P, Orsenigo E, Ben Nasr M, et al. Circulating IGF-I and IGFBP3 Levels Control Human Colonic Stem Cell Function and Are Disrupted in Diabetic Enteropathy. *Cell Stem Cell*. 2015 01;17(4):486–98.
279. Pignata C, Budillon G, Monaco G, Nani E, Cuomo R, Parrilli G, et al. Jejunal bacterial overgrowth and intestinal permeability in children with immunodeficiency syndromes. *Gut*. 1990 Aug;31(8):879–82.
280. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Weber CR, Schwarz BT, Austin JR, et al. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol*. 2010 Apr 5;189(1):111–26.

281. Kojima T, Fuchimoto J, Yamaguchi H, Ito T, Takasawa A, Ninomiya T, et al. c-Jun N-terminal kinase is largely involved in the regulation of tricellular tight junctions via tricellulin in human pancreatic duct epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2010 Nov;225(3):720–33.
282. Damms-Machado A, Louis S, Schnitzer A, Volynets V, Rings A, Basrai M, et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *Am J Clin Nutr*. 2017;105(1):127–35.
283. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev*. 2011 Jan;91(1):151–75.
284. Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Ortega F, Ricart W, Fernández-Real JM. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e37160.
285. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serino M, Luche E, Waget A, Pardo G, et al. Circulating lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as a marker of obesity-related insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2012 Nov;36(11):1442–9.
286. Morkkala K, Pellonperä O, Røytiö H, Pussinen P, Rönnemaa T, Laitinen K. Increased intestinal permeability, measured by serum zonulin, is associated with metabolic risk markers in overweight pregnant women. *Metab Clin Exp*. 2017;69:43–50.
287. Chitkara DK, van Tilburg MAL, Blois-Martin N, Whitehead WE. Early life risk factors that contribute to irritable bowel syndrome in adults: a systematic review. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2008 Mar [cited 2019 Jun 10];103(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3856200/>
288. Qin H-Y, Wu JCY, Tong X-D, Sung JY, Xu H-X, Bian Z-X. Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol*. 2011 Feb;46(2):164–74.
289. Gershon MD. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999 May;13 Suppl 2:15–30.
290. Lamb K, Zhong F, Gebhart GF, Bielefeldt K. Experimental colitis in mice and sensitization of converging visceral and somatic afferent pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Mar;290(3):G451-457.
291. Whittle BJR, Varga C, Berko A, Horvath K, Posa A, Riley JP, et al. Attenuation of inflammation and cytokine production in rat colitis by a novel selective inhibitor of leukotriene A4 hydrolase. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153(5):983–91.
292. Melchior C, Loeuillard E, Marion-Letellier R, Nicol L, Mulder P, Guerin C, et al. Magnetic resonance colonography for fibrosis assessment in rats with chronic colitis. *PLoS ONE*. 2014;9(7):e100921.
293. Bertrand J, Tennoune N, Marion-Letellier R, Goichon A, Chan P, Mbodji K, et al. Evaluation of ubiquitinated proteins by proteomics reveals the role of the ubiquitin proteasome system in the regulation of Grp75 and Grp78 chaperone proteins during intestinal inflammation. *Proteomics*. 2013 Nov;13(22):3284–92.

