



HAL
open science

**Conception d'un produit alimentaire aux propriétés
santé constantes basée sur la caractérisation des effets
positifs sur la sphère digestive d'une matrice
naturellement riche en lysozyme : le lait d'ânesse**

Sophie Yvon

► **To cite this version:**

Sophie Yvon. Conception d'un produit alimentaire aux propriétés santé constantes basée sur la caractérisation des effets positifs sur la sphère digestive d'une matrice naturellement riche en lysozyme : le lait d'ânesse. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2017. Français. NNT : 2017INPT0129 . tel-04228564

HAL Id: tel-04228564

<https://theses.hal.science/tel-04228564>

Submitted on 4 Oct 2023

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme SOPHIE YVON

le vendredi 1 décembre 2017

Titre :

Conception d'un produit alimentaire aux propriétés santé constantes basée sur la caractérisation des effets positifs sur la sphère digestive d'une matrice naturellement riche en lysozyme: le lait d'ânesse

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

MME HÉLÈNE EUTAMENE

MME MAGALI PETER

Rapporteurs :

Mme MURIEL THOMAS, INRA JOUY EN JOSAS

Mme SYLVIE LORTAL, INRA RENNES

Membre(s) du jury :

Mme VASSILIA THEODOROU, EI PURPAN, Président

M. FRANCOIS-XAVIER MARTIN, INSTITUT NATIONAL ANE ET MULET, Membre

Mme HÉLÈNE EUTAMENE, EI PURPAN, Membre

Mme MAGALI PETER, EI PURPAN, Membre

À mes anges gardiens, « mes étoiles »,

Monique LARRIEU,

Marie-Thérèse YVON,

Joseph LARRIEU,

Lucien YVON,

Pascal BORREDON-LARRIEU,

Laurent YVON,

Raymond LARRIEU.

« A cœur vaillant, rien d'impossible »,

Jacques Cœur

REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre l'équipe « Agroalimentaire » de l'Ecole Ingénieurs de Purpan, et l'équipe « Neuro-Gastroentérologie & Nutrition » de l'INRA Toxalim et a été financé par l'INAM (Institut National Âne et Mulet) et l'Ecole Ingénieurs de Purpan. Je souhaite donc en premier lieu remercier François-Xavier Martin et Jean Daydé pour m'avoir fait confiance et donné la possibilité de mener à bien ce projet.

J'aimerais vivement remercier les rapporteurs Sylvie Lortal et Muriel Thomas d'avoir accepté de juger ce travail. Merci à Vassilia Théodorou d'avoir accepté d'être le président de ce jury.

Je tiens à remercier du plus profond de mon cœur ma directrice de thèse Hélène Eutamène. C'est non sans émotion que je vous écris ces quelques lignes. Je vous remercie pour tout. Il n'y a pas de mots qui puissent résumer ces années passées à vos côtés, que ce soit pour le master 2, pour le contrat d'assistant ingénieur ou pour la thèse. Ces moments ont été très enrichissants et peut-être qu'un jour nous serons amenées à retravailler ensemble. Je tiens également à remercier ma co-directrice de thèse Magali Peter pour ses conseils, ses encouragements et sa sympathie.

Je remercie Vassilia Théodorou de m'avoir accepté dans son équipe de recherche « Neuro-Gastroentérologie & Nutrition » dès janvier 2013, dans le cadre de mon stage de Master 2 « Elaboration de la qualité et de la sécurité des aliments ». C'était un honneur de travailler dans ton équipe durant ces années. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Ta bonne humeur et ton enthousiasme sont un vrai plus dans l'équipe.

Je remercie aussi Corinne Bayourte, Thierry Piche et Frédéric Gaucheron d'avoir participé activement à mes comités de thèse, des nombreux conseils que vous avez pu me donner et du temps que vous avez pu me consacrer.

Je souhaite associer à ces remerciements, tous mes collègues de travail : Premièrement, ceux de l'EI Purpan. Djamila Lekhal, Gwenaëlle Jard, Hélène Tormo, Loubnah Belahsen, Christel Couderc et Julien Grimoud, j'ai été ravie de travailler à vos côtés à la halle de technologie alimentaire de l'EI-Purpan. Je vous remercie également pour votre implication sur la partie concernant la technologie alimentaire.

Mes collègues de NGN : une sacrée équipe ! J'adresse mes remerciements à Maiwenn Olier, Valérie Bézirard et Mathilde Levêque pour les aides techniques (microbiote, lysozyme ...) et également pour les moments de rire, le soutien et les bons mots ! A Muriel Mercier-Bonin, Hervé Robert et Laurent Ferrier, je vous remercie pour votre bonne humeur et vos conseils. J'adore prendre le café avec vous car à chaque fois nos débats et discussions sont enrichissants quel que soit le sujet ! Je remercie également vivement Christine Comera pour ses conseils et sa convivialité. J'adresse des chaleureux remerciements à Laurence Guzilack, Sandrine Ménard et Corinne Lencina. Merci pour les gâteaux, les pauses repas à la cantine, la piscine, la raclette, les fous-rires, ... Corinne je pense que tout thésard(e) devrait avoir sa « coco » pour décompresser ! Valérie Bacquié, je te remercie également pour nos moments détentes, j'aime discuter avec toi, que des bons moments ! De sincères remerciements vont

à Cathy Beaufrand, Valérie Tondereau pour leur soutien constant et leurs aides techniques sur le plateau EZOP. Et enfin, un grand merci à Valérie Mills.

Une pensée particulière à mes collègues thésards : Jasper Kamphuis, Yann Malaisé, Hanna Ilchmann et Kévin Gillois. C'est vraiment un privilège que d'être entouré d'autres doctorants, et encore plus par vous. J'ai particulièrement apprécié notre soutien mutuel, nos moments détentes, nos moments de stress et de craquage aussi ... Jasper, merci pour tout, ne lâche rien, et à très vite aux Pays Bas, à Toulouse, en Australie, ou au Mexique ! Yann, un très grand merci pour ton soutien sans faille ! Je compte bien venir te voir au Canada. Hanna je t'envoie pleins de bonnes ondes pour le bon déroulement de ta thèse, bien que je ne me fasse pas vraiment de soucis à ce sujet. Et Kévin, je te souhaite ta thèse se déroule à merveilles, tu verras c'est une sacrée aventure ! Fanny, tu as un talent incroyable pour supporter les doctorants en fin de thèse ! Merci aussi pour tous ces bons moments passés à nos côtés. Je te remercie aussi pour ton aide technique sur le plateau EZOP. Une pensée pour Thomas Haurint également qui a su bien s'intégrer en si peu de temps au sein de l'équipe, change rien et bon courage pour ta prépa !

Je remercie également Lauriane Schwebel, qui a réalisé son stage avec brio à mes côtés. Je te souhaite que de belles choses pour la suite.

J'aimerais également remercier les « anciens », ceux qui ont eu un passage à NGN et qui maintenant continuent leurs routes ! Je pense à Alain Marrot, Ambre Riba, Stéphanie Da Silva, Sarah Bettini, Marion Gillet, Cherryl Harkat, Delphine Payros, Nabila Moussaoui, Isabelle Olivier, Guylène Feuillet, ... J'ai passé d'agréables moments en votre compagnie, vous m'avez servi d'exemple et vous manquez au quotidien du labo. Ambre, Stéphanie et Marion au-delà du labo, c'est une sincère amitié qui est née.

J'adresse également de sincères remerciements à Laurent Augier, Agathe Olive et Dominique Faveur de Agri Sud-Ouest Innovation. J'ai adoré m'impliquer aux sessions du club « Nourrir les hommes, alimenter l'industrie », j'ai beaucoup appris à vos côtés. Je vous remercie également de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de participer au «*16th International Nutrition & Diagnostics Conference* ».

Je remercie vivement Matthieu Pouget, Clément Varennes, Alice Duquesnoy, Valeria Medina et Johan Langot pour m'avoir formé/accompagné lors de mes aventures en parallèle de la thèse. Je pense notamment à la préparation au concours « *Ma thèse en 180 secondes* » (c'était génial !), à la nuit européenne des chercheurs (avec notre super stand dédié aux tout-petits), à la fête de la science, au *Bright Club*, au *Science Comedy Show* (de l'humour et de la science, j'adore le concept), et enfin à *Pint of Science* (de la bière et de la science, j'adooore le concept) !

Enfin je remercie tous les producteurs de lait d'ânesse avec qui j'ai travaillé, avec une mention spéciale à Cécile et Emmanuel Guichard de la ferme du Hitton, ainsi que leurs ânesses (Sidonie, Ornella, Bahia, Utopie, Rasta, Violette, Vic, Leda, Biscotte, et Maria) !

Et parce que la thèse n'est pas qu'une aventure scientifique, j'aimerais adresser des remerciements sur le plan personnel.

A mes amis,

Ceux qui sont là depuis le début, ceux qui sont rentrés dans ma vie plus récemment, ceux qui partagent ma passion de la moto et du Rock, les MABS, les OCPs ... Merci pour tous ces moments, ces voyages autour du monde, ces concerts ... Ces instants sont très importants pour moi et les passer en votre compagnie les rendent d'autant plus plaisants. Vous êtes mon rock'n'roll, mon adrénaline.

A ma famille,

A tous mes tontons, mes tatas, mes cousins, mes cousines, mes petit-cousins et petite-cousines. Vous êtes mon oxygène. Cette complicité qui nous lie est rare et précieuse. Je suis fière de ma famille, vous êtes aussi mes amis. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous faites pour moi. Vous m'avez toujours donné le courage de continuer dans les moments de doute. Je vous porte sincèrement dans mon cœur, et j'avoue que de vous écrire ces quelques mots m'émeut. Restez près de moi, j'ai besoin de vous.

Jérémy, Sarah, Léo : Une pensée pour vous, je vous souhaite que du bonheur pour la suite. « Super-Tata ».

Julien, mon petit frère. Ça y'est : ta grande sœur a enfin fini ses études. Je te remercie vraiment pour tout. J'adore notre complicité, nos moments à nous, et nos petits secrets. Merci d'avoir toujours répondu présent lorsque le moment se faisait ressentir.

Papa, toujours fier de sa fille. Merci de m'avoir inculqué tes valeurs et de m'avoir permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui. Merci de toujours me redonner confiance quand je doute. Tu es un des principaux piliers de ma vie. Et je ne me laisserai jamais de danser avec toi.

Maman, ma confidente, ma super-copine, ma sœur, ma crazy-mother. Merci d'être toujours là quand il le faut, peu importe la raison. Merci pour cette relation mère-fille hors du commun. Je suis fière de t'avoir comme maman, et de partager avec toi tous ces moments.

MERCI !

RESUME

Les pathologies intestinales sont des maladies multifactorielles dont l'incidence ne cesse d'augmenter. Les maladies organiques regroupent les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin tel que la maladie de Crohn (MC) et les pathologies fonctionnelles digestives comprennent les différentes formes du syndrome de l'intestin irritable (SII). Ces pathologies présentent des caractéristiques communes comme des troubles du transit, des douleurs abdominales, un dysfonctionnement de la barrière intestinale et des modifications de la communication bidirectionnelle de l'axe intestin-cerveau et une altération de la composition du microbiote intestinal (dysbiose). Cette dernière peut être en partie associée à un déficit de production en peptides et protéines antimicrobiennes (PAMs) par les cellules de Paneth. Parmi les cibles thérapeutiques stratégiques, une réduction de la dysbiose dans le but de réduire l'état inflammatoire ou micro-inflammatoire de la muqueuse font aujourd'hui l'objet de différentes études. Ces traitements alternatifs montrent l'efficacité d'un régime nutritionnel adapté, d'un apport en probiotiques ou en prébiotiques sur le microbiote intestinal des patients MC et SII, et sur l'intégrité de leur barrière intestinale. Parmi les matrices alimentaires présentant une composition nutritionnelle intéressante proche du lait maternel humain, le lait d'ânesse (LA) contient également une forte teneur en PAMs (lysozyme). En parallèle, un observatoire économique et social de la filière asine commandité par l'Institut National Âne et Mulet fait le diagnostic d'une activité grandissante autour du LA chez les éleveurs français et montre, face à une concurrence italienne et chinoise importante, la nécessité d'une meilleure organisation de la filière via une meilleure valorisation du LA.

L'objectif de cette thèse était d'évaluer un potentiel effet santé du LA et d'apporter des preuves scientifiques robustes pour permettre une meilleure valorisation de ce dernier. Ainsi, l'effet d'une consommation orale chronique de LA a été évalué sur deux modèles précliniques murins distincts : un modèle d'iléite expérimentale induite par une administration *per os* d'indométacine et un modèle de stress psychologique chronique (*Water Avoidance Stress, WAS*). Dans ce travail, le rôle clé de l'activité du lysozyme dans les effets observés a également été évalué. Des essais de traitements thermiques ont aussi été réalisés pour optimiser un barème de pasteurisation permettant de proposer un LA répondant aux normes réglementaires microbiologiques et sanitaires tout en conservant l'activité du lysozyme contenue dans le lait.

Les travaux de cette thèse montrent que le LA possède des propriétés anti-inflammatoires se traduisant par une réduction significative des lésions inflammatoires macroscopiques et microscopiques de l'iléon. Cet effet est associé à une réduction de la dysbiose intestinale et normalise les niveaux de PAMs dans les cellules de Paneth drastiquement réduits lors de l'iléite. Dans le modèle WAS, le LA et la fraction contenant l'activité en lysozyme réduisent l'hypersensibilité viscérale, l'état micro-inflammatoire induites par le stress et restaurent les niveaux de PAMs dans les cellules de Paneth réduits par le stress. Un traitement thermique de 2 min/72°C permet d'augmenter la durée de vie du LA tout en conservant l'activité du lysozyme et ses propriétés santé sur la muqueuse intestinale chez la souris

ABSTRACT

Gut pathologies are multifactorial with a constant increasing incidence. Organic diseases include inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease (CD) and functional pathologies include various subtypes of irritable bowel syndrome (IBS). These pathologies present common features such as transit disorders, abdominal pain, dysfunction of the intestinal barrier associated with bidirectional gut-brain axis modifications and alterations of the gut microbiota composition (dysbiosis). Dysbiosis is generally associated with a lack of production of antimicrobial peptides and proteins (AMPs) by Paneth cells. Among the alternative treatment strategies, it has been proposed to reduce gut inflammation by correcting intestinal dysbiosis. Recent studies show the efficacy of a suitable diet, probiotics or prebiotics interventions on gut microbiota and on the integrity of their intestinal barrier in CD and IBS patients. Among interesting food matrices, donkey milk (DM) is a good candidate with a nutritional composition close to human breast milk and contains high levels of AMPs like lysozyme.

An economic and social observatory of the donkey industry was ordered by the Institut National Âne et Mulet for a better support of growing French activity around DM against Italian and Chinese competitions.

The objective of this thesis was to evaluate the potential beneficial healthy effect of DM and to provide robust scientific evidences for a better valorization of this product. Thus, the effect of chronic oral intake of DM was evaluated on two distinct murine preclinical models: a model of experimental ileitis induced by an oral administration of indomethacin and a model of chronic psychological stress (Water Avoidance Stress, WAS). In these studies, the key role of lysozyme activity in the observed effects was highlighted. In order to develop the DM market in France, thermal treatments have been carried out to optimize a pasteurization process to obtain a DM in accordance with the regulatory microbiological and sanitary standards while preserving the activity of the lysozyme contained in milk.

The work of this thesis shows that DM exerts anti-inflammatory properties resulting in a significant reduction of the macroscopic and microscopic inflammatory lesions of the ileum. This effect is associated with a reduction of gut dysbiosis while normalizing the level of drastically reduced AMPs contained Paneth cells in the ileitis model. In the WAS model, DM and the fraction containing activity of lysozyme reduce visceral hypersensitivity, stress-induced gut micro-inflammatory status and also restore the level of AMPs in Paneth cells . A heat treatment at 2 min/72 °C allows to increase the shelf-life of DM while preserving the activity of lysozyme and its gut beneficial healthy properties in mouse.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES & DISTINCTIONS

Articles scientifiques

Réalisés dans le cadre de la thèse :

- ❖ Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of Crohn's disease ileitis-like in mice. **Sophie Yvon**, Maiwenn Olier, Mathilde Leveque, Gwenaëlle Jard, Helene Tormo, Djamila Ali Haimoud-Lekhal, Magali Peter, Hélène Eutamène.
Accepted and published in *European Journal of Nutrition*, 2016.
- ❖ Lysozyme fraction from donkey milk (DM) supports visceral antinociceptive properties of DM, reduces protease activity and restores antimicrobial levels in Paneth cells in a model of chronic stress in mice. **Sophie Yvon**, Mathilde Levêque, Valérie Bézirard, Maiwenn Olier, Gwenaëlle Jard, Djamila Ali Haimoud-Lekhal, Magali Peter, Helene Eutamene.
Article in preparation.
- ❖ Saving lysozyme activity upon an optimized heat-treated conservation process of donkey milk preserves gut mucosa damage in stressed mice. **Sophie Yvon**, Lauriane Schwebel, Christel Couderc, Loubnah Belahcen, Helene Tormo, Magali Peter, Djamila Ali Haimoud – Lekhal, Hélène Eutamene, Gwenaëlle Jard. Submitted in *Molecular Nutrition and Food Research*.