294. Bertrand J, Marion-Letellier R, Azhar S, Chan P, Legrand R, Goichon A, et al. Glutamine enema regulates colonic ubiquitinated proteins but not proteasome activities during TNBS-induced colitis leading to increased mitochondrial activity. *Proteomics*. 2015 Jul;15(13):2198–210.
295. Collins SM, McHugh K, Jacobson K, Khan I, Riddell R, Murase K, et al. Previous inflammation alters the response of the rat colon to stress. *Gastroenterology*. 1996 Dec;111(6):1509–15.
296. Adam B, Tsopelas C, Liebrechts T, Bartholomeusz FD, Holtmann G. Host immune response determines visceral hyperalgesia in a rat model of post-inflammatory irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol*. 2013 Oct;48(10):1119–27.
297. Baig MK, Zhao RH, Woodhouse SL, Abramson S, Weiss JJ, Singh EG, et al. Variability in serotonin and enterochromaffin cells in patients with colonic inertia and idiopathic diarrhoea as compared to normal controls. *Colorectal Dis*. 2002 Sep;4(5):348–54.
298. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1998;10(2):230–1.
299. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev*. 2005 Oct;85(4):1131–58.
300. Bonaz B, Taché Y. Water-avoidance stress-induced c-fos expression in the rat brain and stimulation of fecal output: role of corticotropin-releasing factor. *Brain Res*. 1994 Mar 28;641(1):21–8.
301. Kim YS, Lee MY, Ryu HS, Choi E-S, Oh JT, Yun KJ, et al. Regional Differences in Chronic Stress-induced Alterations in Mast Cell and Protease-activated Receptor-2-positive Cell Numbers in the Colon of Ws/Ws Rats. *J Neurogastroenterol Motil*. 2014 Jan;20(1):54–63.
302. Friedrich AE, Gebhart GF. Effects of spinal cholecystokinin receptor antagonists on morphine antinociception in a model of visceral pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Feb;292(2):538–44.
303. Cameron HL, Perdue MH. Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Jul;314(1):214–20.
304. Bradesi S, Schwetz I, Ennes HS, Lamy CMR, Ohning G, Fanselow M, et al. Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Jul;289(1):G42–53.
305. Hong S, Zheng G, Wu X, Snider NT, Owyang C, Wiley JW. Corticosterone mediates reciprocal changes in CB 1 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons in the chronically stressed rat. *Gastroenterology*. 2011 Feb;140(2):627–637.e4.
306. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 2011 May 27;145(5):745–57.
307. Narayanaswami V, Dwoskin LP. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets. *Pharmacol Ther*. 2017;170:116–47.
308. Boughton CK, Murphy KG. Can neuropeptides treat obesity? A review of neuropeptides and their potential role in the treatment of obesity. *Br J Pharmacol*. 2013 Dec;170(7):1333–48.

309. Arora S, Anubhuti null. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides*. 2006 Dec;40(6):375–401.
310. Delgado MJ, Cerdá-Reverter JM, Soengas JL. Hypothalamic Integration of Metabolic, Endocrine, and Circadian Signals in Fish: Involvement in the Control of Food Intake. *Front Neurosci*. 2017;11:354.
311. Waterson MJ, Horvath TL. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab*. 2015 Dec 1;22(6):962–70.
312. Wilding JPH. Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med*. 2002 Aug;19(8):619–27.
313. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E. Animal models of obesity. *Obes Rev*. 2007 Mar;8 Suppl 1:55–61.
314. Nilsson C, Raun K, Yan F, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin*. 2012 Feb;33(2):173–81.
315. Farooqi IS, O’Rahilly S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med*. 2005;56:443–58.
316. Mayer J, Bates MW, Dickie MM. Hereditary diabetes in genetically obese mice. *Science*. 1951 Jun 29;113(2948):746–7.
317. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425–32.
318. O’Rahilly S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature*. 2009 Nov 19;462(7271):307–14.
319. Friedman JM. Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutr Rev*. 1998 Feb;56(2 Pt 2):s38-46; discussion s54-75.
320. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 1995 Jul 28;269(5223):540–3.
321. Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, et al. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*. 1996 Feb 16;271(5251):994–6.
322. Hariri N, Gougeon R, Thibault L. A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr Res*. 2010 Sep;30(9):632–43.
323. Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, et al. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes*. 2004 May;53(5):1253–60.
324. de Castro UGM, dos Santos RAS, Silva ME, de Lima WG, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids Health Dis*. 2013 Sep 18;12:136.
325. Korou L-MA, Doulamis IP, Tzanetakou IP, Mikhailidis DP, Perrea DN. The effect of biological age on the metabolic responsiveness of mice fed a high-fat diet. *Lab Anim*. 2013 Oct;47(4):241–4.

326. Tschen S-I, Dhawan S, Gurlo T, Bhushan A. Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes*. 2009 Jun;58(6):1312–20.
327. Carmody RN, Gerber GK, Luevano JM, Gatti DM, Somes L, Svenson KL, et al. Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe*. 2015 Jan 14;17(1):72–84.
328. Logan AC. Dysbiotic drift: mental health, environmental grey space, and microbiota. *J Physiol Anthropol*. 2015 May 7;34:23.
329. Kang SS, Jeraldo PR, Kurti A, Miller MEB, Cook MD, Whitlock K, et al. Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. *Mol Neurodegener*. 2014 Sep 13;9:36.
330. Tomas J, Mulet C, Saffarian A, Cavin J-B, Ducroc R, Regnault B, et al. High-fat diet modifies the PPAR- γ pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016 04;113(40):E5934–43.
331. Hamilton MK, Boudry G, Lemay DG, Raybould HE. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015 May 15;308(10):G840–851.
332. Cremonini E, Wang Z, Bettaieb A, Adamo AM, Daveri E, Mills DA, et al. (-)-Epicatechin protects the intestinal barrier from high fat diet-induced permeabilization: Implications for steatosis and insulin resistance. *Redox Biol*. 2018;14:588–99.
333. Ghouzali I, Lemaitre C, Bahlouli W, Azhar S, Bôle-Feysot C, Meleine M, et al. Targeting immunoproteasome and glutamine supplementation prevent intestinal hyperpermeability. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017 Jan;1861(1 Pt A):3278–88.
334. Halpin SJ, Ford AC. Prevalence of symptoms meeting criteria for irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2012 Oct;107(10):1474–82.
335. Moloney RD, O'Mahony SM, Dinan TG, Cryan JF. Stress-induced visceral pain: toward animal models of irritable-bowel syndrome and associated comorbidities. *Front Psychiatry*. 2015;6:15.
336. Coëffier M, Gloro R, Boukhattala N, Aziz M, Lecleire S, Vandaele N, et al. Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2010 May;105(5):1181–8.
337. Kanarek N, Ben-Neriah Y. Regulation of NF- κ B by ubiquitination and degradation of the I κ Bs. *Immunol Rev*. 2012 Mar;246(1):77–94.
338. Beutheu S, Ouelaa W, Guérin C, Belmonte L, Aziz M, Tennoune N, et al. Glutamine supplementation, but not combined glutamine and arginine supplementation, improves gut barrier function during chemotherapy-induced intestinal mucositis in rats. *Clin Nutr*. 2014 Aug;33(4):694–701.
339. Bertrand J, Marion-Letellier R, Azhar S, Chan P, Legrand R, Goichon A, et al. Glutamine enema regulates colonic ubiquitinated proteins but not proteasome activities during TNBS-induced colitis leading to increased mitochondrial activity. *Proteomics*. 2015 Jul;15(13):2198–210.

340. Zhou Q, Verne ML, Fields JZ, Lefante JJ, Basra S, Salameh H, et al. Randomised placebo-controlled trial of dietary glutamine supplements for postinfectious irritable bowel syndrome. *Gut*. 2019;68(6):996–1002.
341. Aro P, Ronkainen J, Talley NJ, Storskrubb T, Bolling-Sternevald E, Agréus L. Body mass index and chronic unexplained gastrointestinal symptoms: an adult endoscopic population based study. *Gut*. 2005 Oct 1;54(10):1377–83.
342. Svedberg P, Johansson S, Wallander M-A, Hamelin B, Pedersen NL. Extra-intestinal manifestations associated with irritable bowel syndrome: a twin study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2002;16(5):975–83.
343. Talley NJ, Howell S, Poulton R. Obesity and chronic gastrointestinal tract symptoms in young adults: a birth cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2004 Sep;99(9):1807–14.
344. Roberson EN, Gould JC, Wald A. Urinary and Fecal Incontinence After Bariatric Surgery. *Dig Dis Sci*. 2010 Sep 1;55(9):2606–13.
345. Fysekidis M, Bouchoucha M, Bihan H, Reach G, Benamouzig R, Catheline J-M. Prevalence and Co-occurrence of Upper and Lower Functional Gastrointestinal Symptoms in Patients Eligible for Bariatric Surgery. *OBES SURG*. 2012 Mar 1;22(3):403–10.
346. Bertiaux-Vandaële N, Youmba SB, Belmonte L, Lecleire S, Antonietti M, Gourcerol G, et al. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am J Gastroenterol*. 2011 Dec;106(12):2165–73.
347. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palù G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Feb;292(2):G518–525.
348. Stenman LK, Holma R, Gylling H, Korpela R. Genetically obese mice do not show increased gut permeability or faecal bile acid hydrophobicity. *Br J Nutr*. 2013 Sep 28;110(6):1157–64.
349. Sitaraman S, Liu X, Charrier L, Gu LH, Ziegler TR, Gewirtz A, et al. Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *FASEB J*. 2004 Apr;18(6):696–8.
350. Kim CY, Kim K-H. Curcumin prevents leptin-induced tight junction dysfunction in intestinal Caco-2 BBe cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2014 Jan 1;25(1):26–35.
351. Ye C, Wang R, Wang M, Huang Z, Tang C. Leptin alleviates intestinal mucosal barrier injury and inflammation in obese mice with acute pancreatitis. *International Journal of Obesity*. 2018 Aug;42(8):1471.
352. Le Dréan G, Segain J-P. Connecting metabolism to intestinal barrier function: The role of leptin. *Tissue Barriers* [Internet]. 2014 Aug 8 [cited 2019 Jun 26];2(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4292046/>
353. Thaïss CA, Levy M, Grosheva I, Zheng D, Soffer E, Blacher E, et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science*. 2018 Mar 23;359(6382):1376–83.