Autres articles scientifiques:

- ❖ Luminal contents from the gut of colicky infants induce visceral hypersensitivity in mice. Eutamène H, Garcia-Rodenas CL, **Yvon S**, d'Aldebert E, Foata F, Berger B, Sauser J, Theodorou V, Bergonzelli G, Mas E. Accepted and published in *Neurogastroenterology & Motility*, 2017.
- ❖ Maternal high-fat diet and early-life stress differentially modulate spine density and dendritic morphology in the medial prefrontal cortex of juvenile and adult rats. Marion Rincel, Amandine L. Lépinay, Yootana Janthakhin, Gwenaëlle Soudain, **Sophie Yvon**, Stéphanie Da Silva, Corinne Joffre, Agnès Aubert, Alexandra Séré, Sophie Layé, Vassilia Theodorou, Guillaume Ferreira, Muriel Darnaudéry. Accepted and published in *Brain structure & Function*, 2017.

Communications orales

- ❖ Caractérisation des effets santé du lait d'ânesse et de ses constituants en vue de l'élaboration d'un produit alimentaire. **Sophie Yvon**, Magali Peter, Mathilde Leveque, Valerie Tondereau, Gwenaëlle Jard, Helene Tormo, Mireille Gaucher, Frederic Violleau, Djamila Ali Haimoud-Lekhal, Helene Eutamene.
Journée de restitution des travaux de l'INAM, Paris, 29 avril 2015.

- ❖ Etude des propriétés anti-inflammatoires d'une matrice alimentaire riche en peptides antimicrobiens sur un modèle d'iléite chez la souris. **Sophie Yvon**, Magali Peter, Mathilde Leveque, Valerie Tondereau, Gwenaëlle Jard, Helene Tormo, Mireille Gaucher, Frederic Violleau, Djamila Ali Haimoud-Lekhal, Helene Eutamene. Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (GFNG), Lyon, 25-26 juin 2015.
- ❖ Lysozyme contained in donkey milk counteracts stress-induced functional gastrointestinal disorders in mice. **Sophie Yvon**. International Nutrition and Diagnostic Conference (INDC), Prague, Czech Republic, 3-6th October 2016.
- ❖ Anti-inflammatory properties of donkey milk and development of a food product for human consumption. **Sophie Yvon**, Les Graines de Toxalim, Toulouse, 3 février 2017.

Communications affichées

- ❖ Propriétés anti-inflammatoires du lait d'ânesse sur un modèle d'iléite chez la souris. **Sophie Yvon**, Magali Peter, Mathilde Leveque, Valerie Tondereau, Gwenaëlle Jard, Helene Tormo, Mireille Gaucher, Frederic Violleau, Djamila Ali Haimoud-Lekhal, Helene Eutamene. Poster, Journées francophones de Nutrition (JFN), Bruxelles, 10-12 Décembre 2014.
- ❖ Propriétés anti-inflammatoires d'une matrice riche en lysozyme sur un modèle d'iléite chez la souris. **S. Yvon**, M. Peter, M. Leveque, G. Jard, H. Tormo, M. Gaucher, F. Violleau, D. Ali Haimoud-Lekhal, H. Eutamène. Poster, Journées Francophones d'Hépatologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD), Paris, 19-22 mars 2015.
- ❖ Caractérisation des effets santé du lait d'ânesse et élaboration d'un produit alimentaire conservant ces effets. **Sophie Yvon**, Magali Peter, Maiwenn Olier, Mathilde Levêque, Hélène Eutamène. Poster, Journée Inauguration de la halle technologique agroalimentaire de Purpan, Toulouse, 18 septembre 2015.
- ❖ A natural food matrix containing high levels of lysozyme exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of Crohn's disease ileitis-like in mice. **Sophie Yvon**, Maiwenn Olier, Mathilde Leveque, Gwenaëlle Jard, Helene Tormo, Djamila Ali Haimoud-Lekhal, Magali Peter, Helene Eutamene. Poster, Digestive Disease Week, 21-24th May 2016, San Diego.
- ❖ Lysozyme fraction from donkey milk (dm) supports visceral antinociceptive properties of dm, reduces protease activity and restores antimicrobial levels in paneth cells in a model of chronic stress in mice. **Sophie Yvon**, Valérie Bézirard, Valérie Tondereau, Cherryl Harkat, Gwenaëlle Jard, Hélène Tormo, Djamila Ali Haimoud-Lekhal, Magali Peter, Helene Eutamene. United European Gastroenterology Week (UEGW), Vienna, Austria, 15-19th October 2016.

Prix & Distinctions

- ❖ Gagnante du “**Tremplin Jeunes Chercheurs**” 2015, organisé par Agri Sud-Ouest Innovation :
 - Adhésion au club « Nourrir les hommes, Alimenter l’industrie »
 - Bourse de voyage pour participer au congrès « International Nutrition and Diagnostic Conference » en octobre 2016 à Prague.

- ❖ Lauréate de la finale régionale Midi-Pyrénées du concours de vulgarisation scientifique « **Ma thèse en 180 secondes** » 2017. *1^{er} prix du jury et 1^{er} prix du public.*

- ❖ Membre du **Bright Club**, club de comédie scientifique composé de doctorants.

- ❖ Membre du **Science Comedy Show**, composé de doctorants, docteurs, post-doc et comédiens.
Une co-production Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées et Kalos Prod.

- ❖ Bénévole au sein de l’association **Pint of Science** (organisatrice événementiel).

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
RESUME	5
ABSTRACT	7
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES & DISTINCTIONS	9
Articles scientifiques	9
Communications orales	9
Communications affichées.....	10
Prix & Distinctions.....	11
TABLE DES MATIERES	13
LISTE DES ILLUSTRATIONS	17
LISTE DES TABLEAUX	19
ABREVIATIONS.....	20
INTRODUCTION GENERALE	23
CHAPITRE I : Maladies chroniques digestives : Facteurs distincts et facteurs communs et confondants	27
1. La maladie de Crohn (MC).....	27
1.1 Epidémiologie de la maladie de Crohn	28
1.2 Facteurs génétiques impliqués dans la maladie de Crohn	29
2. Le syndrome de l'intestin irritable (SII).....	29
2.1 Epidémiologie du syndrome de l'intestin irritable	30
2.2 Facteurs génétiques et syndrome de l'intestin irritable	31
3. Facteurs communs et confondants impliqués dans la MC et le SII	32
3.1 Le microbiote intestinal.....	32
3.2 Facteurs environnementaux.....	38
3.2.A Facteurs alimentaires.....	38

3.2.B Le stress.....	39
3.3 La barrière intestinale.....	40
3.3.A La barrière physique	41
3.3.B La barrière immunologique.....	47
3.4 Communication bidirectionnelle : Microbiote– Intestin – Cerveau	55
3.4.A Le système nerveux entérique.....	56
3.4.B La sensibilité viscérale	57
3.4.C Stress et douleur viscérale	58
CHAPITRE II : Modèles expérimentaux d’inflammation et de stress chez les rongeurs	63
1. Les modèles d’inflammation digestive.....	63
1.1 Modèles d’inflammation spontanée	63
1.1.A Souris C3H/HeJ Bir.....	63
1.1.B Souris SAMP/Yit.....	63
1.2 Modèles génétiquement modifiés	64
1.2.A Les souris IL-2 ^{-/-}	64
1.2.B Les souris Muc2 ^{-/-}	64
1.2.C Les souris IL-10 ^{-/-}	65
1.2.D Les souris Stat-3 ^{-/-}	65
1.3 Modèles chimio-induits	65
1.3.A Dextran Sulfate Sodium (DSS).....	66
1.3.B Acide Trinitro-benzene sulfonique (TNBS).....	66
1.3.C <i>Toxoplasma gondii</i> et <i>Giardia muris</i>	66
1.3.D Indométacine	67
2. Les modèles de stress	67
2.1 Le rat Wistar-Kyoto.....	68
2.2 Les stress aigus	68
2.2.A Le stress acoustique	68

2.2.B Le stress de contention/immobilisation	69
2.3 Les stress chroniques.....	69
2.3.A Le stress de séparation maternelle.....	69
2.3.B Le stress d'évitement passif de l'eau ou <i>Water Avoidance Stress</i> (WAS).....	70
CHAPITRE III : Stratégies alternatives visant à moduler le microbiote intestinal pour une amélioration de la qualité de vie des patients en rémission de la MC et du SII.....	71
1. Les antibiotiques.....	71
2. Les probiotiques	71
3 Les prébiotiques.....	73
4. Les symbiotiques	74
5. Produits fermentés sources de peptides bioactifs	75
CHAPITRE IV : Le lait d'ânesse, une matrice alimentaire riche en peptides antimicrobiens	77
1. Histoire.....	77
2. Le lait d'ânesse aujourd'hui : contexte mondial et productions	78
2.1 La production mondiale industrielle.....	78
2.2 La production de lait d'ânesse française	79
3. Caractéristiques biochimiques du lait d'ânesse.....	80
3.1 Composition générale du lait d'ânesse	80
3.2 Focus sur les protéines solubles	83
- L'α-lactalbumine	83
- Le Lysozyme	84
- La β-lactoglobuline	85
- La lactoferrine	86
- Les immunoglobulines	86
- La lactoperoxydase.....	87
Synthèse de peptides bioactifs liés à la dégradation	87
4. Composition microbiologique et réglementation sanitaire du lait d'ânesse	88

4.1 Qualité microbiologique du lait d'ânesse	88
4.2 Réglementation sanitaire	89
5. Propriétés santé du lait d'ânesse	89
5.1 Alternative aux allergies aux protéines du lait de vache (APLV)	89
5.2 Effet anti-tumoral et anti-viral du lait d'ânesse <i>in vitro</i>	90
5.3 Réponse immuno-modulatrice et activité antimicrobienne du lait d'ânesse	90
6. Transformation alimentaire du lait d'ânesse	91
6.1 Congélation du lait d'ânesse cru.....	91
6.2 Du lait d'ânesse en poudre : la lyophilisation.....	91
6.3 Du lait d'ânesse en bouteille : Pasteurisation	92
6.4 Fermentation du lait d'ânesse	92
DEFINITION DES OBJECTIFS ET DEMARCHE EXPERIMENTALE	93
RESULTAT I :	96
RESULTAT II.....	111
RESULTAT III.....	146
DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	178
RÉFÉRENCES:	191
Annexe 1 : Short communication lors des Journées Francophones de Nutrition 2014 publiée dans « <i>Nutrition clinique et métabolisme</i> ».....	229
Annexe 2 : Short communication lors du Digestive Disease Week 2016	230
Annexe 3 : Agrément préfectoral	231
Annexe 4 : Accréditation FELASA « <i>Utilisation et protection de l'animal de laboratoire</i> » fournie par l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.....	232
Annexe 5 : Accréditation chirurgie « <i>Chirurgie générale de l'animal de laboratoire</i> » fournie par l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.....	234
Annexe 6 : Récapitulatif de participation aux formations dans le cadre du doctorat.	235

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Incidence et prévalence mondiale de la maladie de Crohn (Molodecky et al., 2012)	28
Figure 2 : Prévalence mondiale du syndrome de l'intestin irritable (Canavan et al., 2014).	31
Figure 3 : Distribution et abondance de bactéries dans le tractus gastro-intestinal humain. (Adapté de (Sartor, 2008))	33
Figure 4 : Composition du microbiote intestinal dominant, sous dominant et transitoire (Payros 2012).	34
Figure 5 : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique des bactéries résidant dans le côlon montrant l'abondance relative des phyla majoritaires du microbiote intestinal humain. Entre parenthèse, la proportion des différents phyla dans le microbiote intestinal. (Cheng et al., 2011)	35
Figure 6 : Les facteurs impliqués dans les pathologies digestives de type MC et SII. (Adapté de (Ananthkrishnan, 2015)).....	38
Figure 7 : Structure et organisation du tube digestif et son système nerveux entérique. (Adapté de Schoolbag.info).....	40
Figure 8 : L'épithélium intestinal et les cellules qui le composent. (Adapté de StemCell.com)	41
Figure 9 : Les voies de passage des composés luminaux à travers l'épithélium intestinal : voie paracellulaire et transcellulaire. (Adapté de (Ménard et al., 2010)).....	43
Figure 10 : Translocation de E. coli-GFP dans une villosité (Samel et al., 2002).	44
Figure 11 : Comparaison de la structure du mucus dans l'intestin grêle et le colon. (Adapté de Johansson, Larsson et al. 2011 et McGuckin, Linden et al. 2011).....	46
Figure 12 : Section longitudinale colorée du colon distal de rat contenant des fèces. Une couche de mucus stérile recouvre complètement la fèces.	46
Figure 13 : Réponse du système immunitaire innée basée sur la reconnaissance des PAMPs (Adapté de Valles et al., 2014).	47
Figure 14: Les TLRs et leurs ligands (Kawai and Akira, 2006).	48
Figure 15 : Libération des cytokines pro- et anti-inflammatoires en réponse aux métabolites microbiens.	50
Figure 16 : Le modèle de Shai-Matsuzak-Huagi concernant le mécanisme d'action des peptides antimicrobiens. Zaslouff et al., 2002.	51

Figure 17 : Les potentiels paramètres partagés dans la MC en rémission et le SII. (Adapté de (Spiller and Major, 2016)).....	55
Figure 18 : Douleur ressentie lors de l'hyperalgésie et de l'allodynie en fonction de l'intensité du stimulus (Gebbart 1999).....	57
Figure 19 : Caractérisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.	58
Figure 20 : Mécanisme d'action des protéases à sérine : D'origine microbienne ou mastocytaire, elles altèrent les jonctions épithéliales par un mécanisme activé par le récepteur PAR2, créant ainsi des défauts de barrière épithéliale conduisant à une perméabilité intestinale accrue. En outre, les sérines protéases activent le récepteur-2 activé par la protéinase sur les neurones sensoriels, induisant une hyperalgésie viscérale. (Adapté de (Barbara and Cremon, 2008))	60
Figure 21 : Les voies impliquées dans la communication bidirectionnelle entre le microbiota intestinal et le cerveau (Cryan and Dinan, 2012).	62
Figure 22 : Dispositif du Water Avoidance Stress (WAS).	70
Figure 23 : Mécanismes pour la libération de peptides bioactifs à partir de protéines de lait (Korhonen and Pihlanto, 2003).	75
Figure 24 : L'allaitement des nouveau-nés au pis de l'ânesse, à l'intérieur de l'étable de la nourricerie Parrot, F. Haenen, 1883.	77
Figure 25 : Le marchand de lait d'ânesse.	78
Figure 26 : Producteurs de lait d'ânesse en France en 2014. (Observatoire économique et social de l'INAM, 2014).	80
Figure 27: Structure tridimensionnelle du lysozyme. A) Modèle original de à une résolution de 6 Å (Blake et al., 1965). B) Représentation en ruban (Walsh et al., 1998).....	84
Figure 28: Définition des objectifs de thèse et démarche expérimentale.....	93
Figure 29 : Design expérimental de la première étude.....	96
Figure 30 : Design expérimental de la deuxième étude.....	112
Figure 31 : Design expérimental de la troisième étude.	147
Figure 32 : Stimulation du système immunitaire (A) systémique au niveau de la rate et (B) local au niveau des plaques de Peyer par le lait d'ânesse en conditions physiologiques.	181
Figure 33 : Le lait d'ânesse stimule la sécrétion en peptides antimicrobiens et réduit l'inflammation iléale.	184

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères de Rome IV concernant le diagnostic lié à la physiopathologie du SII (Lacy et al., 2016).....	30
Tableau 2 : Composition biochimique du lait d'ânesse. Composé d'après Gaucheron et al, 2011, Salimei et al. 2012, Guo et al, 2007 et Aspri et al., 2017.	81
Tableau 3 : Concentration en vitamines du lait d'ânesse, lait humain et lait de vache. Composée à partir de (Aspri et al., 2017; Salimei and Fantuz, 2012; Uniacke-Lowe et al., 2010)	82
Tableau 4 : Concentration en minéraux du lait d'ânesse, lait humain et lait de vache. Composé à partir de (Aspri et al., 2017; Fantuz et al., 2012; Salimei and Fantuz, 2012)	83
Tableau 5: Homologies de séquence du lysozyme de lait d'ânesse, de femme, de jument, de vache et de blanc d'oeuf de poule. (Blast des séquences FASTA)	85