354. Goto Y, Uematsu S, Kiyono H. Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. *Nat Immunol.* 2016 Oct 19;17(11):1244–51.
355. Zhou H-Y, Zhu H, Yao X-M, Qian J-P, Yang J, Pan X-D, et al. Metformin regulates tight junction of intestinal epithelial cells via MLCK-MLC signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Nov;21(22):5239–46.
356. Chen L, Wang J, You Q, He S, Meng Q, Gao J, et al. Activating AMPK to Restore Tight Junction Assembly in Intestinal Epithelium and to Attenuate Experimental Colitis by Metformin. *Front Pharmacol.* 2018;9:761.
357. Deng J, Zeng L, Lai X, Li J, Liu L, Lin Q, et al. Metformin protects against intestinal barrier dysfunction via AMPK α 1-dependent inhibition of JNK signalling activation. *J Cell Mol Med.* 2018;22(1):546–57.
358. Li Y, Yang T, Yao Q, Li S, Fang E, Li Y, et al. Metformin prevents colonic barrier dysfunction by inhibiting mast cell activation in maternal separation-induced IBS-like rats. *Neurogastroenterology & Motility.* 2019;31(5):e13556.
359. Nozu T, Miyagishi S, Kumei S, Nozu R, Takakusaki K, Okumura T. Metformin inhibits visceral allodynia and increased gut permeability induced by stress in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2019 Jan;34(1):186–93.
360. Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut.* 2006 Oct;55(10):1512–20.
361. Nagpal R, Newman TM, Wang S, Jain S, Lovato JF, Yadav H. Obesity-Linked Gut Microbiome Dysbiosis Associated with Derangements in Gut Permeability and Intestinal Cellular Homeostasis Independent of Diet. *J Diabetes Res.* 2018;2018:3462092.
362. Liu Z, Zhang P, Ma Y, Chen H, Zhou Y, Zhang M, et al. Lactobacillus plantarum prevents the development of colitis in IL-10-deficient mouse by reducing the intestinal permeability. *Mol Biol Rep.* 2011 Feb 1;38(2):1353–61.
363. Wang H, Hong T, Li N, Zang B, Wu X. Soluble dietary fiber improves energy homeostasis in obese mice by remodeling the gut microbiota. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 25;498(1):146–51.
364. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006 Dec 21;444(7122):1027–31.
365. Aasbrenn M, Høgestøl I, Eribe I, Kristinsson J, Lydersen S, Mala T, et al. Prevalence and predictors of irritable bowel syndrome in patients with morbid obesity: a cross-sectional study. *BMC Obes [Internet].* 2017 Jun 29 [cited 2019 Jun 30];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5490229/>
366. Ghouzali I, Lemaitre C, Bahlouli W, Azhar S, Bôle-Feysot C, Meleine M, et al. Targeting immunoproteasome and glutamine supplementation prevent intestinal hyperpermeability. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2017 Jan;1861(1 Pt A):3278–88.