ABREVIATIONS

ACCG : acides gras à chaîne courte
AGS : Acides Gras Saturés
AGMI : Acides Gras Mono-Insaturés
AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés
ANOVA : ANalysis Of Variance
APLV: Allergie aux protéines du lait de vache
CARD15: Caspase-Activating Recruitment Domain 15
CRAMP: Cathelicidin Related Antimicrobial Peptide
CRH: Corticotropin Releasing Hormone
DC: Dendritic cell
DM: Donkey Milk (lait d'ânesse)
DSS: Dextran Sodium Sulfate
FISH: Fluorescent In Situ Hybridization
GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue
GULDA: GUT low-density array
HPA: hypothalamo-hypophyso-surrénalien
IFN γ : Interféron γ
Ig: Immunoglobuline
IL : Interleukine
INAM : Institut National Ânes et Mulets
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
JAM: Junctional Adhesion Molecule 9
LPS: LipoPolySaccharide
LRR: Leucin Rich Repeat
LT: Lymphocyte T
MAMP : Microbiota Associated Molecular Pattern
MC : Maladie de Crohn
MDP : Muramyl DiPeptide
CMHII : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MLC: Myosin Light Chain

MLCK: Myosin Light Chain Kinase
NK: Natural Killer
NOD: Nucleotide-binding Oligomerization Domain
PAM : Peptide ou Protéine Anti-Microbien
CP : Cellule de Paneth
PCA : Plate Count Agar (Gélose glucosée à l'extrait de levure)
PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase)
PRR: Pattern Recognition Receptor
RCH: Recto-Colite Hémorragique
RP-HPLC: Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography
SFB: Segmented Filamentous Bacteria
SIBO: Small Intestinal Bacterial Overgrowth
SII : Syndrome de l'Intestin Irritable
SNA : Système Nerveux Autonome
SNC : Système Nerveux Central
SNE : Système Nerveux Entérique
TD: Tractus Digestif
TFF: Trefoil Factor Family
TGF β : Transforming Growth Factor β
TLR: Toll Like Receptor
TNBS: 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
Toxalim: Toxicologie alimentaire
Treg : Lymphocyte T Régulateur
UFC: Unités Formant Côlonies
WAS: Water Avoidance Stress
ZO: Zonula Occludens

INTRODUCTION GENERALE

Le microbiote intestinal constitue un écosystème complexe dont l'impact sur la physiologie et la santé de l'Homme est de plus en plus décrit. Ces dernières années, l'implication du microbiote intestinal dans la physiopathologie des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) et des troubles digestifs fonctionnels tel que le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) a largement été mis en évidence. Ces pathologies digestives peuvent apparaître, se développer ou s'exacerber suite à la survenue d'événements stressants. L'implication du stress dans le déclenchement et/ou l'entretien de pathologies intestinales tels que le SII et les MICI a été largement décrit (Khan and Chang, 2010; Lerebours et al., 2007; North et al., 1990). Ces pathologies digestives multifactorielles sont caractérisées par une augmentation de la perméabilité intestinale (Gecse et al., 2008; Miki et al., 1998), de la sensibilité viscérale (Drossman, 1999; Zhou et al., 2009), d'une réponse humorale systémique contre les antigènes luminaux, en particulier vis-à-vis des antigènes bactériens (Cremon et al., 2008), d'une inflammation locale plus ou moins importante et d'une dysbiose (déséquilibre qualitatif et quantitatif de la composition du microbiote intestinal) (Forshammar et al., 2008). Aujourd'hui, la dysbiose intestinale est représentée comme une nouvelle entité en médecine retrouvée comme facteur commun dans plusieurs pathologies comme celles précitées. Chez ces patients, la dysbiose pourrait participer à l'activation du système immunitaire intestinal de façon directe ou indirecte via les motifs moléculaires associés à des agents pathogènes ou via les modifications induites dans cet écosystème intestinal.

Dans la maladie de Crohn (MC), un dysfonctionnement des cellules de Paneth serait lié à un déséquilibre de la flore intestinale (Kaser et al., 2011; Wehkamp and Stange, 2010). Les cellules de Paneth sont physiologiquement localisées au fond des cryptes des villosités de l'intestin et ont la capacité de sécréter des peptides antimicrobiens comme le lysozyme, l' α -défensine... Récemment, plusieurs travaux ont montré une diminution de l'expression des défensines dans les cellules de Paneth de patients atteints de MC (Lala et al., 2003; Wehkamp, 2004; Wehkamp et al., 2007). De même, des modulations de l'immunité innée ont été observées chez des patients atteints du SII (Öhman and Simrén, 2010). Les facteurs antimicrobiens entériques permettent de défendre l'organisme contre les bactéries pathogènes mais participent aussi au contrôle du microbiote intestinal (Bevins and Salzman, 2011). Dans ce contexte, une des cibles stratégiques à visée thérapeutique serait de diminuer le déséquilibre du microbiote intestinal par un apport exogène de peptides antimicrobiens comme le lysozyme. Cette stratégie contribuerait à maintenir et/ou prolonger les phases de rémission de la MC

ou à traiter le SII pour lequel aucun médicament n'est disponible en Europe. Parmi, les matrices présentant naturellement de forts taux en lysozyme, le lait maternel humain ainsi que le lait d'ânesse sont de très bons candidats (15% des protéines totales) (Guo et al., 2007).

L'Institut National Ânes et Mulets (INAM) a mis en place un observatoire économique et social de la filière asine en France (INAM, 2014). Un récent rapport montre la nécessité aujourd'hui, face à une concurrence Italienne et Chinoise importante, de mieux encadrer et accompagner une activité nationale grandissante autour du lait d'ânesse. En effet, la production de lait d'ânesse reste marginale en France avec seulement une soixantaine d'éleveurs qui valorisent essentiellement leur production par la fabrication de cosmétiques. Aujourd'hui, il s'avère capital de développer de nouvelles voies de valorisations telles que des produits alimentaires pour la filière lait d'ânesse.

Dans un premier temps, nos travaux se sont appuyés sur les connaissances et le savoir-faire de l'équipe « Neuro-Gastroentérologie et Nutrition », dans la perspective d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires du lait d'ânesse via une activité constante en lysozyme sur un modèle d'iléite induite par l'administration d'indométacine, mimant la MC, chez la souris (travaux publiés dans *European Journal of Nutrition* (Yvon et al., 2016)). Par la suite, une deuxième étude expérimentale visant à étudier les impacts d'une consommation en lait d'ânesse dans un modèle de stress chronique chez la souris reflétant les désordres gastro-intestinaux observés chez les patients souffrants du SII a été menée. Lors de cette étude, nous avons mis en évidence le rôle important de la fraction protéique contenant le lysozyme dans les effets précédemment démontrés (article scientifique en préparation). Enfin, nous nous sommes proposés, dans les locaux de la Halle technologique de l'EI-Purpan, de définir un procédé de pasteurisation du lait d'ânesse avec pour double objectif : 1) de conserver l'activité enzymatique du lysozyme dans le produit fini et ses propriétés santé préalablement démontrées (article scientifique soumis dans *Molecular Nutrition & Food Research*) ; 2) de permettre un transfert direct de ce procédé peu coûteux vers les éleveurs.

**DONNEES
BIBLIOGRAPHIQUES**

CHAPITRE I

Maladies chroniques digestives : Facteurs distincts et facteurs communs et confondants

Différents types de maladies chroniques digestives sont aujourd'hui définies comme : 1) les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), qui regroupent les maladies de type organique liées à l'inflammation de l'intestin comme la maladie de Crohn (MC) et la Rectocolite Hémorragique ; 2) le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII), colopathie fonctionnelle pour laquelle une inflammation de bas-grade de l'intestin est décrite sans lésions macroscopiques visibles. Dans ce travail de thèse, les modèles animaux utilisés visaient à mimer la physiopathologie de la MC et du SII. Ainsi, seules ces deux pathologies seront exposées dans ce mémoire. Dans un premier temps, les caractéristiques propres à chacune de ces maladies seront décrites. Dans un second temps, certaines caractéristiques physiopathologiques communes seront détaillées.

1. La maladie de Crohn (MC)

La MC est une affection inflammatoire chronique pouvant toucher tous les segments du tube digestif, de la cavité buccale jusqu'à l'anus (Greenstein et al., 1976). L'inflammation chronique de la paroi intestinale conduit à la perte de fonctions physiologiques de l'intestin. L'iléon, le côlon et l'anus sont les segments les plus fréquemment atteints. En fonction de la localisation de l'inflammation, trois grandes classes de MC sont répertoriées avec des prévalences différentes. Dans 28% des cas, l'inflammation se localise au niveau de l'iléon (Crohn iléal), dans 47% des cas elle affecte à la fois l'iléon et le gros intestin (MC iléo-colique) et dans 21% des cas elle ne touche que le gros intestin (Crohn colique) (Baumgart and Sandborn, 2007). L'atteinte iléale, la plus fréquente, est retrouvée chez deux tiers des patients. Dans tous les cas, les lésions sont segmentaires avec une alternance de zones saines et inflammatoires, asymétriques par rapport à l'axe de l'intestin et peuvent parfois être à l'origine de fissures, fistules et sténoses (Lennard-Jones, 1989). Sur le plan symptomatologique, la MC peut se manifester par des crampes abdominales plus ou moins sévères, des saignements rectaux, de la diarrhée, une perte de poids et une grande fatigue (Lennard-Jones, 1989). Ces maladies évoluent par poussées inflammatoires de durée et de fréquence extrêmement variables selon les patients. Ces poussées alternent avec des phases de rémission plus ou moins prolongées pour lesquelles les symptômes sont fortement réduits (Lennard-Jones, 1989). La rémission dans de la maladie peut prendre différents aspects : 1) la rémission clinique (asymptomatique) ; 2) la rémission endoscopique (guérison des muqueuses) ; et 3) la rémission profonde (asymptomatique avec guérison des

muqueuses) (Teruel et al., 2016). Le diagnostic optimal de la rémission consiste à surveiller l'activité inflammatoire de la MC, comme l'indice d'activité de la maladie de Crohn (indice Harvey-Bradshaw) (Sandborn et al., 2002). Dans ce test, le bien-être général, les douleurs abdominales, le nombre de selles ainsi que les complications sont évalués et associés à un score. Un score inférieur à 5 indique que le patient est en rémission (Harvey and Bradshaw, 1980).

1.1 Épidémiologie de la maladie de Crohn

La MC a été identifiée en 1932 par le Docteur Burill Crohn, gastroentérologue américain (Crohn et al., 1932). Les données épidémiologiques de la MC sont en constante évolution depuis sa découverte. Le pic d'âge du début de la MC se situe entre 20 et 25 ans. Cependant la maladie peut se manifester à n'importe quel âge, de l'enfance jusqu'à plus de 70 ans (Ananthkrishnan, 2015). La MC progresse au niveau mondial mais cette progression diffère sensiblement d'un pays à l'autre. La MC se manifeste principalement dans les pays industrialisés, particulièrement en Amérique du Nord et en Europe (Figure 1). Elle apparaît comme peu fréquente dans les pays émergents et en développement mais la maladie progresse sensiblement au sein de ces pays au fur et à mesure de leur industrialisation (Molodecky et al., 2012).

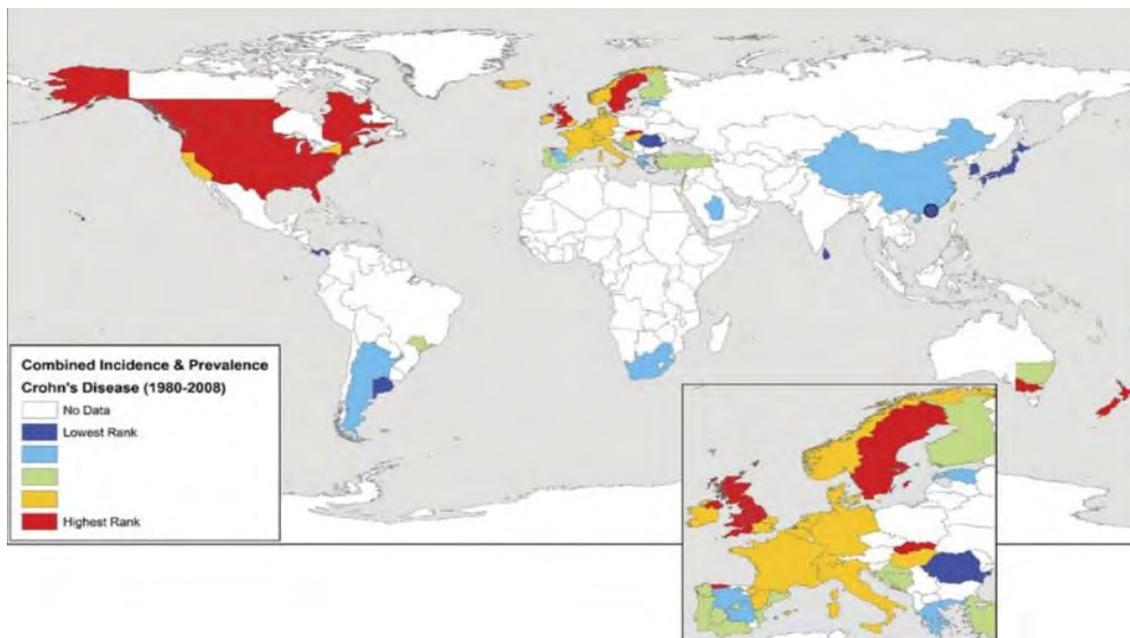


Figure 1 : Incidence et prévalence mondiale de la maladie de Crohn (Molodecky et al., 2012)

La MC est répartie selon un gradient Nord-Sud à la fois au niveau mondial mais aussi dans un même pays. En France, la région Nord-Pas de Calais est la région la plus touchée (Economou et al., 2009). Cette répartition géographique de la MC est en partie due au mode de vie et à l'industrialisation des pays. Toutefois, les raisons précises de la progression de la maladie restent encore à élucider. En

effet, des modifications de régimes alimentaires et de l'environnement sont autant de facteurs confondants qui peuvent être liés à la répartition géographique et à la progression de cette maladie (Ananthakrishnan, 2015). Cependant, un certain nombre de facteurs de prédisposition ou de susceptibilité ont pu être identifiés.

1.2 Facteurs génétiques impliqués dans la maladie de Crohn

Les études issues du séquençage du génome humain GWAS (Genome Wide Association Studies) ont permis d'identifier des gènes de susceptibilité prédisposant aux MICI. Une carte chromosomique a été établie situant environ 180 loci associés aux MICI sur les chromosomes 1, 3, 5, 6, 12, 14, 16 et 19 (Ellinghaus et al., 2016). L'étude de ces loci a permis de mettre en évidence environ 70 gènes impliqués dans des fonctions physiologiques importantes qui pourraient être dérégulés dans la MC (Lee and Parkes, 2011; Lee et al., 2017). En effet, les nombreuses mutations génétiques liées à la physiopathologie de la MC portent sur des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'immunité, la réaction inflammatoire, l'autophagie et l'homéostasie de la barrière intestinale (Graham and Xavier, 2013). Dans ce sens, les mutations du gène NOD2/CARD15 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2/ Caspase-Activating Recruitment Domain 15) ont été les plus étudiées. NOD2/CARD15 est un récepteur cytoplasmique impliqué dans la reconnaissance du muramyl-dipeptide (MDP), composant des parois bactériennes (Girardin et al., 2003). Il est exprimé par les cellules immunitaires (monocytes, macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques) et les cellules de Paneth (Ogura et al., 2003). Il existe trois polymorphismes principaux de NOD2 associés à la MC avec une de ces mutations retrouvée chez environ 32% des patients atteints de MC (Lesage et al., 2002).

Malgré une association nette entre certains gènes et l'augmentation du risque de développer la MC, les facteurs génétiques ne suffisent pas à eux seuls à expliquer le développement de la maladie. En effet, des études sur des jumeaux homozygotes ne présentant pas de développement similaires de la MC indiquent l'implication d'autres facteurs dans le développement de la maladie (Halfvarson, 2011; Halfvarson et al., 2007).