367. Goichon A, Bahloul W, Ghouzali I, Chan P, Vaudry D, Déchelotte P, et al. Colonic Proteome Signature in Immunoproteasome-Deficient Stressed Mice and Its Relevance for Irritable Bowel Syndrome. *J Proteome Res.* 2019 Jan 4;18(1):478–92.
368. Teitelbaum JE, Sinha P, Micale M, Yeung S, Jaeger J. Obesity is related to multiple functional abdominal diseases. *J Pediatr.* 2009 Mar;154(3):444–6.
369. Díaz-Ruiz A, Guzmán-Ruiz R, Moreno NR, García-Rios A, Delgado-Casado N, Membrives A, et al. Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxid Redox Signal.* 2015 Sep 1;23(7):597–612.
370. Otda T, Takamura T, Misu H, Ota T, Murata S, Hayashi H, et al. Proteasome Dysfunction Mediates Obesity-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Insulin Resistance in the Liver. *Diabetes.* 2013 Mar;62(3):811–24.
371. Chang T-L, Chang C-J, Lee W-Y, Lin M-N, Huang Y-W, Fan K. The roles of ubiquitin and 26S proteasome in human obesity. *Metabolism.* 2009 Nov 1;58(11):1643–8.
372. Ignacio-Souza LM, Bombassaro B, Pascoal LB, Portovedo MA, Razolli DS, Coope A, et al. Defective Regulation of the Ubiquitin/Proteasome System in the Hypothalamus of Obese Male Mice. *Endocrinology.* 2014 Aug 1;155(8):2831–44.
373. Weisberg S, Leibel R, Tortoriello DV. Proteasome inhibitors, including curcumin, improve pancreatic β -cell function and insulin sensitivity in diabetic mice. *Nutr Diabetes.* 2016 Apr 25;6:e205.
374. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen Y-Y, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology.* 2009 Nov;137(5):1716–1724.e1-2.
375. Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr [Internet].* [cited 2019 Jul 5]; Available from: <https://academic-oup-com.gate2.inist.fr/advances/advance-article/doi/10.1093/advances/nmz061/5527771>
376. Cheng L, Jin H, Qiang Y, Wu S, Yan C, Han M, et al. High fat diet exacerbates dextran sulfate sodium induced colitis through disturbing mucosal dendritic cell homeostasis. *International Immunopharmacology.* 2016 Nov 1;40:1–10.
377. Paik J, Fierce Y, Treuting PM, Brabb T, Maggio-Price L. High-Fat Diet-Induced Obesity Exacerbates Inflammatory Bowel Disease in Genetically Susceptible *Mdr1a*^{-/-} Male Mice. *J Nutr.* 2013 Aug 1;143(8):1240–7.
378. Hou J, Abraham B, El-Serag H. Dietary Intake and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of the Literature. *American Journal of Gastroenterology.* 2011 Apr 1;106(4):563–73.
379. Abboud KY, Reis SK, Martelli ME, Zordão OP, Tannihão F, de Souza AZZ, et al. Oral Glutamine Supplementation Reduces Obesity, Pro-Inflammatory Markers, and Improves Insulin Sensitivity in DIO Wistar Rats and Reduces Waist Circumference in Overweight and Obese Humans. *Nutrients.* 2019 Mar 1;11(3).

Article

Glutamine, but not Branched-Chain Amino Acids, Restores Intestinal Barrier Function during Activity-Based Anorexia

Clément L'Huillier ^{1,2}, Marine Jarbeau ^{1,2}, Najate Achamrah ^{1,2,3}, Liliana Belmonte ^{1,2,3}, Asma Amamou ^{1,2}, Séverine Nobis ^{1,2}, Alexis Goichon ^{1,2}, Emmeline Salameh ^{1,2}, Wafa Bahloul ^{1,2}, Jean-Luc do Rego ^{2,4}, Pierre Déchelotte ^{1,2,3} and Moïse Coëffier ^{1,2,3,*}

¹ UNIROUEN, INSERM UMR 1073 "Nutrition, Inflammation and Gut-Brain Axis", Normandie University, 76183 Rouen, France; cle.lhuillier@gmail.com (C.L.); marine.jarbeau@univ-rouen.fr (M.J.); najate.achamrah@chu-rouen.fr (N.A.); liliana.belmonte@chu-rouen.fr (L.B.); asma.amamou@etu.univ-rouen.fr (A.A.); severine.nobis@univ-rouen.fr (S.N.); alexis.goichon@univ-rouen.fr (A.G.); emmeline.salameh@etu.univ-rouen.fr (E.S.); wafa.bahloul@etu.univ-rouen.fr (W.B.); pierre.dechelotte@chu-rouen.fr (P.D.)

² Institute of Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), UNIROUEN, Normandie University, 76183 Rouen, France; jean-luc.do-rego@univ-rouen.fr

³ Department of Nutrition, Rouen University Hospital, 76183 Rouen, France

⁴ Animal Behavior Facility, SCAC, UNIROUEN, 76183 Rouen, France

* Correspondence: moise.coeffier@univ-rouen.fr; Tel.: +33-235148240

Received: 16 May 2019; Accepted: 13 June 2019; Published: 15 June 2019



Abstract: Background: During activity-based anorexia (ABA) in mice, enhanced paracellular permeability and reduced protein synthesis have been shown in the colon while the gut–brain axis has received increasing attention in the regulation of intestinal and mood disorders that frequently occur during anorexia nervosa, a severe eating disorder for which there is no specific treatment. In the present study, we assessed the effects of oral glutamine (Gln) or branched-chain amino acids (BCAA) supplementation during ABA to target intestinal functions, body composition and feeding behavior. Methods: C57BL/6 male mice were randomized in Control (CTRL) and ABA groups. After ABA induction, mice received, or not, either 1% Gln or 2.5% BCAA (Leu, Ile, Val) for one week in drinking water. Results: Neither Gln nor BCAA supplementation affected body weight and body composition, while only Gln supplementation slightly increased food intake. ABA mice exhibited increased paracellular permeability and reduced protein synthesis in the colonic mucosa. Oral Gln restored colonic paracellular permeability and protein synthesis and increased the mucin-2 mRNA level, whereas BCAA did not affect colonic parameters. Conclusion: In conclusion, oral Gln specifically improves colonic response during ABA. These data should be further confirmed in AN patients.

Keywords: glutamine; Branched-chain amino acids; Activity-Based Anorexia; Intestinal permeability

1. Introduction

Anorexia nervosa (AN) belongs to eating disorders (ED), as described in the fifth edition of *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-V) [1]. AN is a multifactorial disease in which young women are predominantly represented, as shown in a recent study [2]. Considering DSM-V, AN is mainly characterized by severe weight loss (BMI <18.5 kg·m⁻²), persistence of the inability to change behaviors in a way that resolves the weight loss and the lack of recognition of the seriousness of body weight. Mortality in AN is around 1–4% [3] due to its comorbidity with other

RESUME :

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est un trouble fonctionnel d'origine multifactorielle, impliquant des facteurs environnementaux tels que le stress, l'alimentation et met en jeu un dysfonctionnement de l'axe intestin-cerveau, une micro-inflammation, une dysbiose et une hyperperméabilité intestinale. Le rôle du protéasome dans la régulation de la barrière intestinale au cours du SII a été étudié. De plus, ces troubles fonctionnels intestinaux (TFI) ont également été décrits comme exacerbés chez des patients souffrant d'obésité, dont la physiopathologie est complexe. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans cette association restent mal compris et ont donc été recherchés.

Dans ce travail, des modèles murins « SII-like » comme le modèle de stress « *water avoidance stress* » ou WAS et le modèle post-inflammatoire « post-TNBS » ont été utilisés afin d'étudier l'impact d'une inhibition du protéasome sur la régulation de la perméabilité intestinale. L'inhibition pharmacologique du protéasome par le PR-957 ou l'utilisation de souris invalidées pour une sous unité $\beta 2i$ du protéasome limite l'hyperperméabilité intestinale. Une supplémentation orale en glutamine permet également de diminuer la perméabilité intestinale. Une étude protéomique au niveau colique des souris WAS et une étude de l'ubiquitome colique de patients souffrant de SII à profil diarrhéique confirment l'implication du protéasome dans la physiopathologie du SII.

Nous avons ensuite cherché à comprendre le lien entre l'obésité et le SII en combinant des modèles d'obésité (génétique et induite par une alimentation riche en graisses ou HFD) et le modèle WAS. Seules les souris HFD présentent une exacerbation de l'hyperperméabilité intestinale et une corticostéronémie plasmatique élevée en réponse au modèle WAS. Des études complémentaires suggèrent que ces résultats sont indépendants de la leptine, de la glycémie et du microbiote intestinal.

Nos travaux proposent donc de nouvelles pistes de prise en charge des patients souffrant de SII, par intervention nutritionnelle via la glutamine ou en utilisant le protéasome comme cible thérapeutique. Nous suggérons également un rôle de l'alimentation (riche en graisse) dans le développement des TFI au cours de l'obésité.

MOTS CLES : Syndrome de l'intestin irritable, Obésité, WAS, Perméabilité intestinale, Protéasome.