2. Le syndrome de l'intestin irritable (SII)

Chez l'Homme, le SII est le trouble fonctionnel intestinal le plus fréquent (Canavan et al., 2014). La première étape de diagnostic de cette colopathie fonctionnelle est l'exclusion de pathologies organiques comme les MICI. Une caractérisation des patients se fait à l'aide de critères symptomatologiques : critères de Rome IV, mis à jour récemment (Fondation internationale de Rome 2016). Cette classification est basée sur les symptômes de la douleur abdominale, des ballonnements et des troubles du transit (Tableau 1). Un patient diagnostiqué SII souffre de douleurs abdominales

chroniques avec une fréquence d'au moins un jour par semaine durant les trois derniers mois. Cette douleur abdominale est associée à au moins deux des critères suivants : troubles de la défécation, modifications de la fréquence et de l'apparence des selles. En fonction de ces critères et du profil de leur transit, différents sous-types de patients SII sont définis (Lacy et al., 2016) :

- *SII avec diarrhée prédominante (SII-D)* : contractions de l'appareil digestif rapides, propulsant son contenu rapidement au travers du tube digestif et provoquant des selles fréquentes et liquides.

- *SII avec constipation prédominante (SII-C)* : contractions de l'appareil digestif lentes, retardant ainsi la durée du transit et de son contenu, provoquant des selles dures et difficiles à évacuer.

- *SII mixte (SII-M)* : la durée du temps de transit varie et la consistance des selles alterne entre la constipation et la diarrhée, parfois pendant un même passage de selles. De plus, les contractions prolongées de l'intestin peuvent empêcher le passage normal de l'air, provoquant des ballonnements et des flatulences. La proportion de ces patients oscille entre un tiers à la moitié des cas de SII.

- *SII non classés* : pour les patients ne présentant aucune tendance spécifique, on parle de patients « SII non classés ». Il est également intéressant de noter que le SII peut se développer suite à un épisode de gastroentérite sévère, ou à une infection intestinale à *Campylobacter*, *Yersinia* ou une amibiase. On parle alors de SII post-infectieux (SII-PI).

Tableau 1 : Critères de Rome IV concernant le diagnostic lié à la physiopathologie du SII (Lacy et al., 2016).

Syndrome de l'intestin irritable : Critères de diagnostic
Douleur abdominale chronique au moins un jour par semaine dans les 3 derniers mois avec l'association d'au moins deux des points suivants : <ul style="list-style-type: none">- En relation avec la défécation- Associée avec une modification de la fréquence des selles- Associée avec une modification de l'apparence des selles

2.1 Epidémiologie du syndrome de l'intestin irritable

Le SII affecte entre 5 et 20% de la population mondiale en fonction des critères de diagnostic. Comme pour la maladie de Crohn, certains pays sont plus touchés que d'autres (Canavan et al., 2014). En France, le SII touche environ 4% de la population et est diagnostiqué généralement entre 20 et 50 ans (Le Pluart et al., 2015). La prévalence de cette colopathie fonctionnelle est très forte aux États-Unis et en constante augmentation dans les pays en voie de développement, notamment dans la zone de l'Asie-Pacifique (Figure 2) (Canavan et al., 2014). Selon certains auteurs, ce trouble intestinal affecte principalement la population féminine avec deux fois plus de femmes que d'hommes (Ducrotté, 2010).

L'épidémiologie précise et actuelle du SII est difficile en raison des différents critères de Rome et la nature des questionnaires d'aide au diagnostic utilisés. Sur 1376 patients ayant récemment remplis un questionnaire sur leurs symptômes gastro-intestinaux et leur qualité de vie, 12,4% ont été diagnostiqués SII en fonction des critères de Rome III, alors que seulement 6,1%, soit deux fois moins, le seraient en fonction des critères de Rome IV (Bai et al., 2016). Ainsi il semblerait que le nombre de patients positifs ait été jusqu'à présent surestimé (Bai et al., 2016). Ces récentes données montrent également la difficulté et la complexité du diagnostic du SII pour laquelle l'effet placebo est particulièrement important (Patel et al., 2005; Vase et al., 2005).

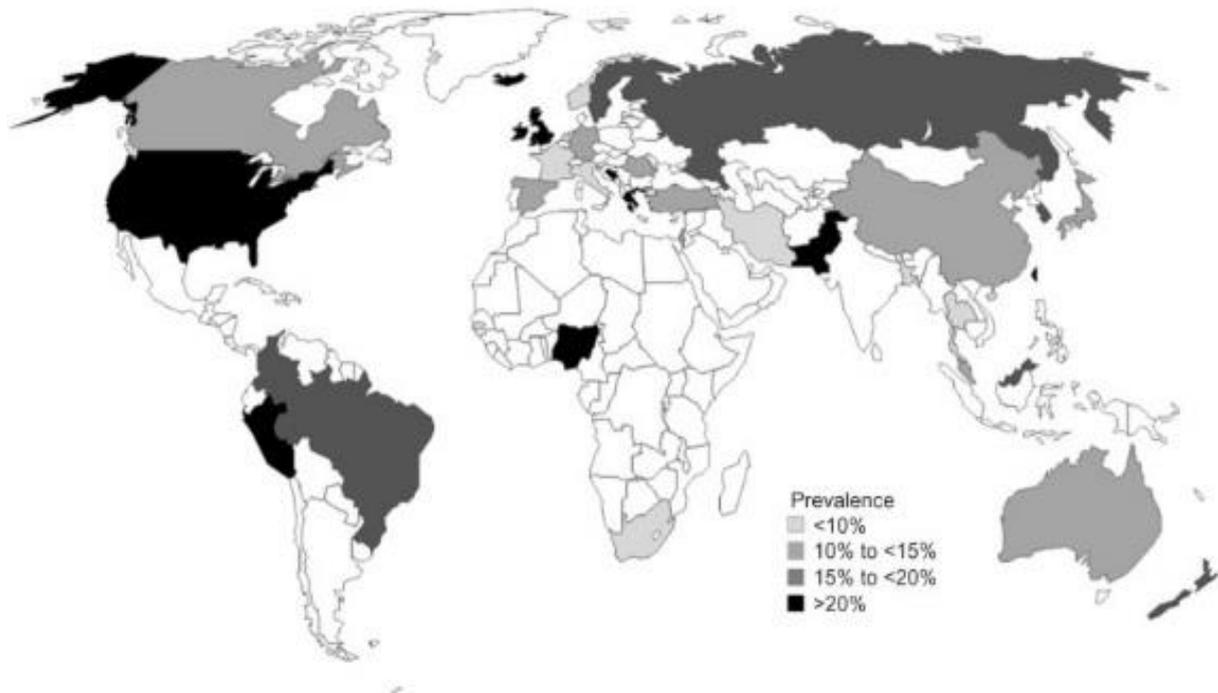


Figure 2 : Prévalence mondiale du syndrome de l'intestin irritable (Canavan et al., 2014).

Les symptômes du SII sont difficiles à soulager et altèrent significativement la qualité de vie des patients et est associée à une comorbidité psychiatrique telles que l'anxiété ou la dépression (Quigley, 2009). Ces observations font de ce trouble fonctionnel intestinal un enjeu de santé publique (Talley, 2008).

2.2 Facteurs génétiques et syndrome de l'intestin irritable

L'influence de la génétique sur la physiopathologie du SII a été mise en évidence à l'aide d'études portant sur l'agrégation familiale, comme des études sur des jumeaux associées à des données épidémiologiques portant sur des polymorphismes de gènes (Oświęcimska et al., 2017). Ainsi, 60 gènes candidats potentiellement impliqués dans le développement du SII ont été décrits (D'Amato, 2013). La plupart des études sur les variations génétiques dans le SII montrent l'implication des gènes

de signalisation de la sérotonine, du contrôle de la réponse immunitaire et de l'activité neuro-peptidiques impliquées dans la sécrétion intestinale. Camilleri et ses collaborateurs ont mis en évidence le lien entre la douleur viscérale et le polymorphisme des gènes influençant les canaux ioniques, les fonctions de barrières épithéliales et immunitaires et les neurotransmetteurs et récepteurs tels que les récepteurs 5-HT₃ (activé par la sérotonine) (Camilleri, 2013). L'implication de facteurs génétiques semble donc non négligeable dans le développement du SII. Par ailleurs, l'augmentation du risque de développer le SII est significative lorsque des parents au 1^{er}, 2nd ou 3^{ème} degré présentent un SII. De plus, ce facteur de risque est associé au degré parental le plus proche (Waehrens et al., 2015) avec une augmentation du risque de développer un SII entre conjoints, indiquant une cause non génétique, mais probablement environnementale (Waehrens et al., 2015).

Un tiers des patients atteints de MC en rémission peuvent présenter des symptômes similaires à ceux décrits dans le SII et seront présentés plus bas (Berrill et al., 2013; Keohane et al., 2010; Minderhoud et al., 2004; Piche et al., 2010; Simrén et al., 2002). En effet, de nombreux facteurs communs à ces deux pathologies digestives peuvent contribuer au développement ou à l'exacerbation de ces troubles, comme des facteurs microbiens et environnementaux (Spiller and Major, 2016).

3. Facteurs communs et confondants impliqués dans la MC et le SII

3.1 Le microbiote intestinal

L'Homme et l'animal possèdent une communauté microbienne intestinale très diversifiée, composée principalement de bactéries mais incluant aussi des virus, des champignons ainsi que des protozoaires (The Human Microbiome Project Consortium, 2012). Chez l'Homme, le nombre de cellules microbiennes était estimé, selon un article paru dans l'*American Journal of Clinical Nutrition* en 1972 (Luckey, 1972), être 10 fois supérieur au nombre de cellules humaines : soit cent mille milliards de micro-organismes (10^{14}) constitué de 500 à 1000 espèces différentes. En tenant compte d'un vaste corpus de données expérimentales récentes, des chercheurs israéliens estiment que le nombre total de bactéries hébergées par un « homme de référence » (20 à 30 ans, 70 kg et 1,70 m) est de $3,9 \cdot 10^{13}$ (Sender et al., 2016). La population de bactéries présente dans la lumière du tractus digestif augmente au fur et à mesure de sa progression depuis l'estomac jusqu'à l'extrémité la plus distale, le côlon (Savage, 1977) (Figure 3).

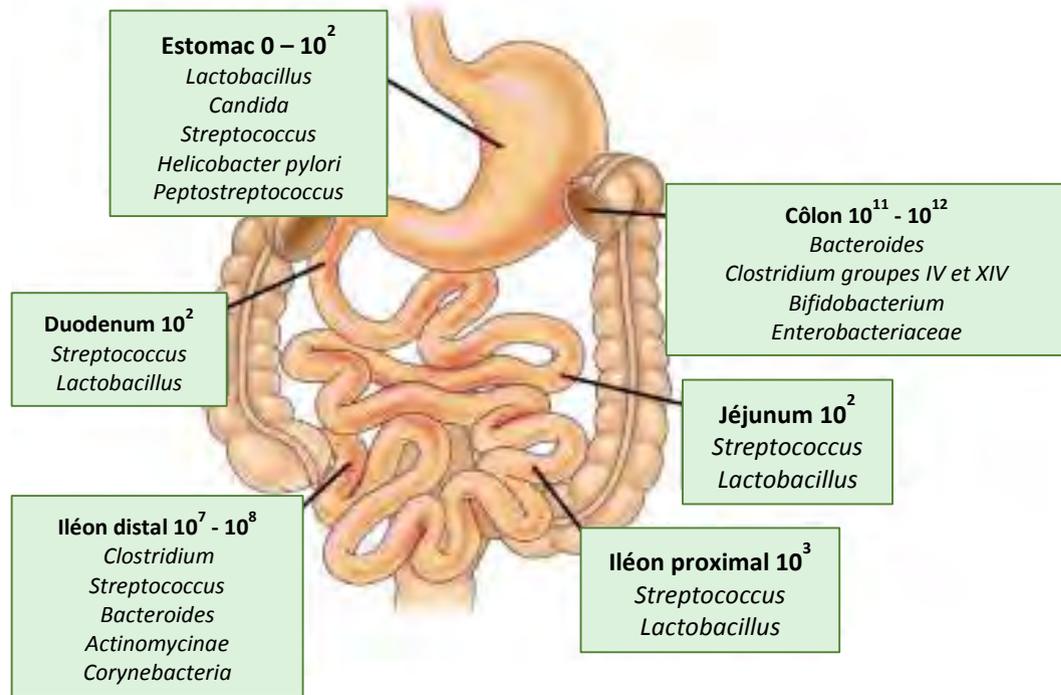


Figure 3 : Distribution et abondance de bactéries dans le tractus gastro-intestinal humain. (Adapté de (Sartor, 2008))

Le microbiote intestinal se compose d'une population dite « dominante » (Figure 4) comprenant entre 10^9 et 10^{11} cfu (« colonies formant unité ») par gramme de fèces et représentée principalement de bactéries anaérobies strictes comme les *Bacteroidetes*, les *Bifidobactéries*, les *Firmicutes* ... Les 30 à 40 espèces dominantes représentent à elles-seules 99% du microbiote total (Tannock, 1999; The Human Microbiome Project Consortium, 2012). La population dite « sous – dominante » représente entre 10^6 et 10^8 cfu/g de fèces et est composée de bactéries aérobies/anaérobies facultatives comme les *Enterobactéries*, les *Streptocoques* et les *Enterocoques*. Enfin, la population dite « transitoire » ne s'implante pas durablement dans le tractus gastro-intestinal, et est composée d'espèces bactériennes de passage comme *Citrobacter*, *Klebsiella* ou encore *Enterobacter* ...

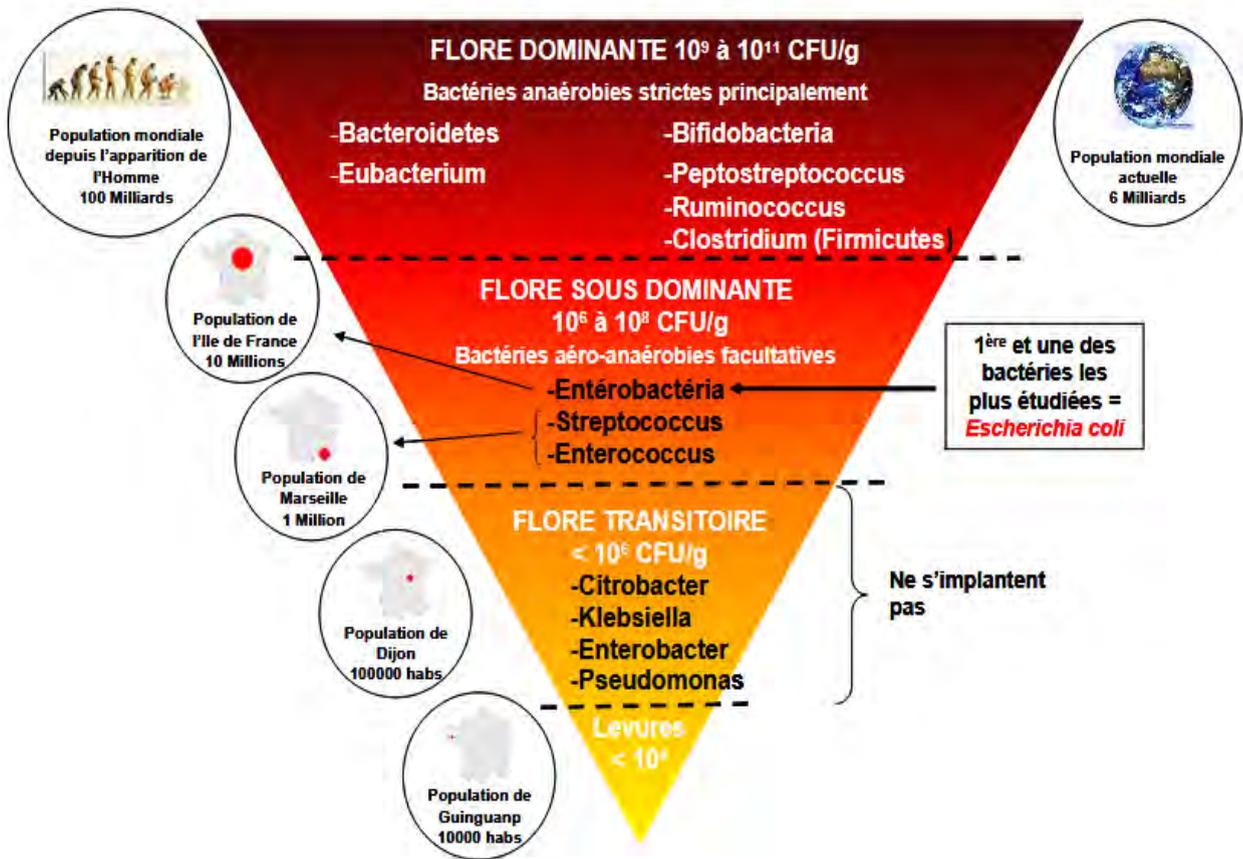


Figure 4 : Composition du microbiote intestinal dominant, sous dominant et transitoire (Payros 2012).

En condition physiologique, le microbiote d'un individu adulte est caractérisé à 90% par la présence de deux phyla majoritaires : les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, mais présente des variations entre les individus. On distingue ainsi différents entérotypes selon la dominance d'un des trois genres *Bacteroides*, *Prevotella* ou *Ruminococcus* (Arumugam et al., 2011). D'autres espèces appartiennent aux phyla des *Proteobacteria* (1-2%), des *Verrucomicrobia* (1-2%), des *Actinobacteria* (2-25%) et des *Fusobacteria* (Qin et al., 2010) (Figure 5). Le microbiote le plus étudié est celui issu des fèces grâce à sa facilité d'obtention. Sa composition est proche du microbiote colique et est basé majoritairement sur les phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Verrucomicrobia* (Cheng et al., 2011; Sartor, 2015).

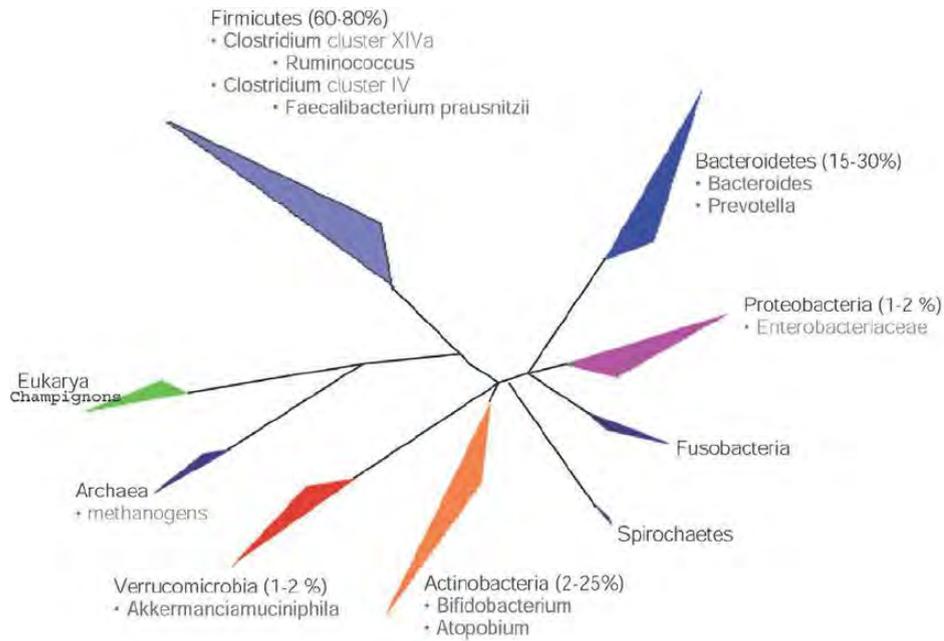


Figure 5 : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique des bactéries résidant dans le côlon montrant l'abondance relative des phyla majoritaires du microbiote intestinal humain. Entre parenthèse, la proportion des différents phyla dans le microbiote intestinal. (Cheng et al., 2011)

Contrairement à des similitudes observées sur la base des phyla, lorsqu'on se place au niveau des espèces bactériennes, la composition du microbiote est très différente entre les différentes espèces de mammifères et entre les individus d'une même espèce. Ainsi, en condition physiologique, l'alimentation et la phylogénie de l'hôte influencent la diversité des bactéries intestinales (Ley et al., 2008). Par exemple, un régime carnivore, omnivore ou herbivore modifie le profil microbien (Ley et al., 2008). De même, une alimentation plus riche en graisses chez l'Homme conduit à une dominance des *Bacteroidetes* alors qu'une alimentation riche en carbohydrates est associée à une dominance des *Prevotella* (Wu et al., 2011). Chez les rongeurs, les phyla bactériens sont similaires à ceux présents chez l'Homme et comprennent les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, les *Proteobacteria* et les *Actinobacteria* (Nguyen et al., 2015). Cependant, le microbiote de la souris présente aussi des différences majeures avec celui de l'Homme. Par exemple, les espèces de *Lactobacillus* sont présentes en très forte quantité chez la souris, comparée à l'Homme (Nguyen et al., 2015; The Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Le génome bactérien, nommé microbiome, contient plus de 5 millions de gènes, ce qui est 150 fois plus important que le potentiel génétique de l'hôte (Qin et al., 2010). Les chercheurs du projet METAHIT (« Metagenomics of the human intestinal tract ») ont créé un catalogue de référence complet des gènes microbiens dans l'intestin humain. Dans cette étude, 580 Gb d'ADN microbien ont été séquencés et comparés à partir de 124 échantillons de selle de personnes en bonne santé et de

malades atteints de MICI ou d'obésité. Cette étude montre également que chaque individu porte en moyenne 540000 gènes microbiens, soient environ 160 espèces, réparties en sept phyla différents. Un déséquilibre du microbiote, ou dysbiose, favorisant la croissance d'espèces bactériennes pro-inflammatoires au détriment d'espèces bactériennes anti-inflammatoires, tout comme la prédominance de certaines familles de bactéries (*Entérobactéries*, *Fusobactéries*) ou la raréfaction d'autres espèces (*Clostridia*, *Faecalibacterium*) ont été décrits chez des personnes atteintes de MICI. Pour l'heure, il n'est pas possible de savoir s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de ces maladies, ni de déterminer si la dysbiose à l'origine de la maladie est innée ou consécutive à un autre facteur environnemental (alimentation, médicament...). Il semblerait toutefois que ce déséquilibre du microbiote apparaîtrait sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux, mais jouerait lui-même un rôle dans l'initiation, le maintien ou la sévérité de l'inflammation, engendrant un cercle vicieux (Dusko Ehrlich and MetaHIT consortium, 2010; Qin et al., 2010). L'attention se porte aujourd'hui sur le rôle de l'écosystème microbien intestinal dans le SII et la MC, notamment dans le déclenchement et l'entretien de la douleur abdominale et la survenue d'une production locale de cytokines pro-inflammatoires (Ducrotté, 2010). Des modifications à la fois qualitatives et quantitatives de la composition du microbiote ont été démontrées chez les patients MC et SII (Ducrotté, 2010; Rajca et al., 2014; Shukla et al., 2015). De plus, ces perturbations microbiennes seraient prédictives d'une rechute chez les patients MC en rémission (Rajca et al., 2014).

Chez les patients souffrant de la MC, des modifications qualitatives et quantitatives du microbiote intestinal ont pu être observées. La masse bactérienne totale est en effet plus importante. Malgré cette augmentation quantitative, la biodiversité du microbiote est réduite chez les patients souffrants de MC avec une diminution des espèces bactériennes potentiellement bénéfiques (*Bifidobacteria*, *Lactobacilli*), et une augmentation des bactéries pathogènes associées à la muqueuse intestinale (*Bacteroides*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*) (Kostic et al., 2014; Sokol et al., 2006). Dans la MC, les zones inflammatoires sont celles présentant la plus forte concentration en bactéries (iléon et côlon). L'abondance des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes* est réduite de 10 à 100 fois dans les prélèvements de résection chirurgicale de patients atteints de MC, par rapport aux sujets sains (Frank et al., 2007). La perte de *Firmicutes* est principalement attribuable à la réduction de l'abondance des espèces qui appartiennent aux *Clostridiales*, en particulier les membres de groupes *Clostridium XIVa* et *IV* (Manichanh et al., 2006). Ces études ont décrit les changements typiques dans la composition bactérienne intestinale des MICI, mais les rôles fonctionnels de ces micro-organismes, ou de l'ensemble d'une communauté dysbiotique, restent à élucider. Cette dysbiose pourrait être à l'origine

d'une instabilité de l'écosystème intestinal, menant à une réaction inflammatoire ; bien qu'elle puisse également être sa conséquence plutôt que sa cause (Schaubeck et al., 2015).

Les données concernant le microbiote intestinal des patients souffrants du SII sont très hétérogènes. Les conditions d'observations (Taverniti and Guglielmetti, 2014) sont diverses et les modulations du microbiote peuvent varier selon le sous-type de SII considéré (Jeffery et al., 2012; Tap et al., 2017). Une étude pionnière a démontré une diminution des coliformes, des *Lactobacilles* et des *Bifidobactéries* ainsi qu'une augmentation des entérobactéries et des *Bacteroides* (Balsari et al., 1982). Cependant, ces résultats ont été obtenus à l'aide de méthodes de microbiologie classiques ne permettant pas de caractériser la fraction des bactéries non cultivables. Une étude plus récente réalisée sur les matières fécales utilisant des données issues du séquençage de la fraction 16S ribosomale, a permis de confirmer les différences du microbiote entre les patients SII et les sujets sains (Kassinen et al., 2007). Ces auteurs ont mis en évidence des variations entre les différents sous-groupes de patients SII. Ainsi, une grande proportion de *Bacteroides* et *Allisonella* a été détectée chez les patients SII-M, alors que chez les patients SII-D une diminution des *Bifidobactéries* a plutôt été décrite. L'analyse de prélèvements fécaux issus de patients SII-C met en évidence une diminution des *Bifidobactéries* et une augmentation des *Enterobacteriaceae* et des bactéries sulfato-réductrices, en lien avec l'hypersensibilité viscérale retrouvée chez ces patients (Crouzet et al., 2013). Une étude réalisée sur des biopsies de la muqueuse intestinale a confirmé les données obtenues à partir des fèces, notamment l'augmentation des bactéries anaérobies, ainsi que des espèces d'*Escherichia coli* et des *Bacteroides* (Swidsinski et al., 2005). Aussi, des protozoaires intestinaux tels que *Blastocytis hominis* et *Dientamoeba fragilis* peuvent être impliqués dans l'étiologie du SII (Quigley, 2009). Enfin, l'augmentation de l'incidence du SII à la suite de gastro-entérites et l'amélioration des symptômes par les antibiotiques ou les probiotiques ont permis d'établir que le microbiote intestinal a un rôle important dans le SII, pouvant être à l'origine ou la conséquence de la maladie (M.P. Bennet et al., 2015). Des données recueillies récemment suggèrent aussi que le microbiote intestinal humain contribue à l'étiologie des pathologies digestives via l'influence de son métabolome. Des données récentes ont montré que les acides gras à chaîne courte, l'acétate, le propionate et le butyrate fonctionnent dans la suppression de l'inflammation, tandis que d'autres métabolites microbiens, tels que les acides biliaires secondaires, favorisent l'inflammation (Louis et al., 2014).

Ces données indiquent clairement un rôle du microbiote intestinal dans l'apparition et/ou le développement de l'inflammation intestinale (Hand et al., 2016). Cette hypothèse est étayée par des données épidémiologiques qui associent l'usage excessif et inapproprié d'antibiotiques et les

modifications du mode de vie (alimentaire et sanitaire) à une évolution du microbiote intestinal (Becattini et al., 2016; Gottlieb et al., 2017; Rampelli et al., 2016).

3.2 Facteurs environnementaux

L'industrialisation et l'urbanisation de nos sociétés sont associées à des modifications profondes de notre environnement microbien. Des facteurs comme l'hygiène, l'alimentation, la médication, le stress, le style de vie et la pollution peuvent constituer un risque environnemental avéré dans le développement, le maintien ou l'exacerbation de désordres gastro-intestinaux. En effet, les facteurs environnementaux prennent une part importante dans l'étiologie du SII et participent également à la modulation des symptômes associés à la rechute de la MC (Figure 6) (Ananthakrishnan, 2015).

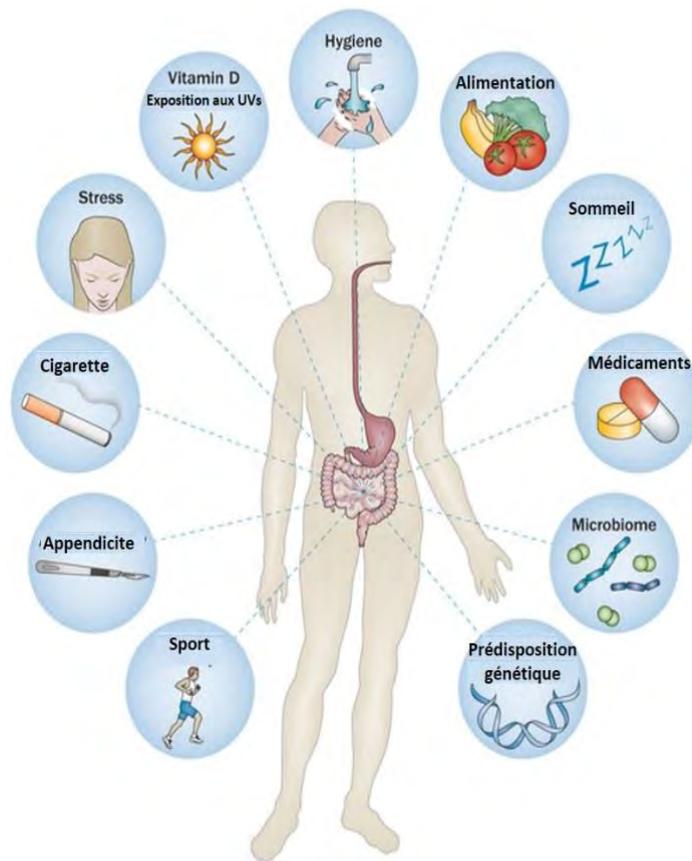


Figure 6 : Les facteurs impliqués dans les pathologies digestives de type MC et SII. (Adapté de (Ananthakrishnan, 2015))

3.2.A Facteurs alimentaires

L'alimentation des pays développés est très différente de celle des pays en voie de développement. L'alimentation des pays industrialisés est très riche en graisses et protéines et pauvre

en fruits et légumes ce qui influence directement l'équilibre du microbiote intestinal. L'augmentation du risque de développer la MC a souvent été associée à divers composés alimentaires comme les graisses, les sucres et les protéines animales. Au contraire, la diminution du risque de MC a souvent été associée à la consommation de poisson, d'œufs, de fruits et de légumes (Hou et al., 2011, 2014). Un régime riche en fibres alimentaires pourrait avoir un rôle protecteur vis-à-vis de la MC, cependant la modernisation de notre mode de vie a plutôt tendance à conduire à une diminution de ces apports (Persson et al., 1992). A l'inverse, une consommation importante de glucides à chaîne courte faiblement absorbés (FODMAP « Fermentable Oligo-, di-, and monosaccharides and polyols ») pourrait entraîner l'apparition de phénomènes inflammatoires (Gearry et al., 2009; Prince et al., 2016). Le rôle de l'alimentation dans la physiopathologie du SII a été mis en évidence (Dapoigny et al., 2003). Aujourd'hui de nombreuses études s'intéressent à l'impact du régime alimentaire dans la survenue du SII (Chey, 2016; Cuomo et al., 2014; Deng et al., 2016; Staudacher et al., 2014). Une majorité de patients rapportent une augmentation des symptômes après l'ingestion de certains types d'aliments (Hayes et al., 2014; Zia et al., 2016). Les aliments les plus fréquemment impliqués sont les aliments riches en FODMAPs, c'est-à-dire des produits à base de lait de vache, de gluten, et certains fruits et légumes (Zannini and Arendt, 2017).

3.2.B Le stress

« Le stress se définit comme étant une menace, aiguë ou chronique, vis-à-vis de l'homéostasie de l'individu. Il induit une réponse de l'organisme, nécessaire pour rétablir la stabilité de l'individu, afin d'assurer sa survie. Toutefois, une rupture entre la capacité d'adaptation et les facteurs extérieurs, provoque une réaction pathologique qui peut aboutir au développement de troubles fonctionnels et/ou organiques » (Gaber, 2016). Les événements stressants dès le plus jeune âge ou les situations anxigènes sont des facteurs de stress environnementaux importants associés au développement des symptômes du SII (Whitehead et al., 1992). L'anxiété et la dépression sont retrouvées chez 22% des patients SII dont 1/3 d'entre eux ont subi un abus physique et/ou sexuel durant la petite enfance (Thijssen et al., 2010). Dans le cas de la MC, des travaux témoignent d'un effet significatif des facteurs de stress corrélant positivement le stress lié aux tracas quotidiens et l'activité de la maladie (Garrett et al., 1991). A ce titre, Lerebours et ses collaborateurs observent la survenue d'un événement de vie « stressant » dans les 6 mois qui précèdent l'apparition des symptômes d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (Lerebours et al., 2007). La détresse émotionnelle, l'anxiété et l'anxiété comme facteurs de rechute font l'objet de nombreuses études (Jordan et al., 2016; Maunder and Levenstein, 2008; Mawdsley and Rampton, 2005). À titre d'exemple, l'étude de Bitton *et al.*, montre que les patients percevant un stress élevé étaient plus susceptibles de rechute (Bitton et al., 2008).