ABSTRACT :

Title of the thesis : Regulation of intestinal permeability during irritable bowel syndrome: role of proteasome and impact of obesity.

Irritable bowel syndrome (IBS) is a multifactorial functional disorder, involving environmental factors (stress and diet for instance), gut-brain-axis dysfunction, micro-inflammation, dysbiosis and an alteration of intestinal permeability. The role of the proteasome in the regulation of the intestinal barrier during IBS has been studied. In addition, these intestinal functional disorders have also been described in patients with obesity. Nevertheless, the mechanisms underlying an association of intestinal functional disorders in the obesity context, remain poorly understood and have therefore been investigated in this thesis.

In this study, "*IBS-like*" mouse models such as water avoidance stress (WAS) and the post-inflammatory (post-TNBS) models, were used to study the impact of proteasome inhibition on the regulation of intestinal permeability. We found that the pharmacological inhibition of the proteasome (with PR-957) or the use of knock-out mice for a subunit of the proteasome ($\beta 2i^{-/-}$) limit intestinal hyperpermeability occurred in IBS-Like models. Moreover, we found that oral supplementation with glutamine also reduces intestinal hyperpermeability, which, thus, can be considered as a putative nutritional treatment for IBS. A colonic proteomic study of WAS mice and a study of colonic ubiquitoma in IBS patients with diarrheal profiles confirmed the involvement of proteasome in the pathophysiology of IBS.

Therefore, the link between obesity and IBS was examined by combining models of obesity (ob/ob genetic and high-fat diet [HFD] models) with WAS model. Only HFD mice displayed enhanced intestinal hyperpermeability and higher plasma corticosterone levels in response to WAS. Further studies suggest that these results, themselves, are independent of leptin, glycaemia and gut microbiota.

This study paves new ways of treating patients suffering from IBS, by nutritional intervention via glutamine or by using the proteasome as a therapeutic target. We also suggest a role of diet (high fat) in the development of intestinal functional disorders during obesity.

KEYWORDS: Irritable bowel syndrome, Obesity, WAS, Intestinal permeability, Proteasome.

RESUME :

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est un trouble fonctionnel d'origine multifactorielle, impliquant des facteurs environnementaux tels que le stress, l'alimentation et met en jeu un dysfonctionnement de l'axe intestin-cerveau, une micro-inflammation, une dysbiose et une hyperperméabilité intestinale. Le rôle du protéasome dans la régulation de la barrière intestinale au cours du SII a été étudié. De plus, ces troubles fonctionnels intestinaux (TFI) ont également été décrits comme exacerbés chez des patients souffrant d'obésité, dont la physiopathologie est complexe. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans cette association restent mal compris et ont donc été recherchés.

Dans ce travail, des modèles murins « SII-like » comme le modèle de stress « *water avoidance stress* » ou WAS et le modèle post-inflammatoire « post-TNBS » ont été utilisés afin d'étudier l'impact d'une inhibition du protéasome sur la régulation de la perméabilité intestinale. L'inhibition pharmacologique du protéasome par le PR-957 ou l'utilisation de souris invalidées pour une sous unité $\beta 2i$ du protéasome limite l'hyperperméabilité intestinale. Une supplémentation orale en glutamine permet également de diminuer la perméabilité intestinale. Une étude protéomique au niveau colique des souris WAS et une étude de l'ubiquitome colique de patients souffrant de SII à profil diarrhéique confirment l'implication du protéasome dans la physiopathologie du SII.

Nous avons ensuite cherché à comprendre le lien entre l'obésité et le SII en combinant des modèles d'obésité (génétique et induite par une alimentation riche en graisses ou HFD) et le modèle WAS. Seules les souris HFD présentent une exacerbation de l'hyperperméabilité intestinale et une corticostéronémie plasmatique élevée en réponse au modèle WAS. Des études complémentaires suggèrent que ces résultats sont indépendants de la leptine, de la glycémie et du microbiote intestinal.

Nos travaux proposent donc de nouvelles pistes de prise en charge des patients souffrant de SII, par intervention nutritionnelle via la glutamine ou en utilisant le protéasome comme cible thérapeutique. Nous suggérons également un rôle de l'alimentation (riche en graisse) dans le développement des TFI au cours de l'obésité.

MOTS CLES : Syndrome de l'intestin irritable, Obésité, WAS, Perméabilité intestinale, Protéasome.