Enfin, chez l'animal, le stress altère la barrière intestinale en augmentant la perméabilité intestinale par exemple (Söderholm and Perdue, 2001).

3.3 La barrière intestinale

La connaissance de l'organisation structurale du tube digestif, composé de quatre tuniques, est fondamentale à la compréhension du rôle clé joué par ce dernier (Figure 7).

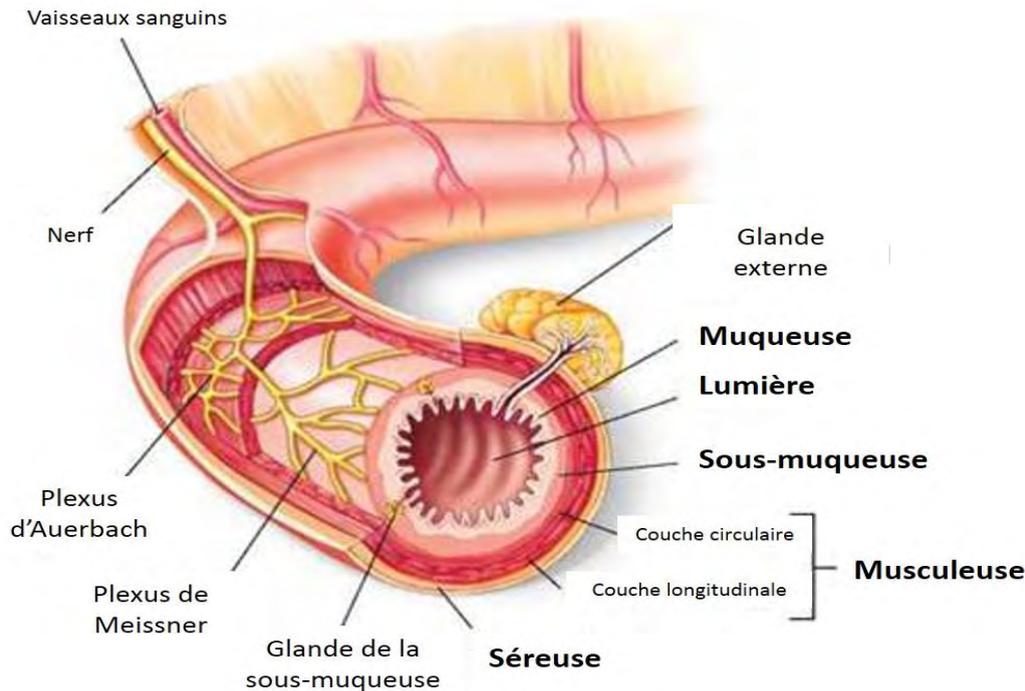


Figure 7 : Structure et organisation du tube digestif et son système nerveux entérique. (Adapté de Schoolbag.info)

Au centre, en contact avec la lumière intestinale se trouve la **muqueuse**. Celle-ci possède une fonction de barrière de protection physique et immunitaire ainsi que d'absorption notamment dû à la présence de nombreux replis et microvillosités. Ensuite, se trouve la **sous-muqueuse**, composée d'un tissu conjonctif lâche à fibres élastiques, abritant un réseau artériel, veineux et lymphatique, ainsi que de nombreuses de fibres nerveuses régulant la sécrétion : les plexus de Meissner. La **musculeuse** est constituée de fibres musculaires lisses disposées en deux couches : longitudinale et circulaire. Entre les deux, s'insèrent les plexus d'Auerbach, contrôlant notamment le péristaltisme. Enfin, la **séreuse** est la membrane fibreuse protégeant les trois autres tuniques (Hansen, 2003). Les deux plexus décrits précédemment : les plexus d'Auerbach (localisés dans la musculeuse) et les plexus de Meissner (localisés dans la sous-muqueuse) sont des réseaux denses de neurones, connectés les uns aux autres (Goyal and Hirano, 1996).

La barrière intestinale se trouve à l'interface entre l'organisme et le contenu luminal. Le terme de « fonction de barrière intestinale » est une notion vaste reposant sur plusieurs composantes telles que l'épithélium, le mucus, l'immunité et le microbiote intestinal. La perméabilité intestinale sélective et les défenses immunitaires de l'hôte en sont les principaux acteurs. La fonction principale de l'intestin reste l'absorption des nutriments. Sa fonction de « barrière, physique, immunitaire et microbienne », protège l'organisme d'agents délétères contenus dans la lumière intestinale et permet la sécrétion d'immunoglobulines et de peptides antimicrobiens vers la lumière. Un dysfonctionnement de cette barrière est impliquée dans la physiopathologie de maladies digestives tels que le SII et la MC (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010).

3.3.A La barrière physique

Description de l'épithélium de l'intestin grêle

Cette barrière physique est composée de monocouches de cellules épithéliales polarisées et perméables. Il existe quatre grands types majeurs de cellules épithéliales intestinales (Figure 8).

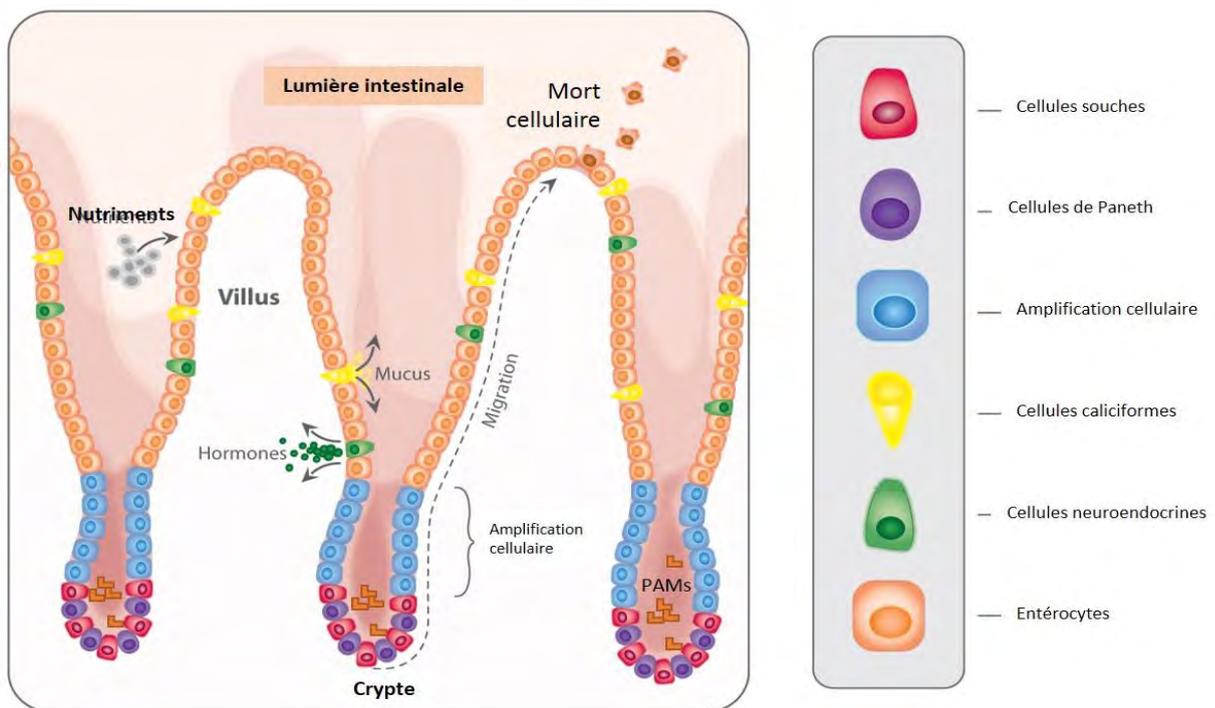


Figure 8 : L'épithélium intestinal et les cellules qui le composent. (Adapté de StemCell.com)

Les entérocytes, cellules absorbantes, qui représentent plus de 80% des cellules épithéliales. Elles sont hautement polarisées et spécialisées, et assurent l'absorption et le transfert des nutriments, depuis la lumière intestinale jusqu'à la circulation sanguine. Le pôle apical des entérocytes qui présente

une bordure en brosse spécialisée structurée par des filaments d'actine, est responsable des échanges avec la lumière intestinale. Le pôle latéral est en contact avec les cellules adjacentes et assure la fonction de barrière, ceci grâce aux jonctions intercellulaires qui assurent l'étanchéité de l'épithélium (Knust and Bossinger, 2002).

Les cellules caliciformes sont moins nombreuses et représentent environ 15% des cellules épithéliales. Ce sont les cellules qui produisent les mucines (codées par les gènes *MUC*) et les peptides TFF (*trefoil factors*), composants majeurs du mucus. Ce mucus est sécrété en continu et son rôle premier est de faciliter le glissement des produits issus de la digestion (Barcelo et al., 2000).

Les cellules neuroendocrines sont les moins nombreuses, bien qu'elles soient disséminées sur la totalité de l'épithélium. Elles sont impliquées dans la production et la sécrétion d'hormones. Les cellules souches sont des cellules douées d'auto-renouvellement, indifférenciées et à potentialité variable. Seulement 3 à 5 jours sont nécessaires à des cellules souches pour proliférer et se différencier en tous types cellulaires constituant l'épithélium intestinal.

Enfin, les cellules de l'immunité. Ces dernières sont représentées par les cellules « M » et les cellules de Paneth. Les cellules M sont présentes dans l'épithélium de recouvrement des organes lymphoïdes de la muqueuse intestinale, au niveau des plaques de Peyer. Elles participent à la réponse immune en reconnaissant et transportant les antigènes alimentaires et microbiens issus de la lumière intestinale. Les cellules de Paneth assurent la défense immunitaire non spécifique contre les micro-organismes dans l'intestin. Elles se distinguent par leurs granules apicaux éosinophiles. Lors de l'exposition à des bactéries ou à des antigènes microbiens, les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens comme le lysozyme, les défensines ou la phospholipase A dans la lumière intestinale (Vaishnava et al., 2008). Ces cellules ne sont pas retrouvées au niveau du côlon, qui ne présente donc que trois types cellulaires. La fonction première de cette barrière physique épithéliale intestinale est l'absorption des nutriments issus de l'alimentation pour l'ensemble des cellules de l'organisme. La perméabilité intestinale décrit le passage de molécules de différentes tailles à travers l'épithélium intestinal (Figure 9). Ce dernier est polarisé avec un pôle apical au contact de la lumière intestinale et un pôle basolatéral au contact de la muqueuse.

Des jonctions intercellulaires permettent le passage des molécules d'intérêt tout en limitant celui de potentiels pathogènes. Deux voies de passage des composés luminaux à travers l'épithélium intestinal ont été identifiées : la voie paracellulaire (<600 Da) et la voie transcellulaire (>600 Da) (Hollander, 1992).

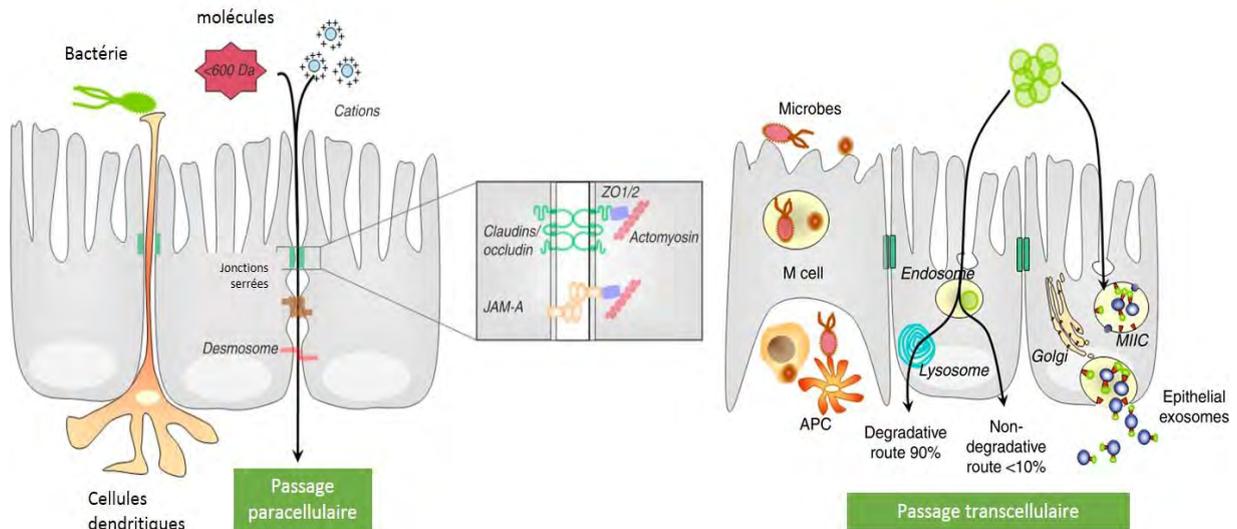


Figure 9 : Les voies de passage des composés luminaux à travers l'épithélium intestinal : voie paracellulaire et transcellulaire. (Adapté de (Ménard et al., 2010))

- La voie paracellulaire

La perméabilité paracellulaire (entre les cellules) est régulée par des structures dynamiques appelés les jonctions serrées elles-mêmes modulées par des stimuli extracellulaires (cytokines, nutriments, cellules immunitaires ...). Les jonctions serrées déterminent la taille des pores permettant le passage des molécules (Hollander, 1992; Nusrat et al., 2000). Ce complexe jonctionnel est constitué de protéines transmembranaires (occludine, claudine et JAM pour Junctional Adhesion Molecule) reliées à des protéines intracellulaires (ZO pour zonula occludens) rattachées à l'actine et qui compose le cytosquelette de la cellule (Figure 8). Le passage de la voie paracellulaire permet le passage des ions et des molécules hydrophiles jusqu'à un poids moléculaire de 600 Da. Cette voie est utilisée par les petites molécules qui ne peuvent traverser la membrane plasmique hydrophobe de manière passive. Un défaut ou une perte de certaines protéines de jonctions permettrait le passage entre les cellules de l'épithélium de molécules avec un poids moléculaire supérieur (Watson et al., 2001).

- La voie transcellulaire

Ce passage s'applique pour le transport de molécules de haut poids moléculaire et pour les bactéries ou les antigènes alimentaires (Neutra et al., 2001). Dans des conditions physiologiques, le transport de molécules supérieur à 600 Da, s'effectue par endocytose par les entérocytes au niveau apical de la cellule. Lors de la transcytose, la molécule est plus ou moins dégradée par les lysosomes présents dans la cellule. Ces antigènes sont ensuite expulsés de la cellule au niveau basolatéral et

peuvent interagir avec des cellules dendritiques, induisant la stimulation des lymphocytes T (Neutra et al., 2001).

- La translocation bactérienne

En conditions physiologiques, de très faibles quantités de bactéries traversent l'épithélium intestinal par la voie transcellulaire. Lorsque l'homéostasie intestinale est rompue, il peut se produire une translocation bactérienne (Balzan et al., 2007; Brenchley and Douek, 2012). Ce phénomène se traduit par un passage important de bactéries vivantes (Figure 10) depuis la lumière intestinale vers les organes immunitaires locaux comme les ganglions mésentériques ou systémiques comme le foie ou la rate, pouvant conduire à une septicémie (MacFie et al., 1999).

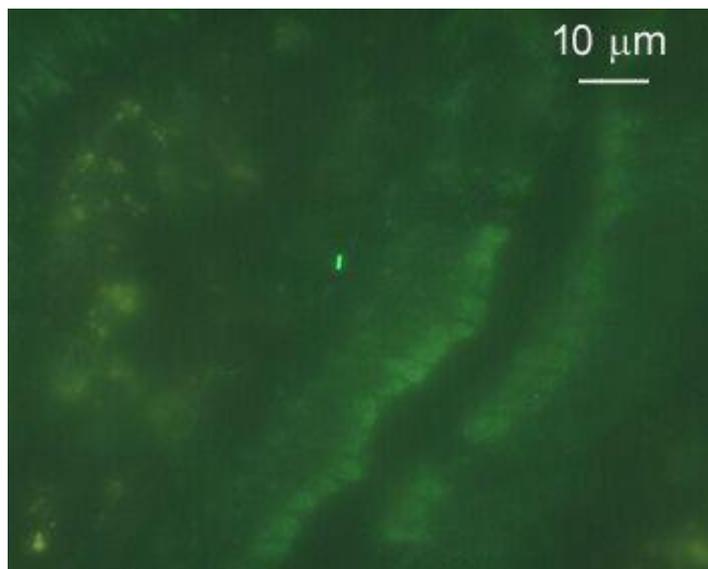


Figure 10 : Translocation de *E. coli*-GFP dans une villosité (Samel et al., 2002).

Augmentation de la perméabilité intestinale

Les altérations de la perméabilité épithéliale ont été identifiées aussi bien dans le SII (Piche et al., 2009; Zhou et al., 2009) que dans la MC (Hollander et al., 1986). L'augmentation de la perméabilité entraîne une augmentation du contact entre les bactéries de la lumière intestinale et la muqueuse intestinale (Hyland et al., 2014). Chez les patients souffrant du SII, une augmentation de la perméabilité intestinale se traduit par une diminution de l'expression et de la distribution des jonctions serrées intercellulaires telles que l'occludine et ZO-1 (Piche, 2014). L'augmentation de la perméabilité intestinale dans la MC résulte d'une altération de l'expression des claudines (diminution des claudines de fermeture et augmentation des claudines impliquées dans la formation des pores paracellulaires) (Zeissig et al., 2007). Dans cette pathologie, l'inflammation de la muqueuse intestinale entretient

l'augmentation de la perméabilité intestinale (Jäger et al., 2013). De plus, une augmentation de la perméabilité intestinale chez les patients en rémission est prédictive d'une rechute dans la MC (Wyatt et al., 1993). Des facteurs endogènes peuvent moduler la perméabilité intestinale. En effet, les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IFN γ augmentent la perméabilité trans et paracellulaire intestinale (Bruewer et al., 2003). De même, les mastocytes sont des cellules immunitaires libérant des médiateurs pro-inflammatoires capables de réguler la perméabilité intestinale (Farhadi et al., 2007). Dans le SII, l'augmentation de la perméabilité intestinale est corrélée à une inflammation de bas grade (Öhman and Simrén, 2010) et une l'hypersensibilité viscérale (Zhou et al., 2009). Chez l'Homme, le défaut de perméabilité intestinale semble responsable de l'hypersensibilité viscérale puisqu'une normalisation de la perméabilité intestinale corrige l'hypersensibilité viscérale dans certains modèles animaux (Ait-Belgnaoui et al., 2005, 2014; Theodorou et al., 2014). La régulation de la perméabilité intestinale représente donc une cible intéressante dans la prévention et/ou le traitement de diverses pathologies.

Des facteurs environnementaux tels que l'alimentation, les bactéries commensales ou pathogènes ainsi que le stress jouent également un rôle dans la régulation de la perméabilité intestinale. Par exemple, certains aliments sont capables d'altérer la perméabilité intestinale, comme le gluten, particulièrement résistant à l'hydrolyse digestive (Biesiekierski et al., 2011), les phytoœstrogènes (Moussa et al., 2012) ou l'alcool (Ferrier et al., 2006). La colonisation du microbiote intestinal est capable de moduler la perméabilité intestinale. Cette modulation de la perméabilité intestinale par les bactéries est dépendante de la souche bactérienne colonisatrice. Dans ce contexte, des souches probiotiques augmentent la fonction de barrière intestinale et restaure la perméabilité intestinale lorsque celle-ci est altérée en cas d'inflammation, chez l'homme et chez l'animal (Peterson and Artis, 2014).

[Le mucus](#)

Initialement, le mucus était principalement décrit comme un lubrifiant facilitant le passage du bol alimentaire (Gendler and Spicer, 1995), mais son étude plus approfondie a montré qu'il jouait également un rôle plus complexe notamment dans l'homéostasie intestinale en agissant comme un filtre sélectif empêchant le passage des microorganismes jusqu'à l'épithélium intestinal tout en fournissant une source énergétique pour les bactéries commensales (Cone, 2009). Dans l'intestin, le mucus est produit par les cellules caliciformes. Il recouvre la muqueuse en formant un maillage visqueux et imperméable aux molécules de plus de 1000nm (Johansson et al., 2011). Concernant sa structure, une seule couche de mucus est observée au niveau de l'iléon alors qu'au niveau du côlon

deux couches ont été observées dont l'une, stérile, au contact de l'épithélium intestinal et la seconde, externe, colonisée par les bactéries de la lumière intestinale (Figure 11).

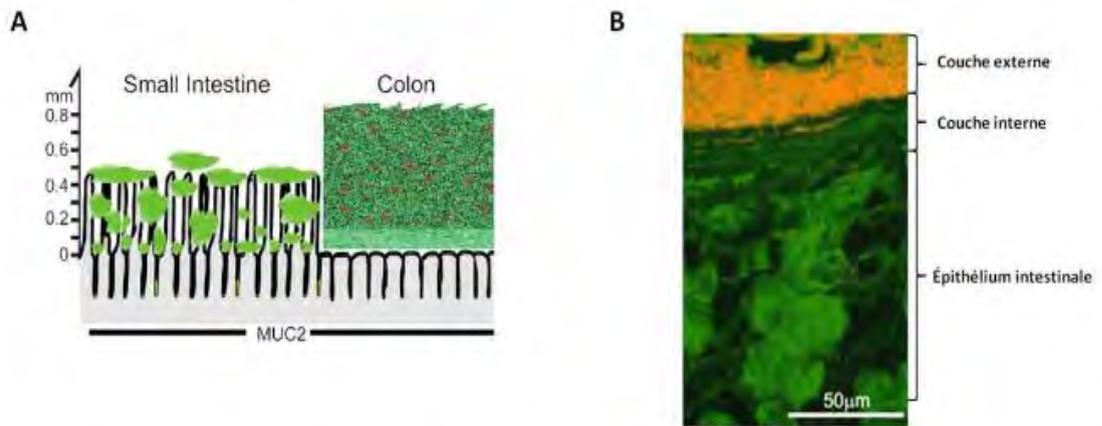


Figure 11 : Comparaison de la structure du mucus dans l'intestin grêle et le colon. (Adapté de Johansson, Larsson et al. 2011 et McGuckin, Linden et al. 2011)

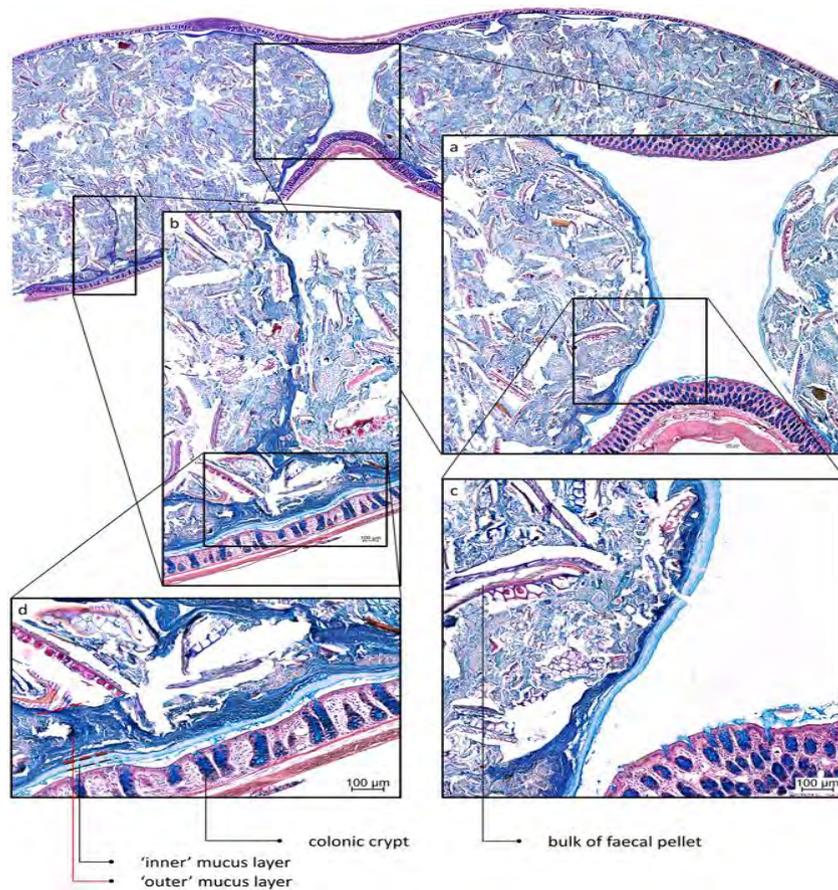


Figure 12 : Section longitudinale colorée du colon distal de rat contenant des fèces. Une couche de mucus stérile recouvre complètement la fèces.

Toutefois, une nouvelle vision de la localisation du mucus au niveau colique a récemment été décrite (Kamphuis et al., 2017). Kamphuis et ses collaborateurs, montrent que la couche de mucus recouvre les fèces (Figure 12) et non pas la muqueuse dans le côlon distal, isolant ainsi le microbiote fécal de l'épithélium (Kamphuis et al., 2017).

Le mucus se compose de mucines, glycoprotéines dont le représentant majoritaire retrouvé dans l'intestin est MUC2 (Johansson et al., 2011). Une altération de la qualité du mucus le rend plus perméable aux agents pathogènes (Jakobsson et al., 2015; McGuckin and Hasnain, 2017). Par ailleurs, un stress chronique psychologique de 4 jours est responsable d'un remodelage des motifs O-glycosylés du mucus chez le rat. Les modifications des O-glycosylations influencent les interactions physico-chimiques entre les fibres de mucine, avec un impact direct sur la morphologie et les propriétés physiques du réseau de mucus, conduisant à une barrière de mucus qui est altérée (Da Silva et al., 2014).

3.3.B La barrière immunologique

Les récepteurs de l'immunité innée

En conditions physiologiques, le système immunitaire de la muqueuse intestinale assure une tolérance envers les antigènes alimentaires et le microbiote intestinal (Arrieta and Finlay, 2012). Il permet de maintenir une composition du microbiote bénéfique pour l'hôte tout en restreignant la prolifération d'agents pathogènes (Cario, 2005). Des molécules du non-soi appelés PAMPs (Pathogens Associated Molecular Patterns) ou MAMPs (Microbial-Associated Molecular Patterns) sont des éléments communs aux micro-organismes, pathogènes ou non, et capables d'interagir avec les récepteurs du soi PRRs (Pattern Recognition Receptors) (Sansonetti and Medzhitov, 2009). Ces motifs MAMPs sont d'origines très diverses (bactéries, parasites, virus) et de nature variée (protéines, sucres, acides nucléiques). La liaison de ceux-ci avec les récepteurs PRRs va induire des réponses immunitaires visant à éliminer les agents pathogènes et à conserver le microbiote intestinal commensal (Figure 13).

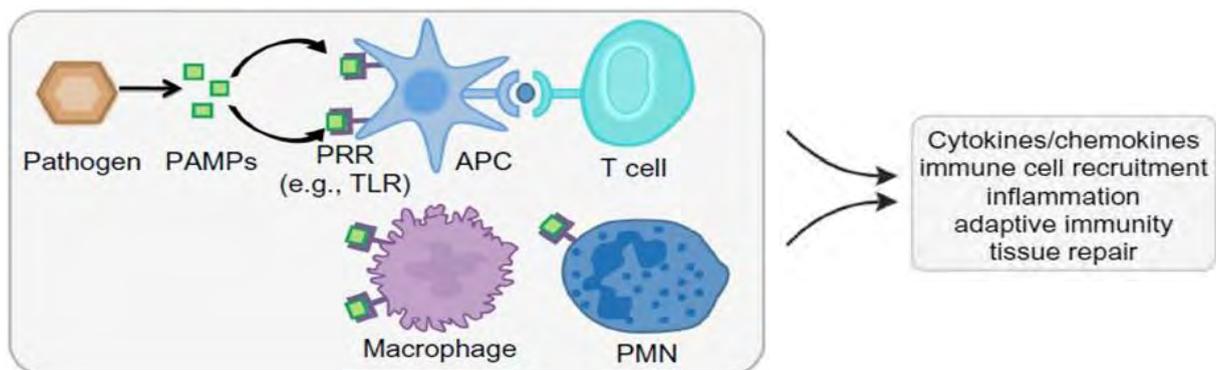


Figure 13 : Réponse du système immunitaire innée basée sur la reconnaissance des PAMPs (Adapté de Valles et al., 2014).

Les entérocytes reconnaissent des motifs MAMPs portés par les bactéries du microbiote, comme les lipopolysaccharides (LPS), le peptidoglycane, la flagelline et les lipoprotéines via les récepteurs PRRs (Sansonetti and Medzhitov, 2009). Ces récepteurs PRRs sont principalement présents au niveau de la membrane cellulaire bien que certains sont contenus dans le cytoplasme. La reconnaissance des produits du microbiote intestinal par les PRR est importante aussi bien dans la protection contre les altérations épithéliales que dans le maintien de l'homéostasie hôte-bactéries (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

La famille des PRRs inclut les récepteurs TLRs (Toll like Receptors), les NLRs (NOD-like Receptors) et les RLRs (RIG-I-Like Receptors) (Marques and Boneca, 2011). Les récepteurs TLRs (1 à 11) jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des microorganismes (Figure 14), dans l'induction de gènes antimicrobiens et dans le contrôle des réponses de l'immunité (Cario, 2005). Parmi les réponses immunitaires innées induites par les TLRs, on retrouve la synthèse de peptides antimicrobiens, de cytokines et de chimiokines jouant un rôle crucial dans la défense de l'hôte (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

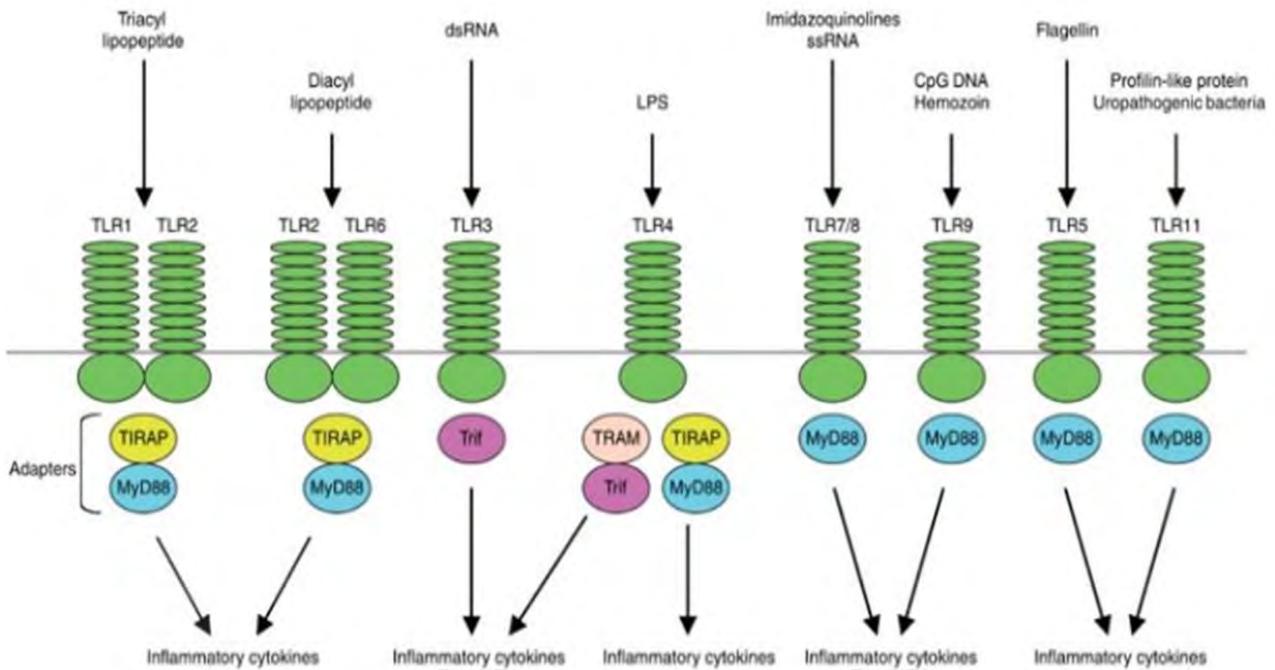


Figure 14: Les TLRs et leurs ligands (Kawai and Akira, 2006).

Les récepteurs NLRs et RLRs constituent deux autres familles qui sont cytoplasmiques et qui sont impliqués dans la reconnaissance de composants bactériens et viraux intracellulaires (Medzhitov, 2008). Parmi les NLRs, les récepteurs NODs (NOD1 et NOD2) ont des fonctions similaires aux TLRs bien qu'ils soient structurellement différents (Cario, 2005). Au niveau de l'intestin, NOD2 serait exprimé de manière constitutive ou inductible au niveau des monocytes, des macrophages et des lymphocytes, ainsi qu'au niveau des cellules épithéliales. Enfin, le MDP (muramyl dipeptide), motif spécifique du peptidoglycane bactérien, est un ligand de NOD2 bien identifié (Cario, 2005; Sansonetti and Medzhitov, 2009). Les récepteurs RLRs reconnaissent essentiellement des composants viraux, et vont activer les voies de signalisation NFκB, MAP-kinases et interférons (Medzhitov, 2008).

La mise en place de la signalisation des PRRs provoque l'activation de la voie NFκB et la transcription de cytokines pro-inflammatoires (Wells et al., 2010). Via cette signalisation, différents mécanismes de défense vont dégrader les bactéries luminales notamment grâce à la sécrétion de peptides antimicrobiens (Sansonetti, 2004; Wells et al., 2010). Ainsi, l'hôte possède donc des voies mécanistiques qui permettent de faire la distinction entre les microorganismes commensaux et pathogènes afin de trouver un équilibre entre tolérance et immunité (Poligné, J., 2011).

Les cytokines

Le développement d'une réponse immunitaire implique de nombreux types cellulaires dont les interactions sont médiées par les cytokines. Celles-ci sont sécrétées particulièrement par les cellules du système immunitaire. Elles se lient à des récepteurs spécifiques situés à la membrane de leurs cellules cibles et déclenchent la transduction de signaux. On dénombre 4 familles de cytokines : les cytokines de classe I, les cytokines de classe II ou interférons, les facteurs de nécrose tumorale (TNF) et les chimiokines. On peut également diviser les cytokines en deux parties, celles conduisant à l'inflammation (pro-inflammatoire) et celles participant à l'inhibition de l'inflammation (anti-inflammatoire) (Figure 15). Cependant, rare sont les cytokines ayant des propriétés exclusivement pro- ou anti-inflammatoire et leurs effets dépendent du contexte cellulaire et moléculaire (Poligné, J., 2011).

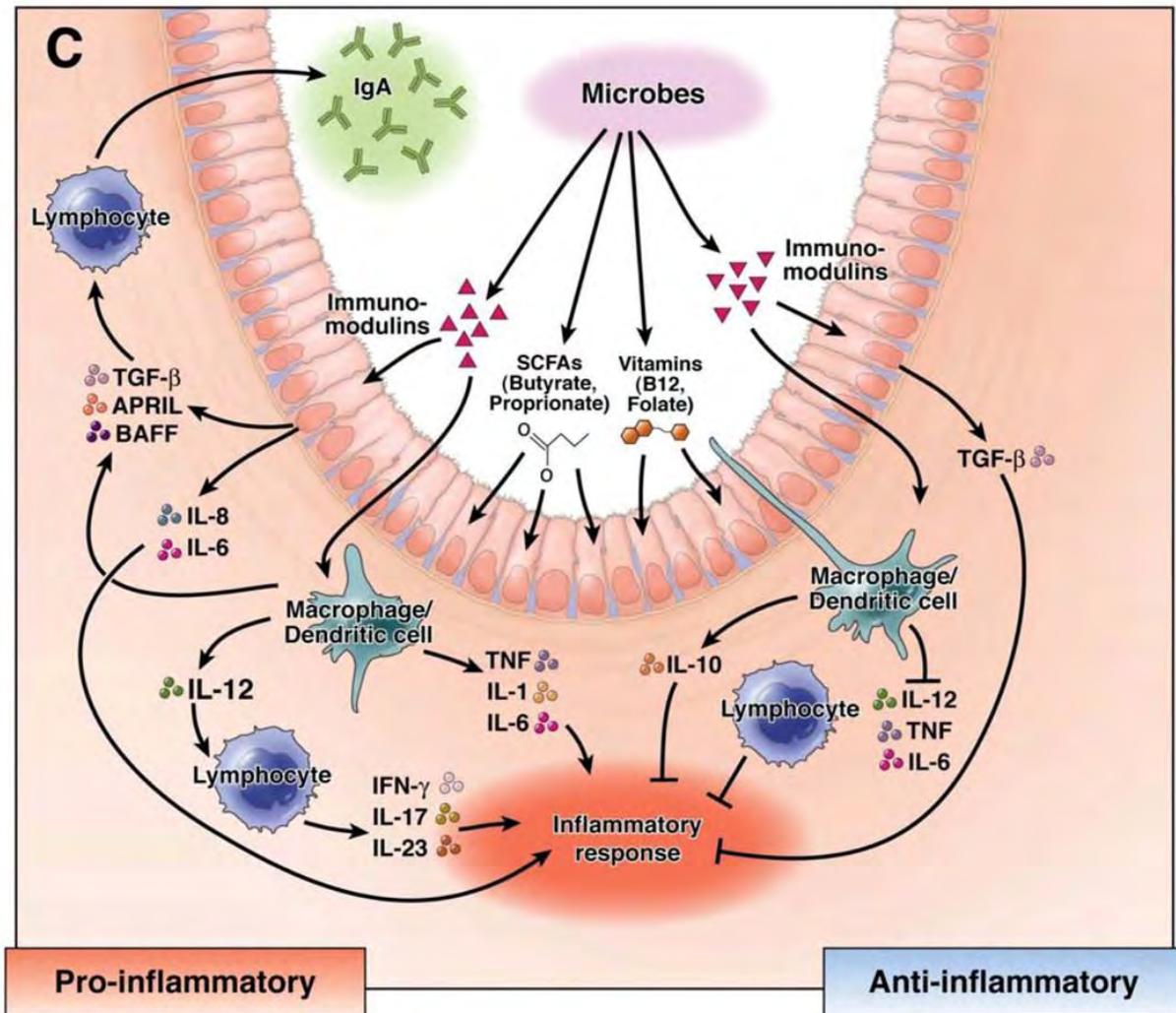


Figure 15 : Libération des cytokines pro- et anti-inflammatoires en réponse aux métabolites microbiens.

Les métabolites microbiens régulent le système immunitaire de la muqueuse dans l'intestin par des mécanismes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. L'immuno-stimulation peut se produire en réponse à la libération de cytokines pro-inflammatoires à partir de cellules épithéliales, de cellules mononucléaires et de lymphocytes, les réponses anti-inflammatoires sont conduites par la production de TGF-β et d'IL-10 à partir de cellules épithéliales et mononucléaires.

Les peptides antimicrobiens

Plusieurs molécules antimicrobiennes sécrétées par l'épithélium intestinal participent à l'intégrité de la barrière intestinale. Les peptides et protéines antimicrobiennes (PAM) peuvent être sécrétés par tous les types cellulaires de l'épithélium digestif, incluant les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules de Paneth, ces dernières étant les cellules spécialisées dans ce processus. La régulation de la sécrétion de ces PAMs est complexe et mal connue. Si la sécrétion des α-défensines est constitutive, celle d'autres peptides comme *RegIIIγ* est induite par des stimuli microbiens via

l'activation des TLR ou des NOD (Vaishnava et al., 2008). A titre d'exemple, la sécrétion des peptides antimicrobiens est diminuée chez les patients MICI notamment chez les sujets porteurs de certaines mutations génétiques, tels que les gènes NOD2 et TLR4 (Franchimont et al., 2004; Wehkamp, 2004). Après la détection des signaux bactériens, les cellules de Paneth libèrent le contenu de leurs granules dans la lumière intestinale (Duerkop et al., 2009). Les cellules de Paneth sont situées à proximité des cellules souches, et permettent via la libération de fortes concentrations en PAMs au niveau des cryptes intestinales de protéger ces cellules nécessaires au bon renouvellement de l'épithélium intestinal (Lotz et al., 2007). Des études menées sur des souris KO (Knock-out) ne possédant pas de cellules de Paneth montrent que ces dernières sont indispensables pour contrôler et limiter l'entrée des bactéries symbiotiques et également des bactéries pathogènes à travers la muqueuse intestinale (Cadwell et al., 2008; Liu et al., 2013; Vaishnava et al., 2008).

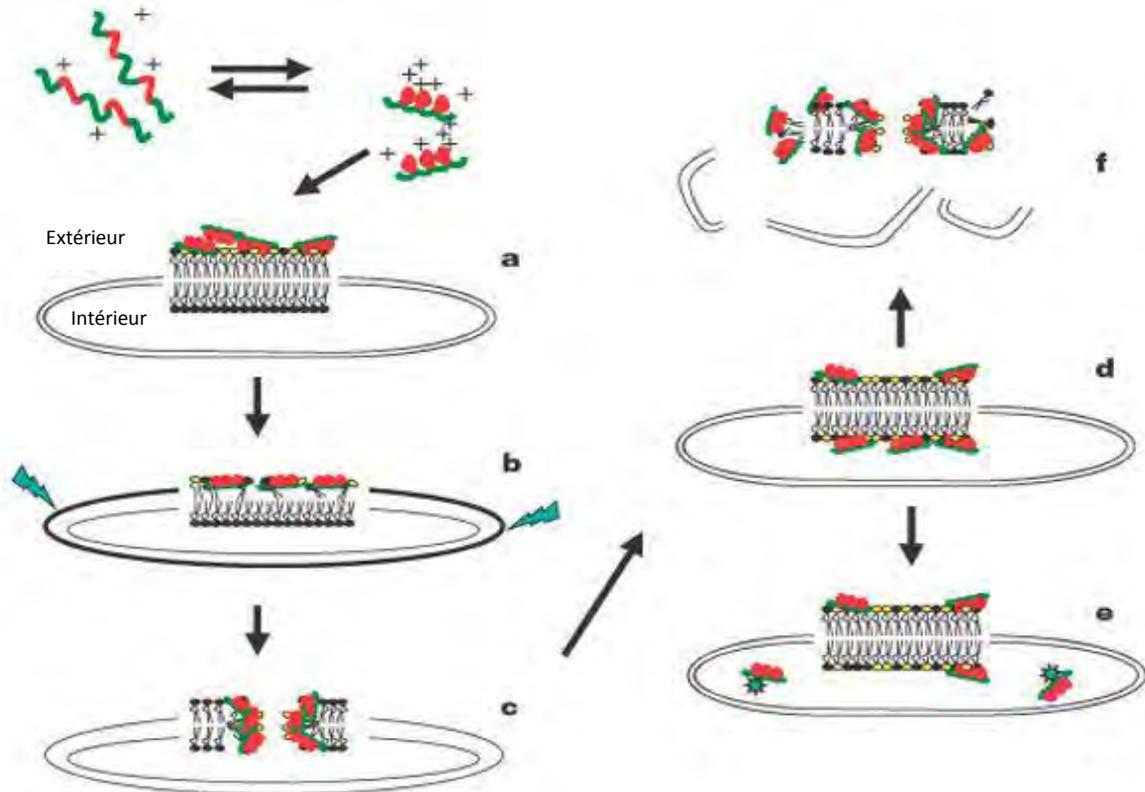


Figure 16 : Le modèle de Shai-Matsuzak-Huagi concernant le mécanisme d'action des peptides antimicrobiens. Zasloff et al., 2002.

(a) Recouvrement en tapis de la membrane externe ; (b) Intégration du peptide dans la membrane entraînant une déstabilisation ; (c) Phase de transition et formation d'un pore ; (d) Fuite des lipides et peptides vers le milieu extracellulaire ; (e) Transport des peptides vers ses cibles intracellulaires ; (f) Rupture de la membrane et mort du microorganisme.

Le modèle de Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) permet de mettre en évidence l'activité de la plupart des peptides antimicrobiens (Figure 16). Ce modèle propose dans un premier temps, l'interaction du peptide antimicrobien avec la membrane externe de la cellule, puis le déplacement des lipides membranaires, l'altération de la structure de la membrane et dans certains cas l'entrée du peptide à l'intérieur de la cellule cible (Zasloff, 2002).

Les défensines

L'activité bactéricide des défensines dépend de leur capacité à former des micro-pores dans la bicouche phospholipidique des membranes bactériennes, provoquant une perte d'intégrité structurale et la lyse de la cellule bactérienne (Fellermann et al., 2003). Cette propriété permet aux défensines de protéger l'épithélium de l'hôte contre les agents pathogènes virulents et aide à réguler le microbiote commensal de façon quantitative et qualitative (Bevins and Salzman, 2011). Il existe plusieurs sous famille de défensines mais les plus connues sont les β et α -défensines. Ces dernières représentent 70% des PAMs sécrétées par les cellules de Paneth (O'Neil et al., 1999). Dans l'intestin grêle, les α -défensines humaines (HD) 5 et 6 sont exprimées le plus souvent par les cellules de Paneth situées à la base des cryptes de Lieberkühn (Wehkamp et al., 2005).

Wehkamp et ses collaborateurs suggèrent une association entre le récepteur intracellulaire NOD2 et l'expression en α -défensines (Lala et al., 2003; Ogura et al., 2003; Wehkamp, 2004). Par ailleurs, les patients atteints de la MC présentant une mutation NOD2 montrent une réduction significative de l'ARNm HD-5 comparés aux patients non porteurs de cette mutation (Wehkamp et al., 2007, 2008) et des taux de HD-5 et HD-6 réduits par rapport aux sujets sains (NAKAMURA et al., 2016; Simms et al., 2008). Ce déficit peut conduire à une invasion bactérienne progressive, à une inflammation et à une perte de tolérance vis-à-vis des bactéries intestinales (Ramasundara et al., 2009; Salzman, 2010) et donner lieu à une augmentation de la fréquence et de la gravité des infections intestinales (Fellermann et al., 2003). En revanche, selon d'autres données, le degré d'inflammation ne serait pas corrélé à la quantité de HD-5 exprimée mais dépendrait plus particulièrement du génotype NOD2. Simms et ses collaborateurs ont mené une étude similaire sur un plus grand nombre de patients et n'obtiennent aucune corrélation entre l'expression des HD-5 et HD-6 et le génotype NOD2. L'étude montre que la réduction spécifique des α -défensines était due à la perte de cellules épithéliales de surface et à la réduction du nombre de cellules de Paneth au niveau de l'épithélium. Ainsi, l'expression des α -défensines dépendrait de la gravité du niveau d'inflammation tissulaire (Simms et al., 2008).

L'ensemble de ces données laisse présumer une cascade d'événements. Une carence en α -défensines dans les cellules de Paneth serait un événement primaire dans la pathogenèse de la MC, et

que le déficit en cellules de Paneth soit un événement secondaire lié à l'état inflammatoire de la muqueuse (Ramasundara et al., 2009). A ce jour, aucun déficit en α -défensines n'a été mis en évidence chez les patients souffrants du SII.

Les cathélicidines

Les cathélicidines représentent la deuxième classe de molécules antimicrobiennes la plus répandue au niveau de l'épithélium intestinal. Le représentant chez l'Homme est le LL37. *In vitro*, LL37 est capable de recruter des cellules immunitaires comme les monocytes, les macrophages ou les cellules T (Koczulla et al., 2003) pour permettre la sécrétion de cytokines de type Th1 (Davidson et al., 2004). Un effet protecteur des cathélicidines a été mis en évidence dans des modèles animaux mimant la MC (Schauber et al., 2006). Ces données suggèrent des fonctions complexes de LL-37 dans les MICI (Sun et al., 2016). Cependant, à notre connaissance, aucune modification de la production de cathélicidines n'a été observée chez les patients souffrants du SII. CRAMP ou « cathelin-related antimicrobial peptide » est l'équivalent de LL37 chez la souris (Bucki et al., 2010).

La phospholipase A2

La phospholipase A2 (PLA2) est un composant des granules des cellules de Paneth. Elle est libérée dans la lumière intestinale suite à une stimulation par les lipopolysaccharides (Müller et al., 2005). Il a été démontré que la PLA2 purifiée à partir des cellules de Paneth d'origine murine possède une activité bactéricide contre *Salmonella typhimurium* et *Listeria monocytogenes*, traduisant un rôle dans la défense immune intestinale (Nevalainen et al., 2008).

Les lectines de type C

Les lectines de type C, comme par exemple *RegIIIa* chez l'Homme et *RegIIIy* chez la souris, sont des PAM produits par les cellules de Paneth et les entérocytes dans l'intestin grêle. Le signal est représenté par un facteur microbien, qui en se liant aux récepteurs TLR9 et NOD2, déclenche l'expression ou la sécrétion de lectines de type C. Les récepteurs TLR9 et NOD2 sont modulés dans les MICI (Kingeter and Lin, 2012). Aussi, *RegIIIy* est quasiment absent chez les souris axéniques suggérant un lien entre son expression et le microbiote intestinal chez la souris (Muniz et al., 2012). En effet, la greffe d'une flore microbienne chez ces souris rétablit l'expression du peptide (Muniz et al., 2012).

Le lysozyme

Le lysozyme est une protéine antimicrobienne de 130 acides aminés chez l'Homme, sécrétée en condition physiologique par les cellules de Paneth dans l'intestin grêle. On le retrouve également dans les larmes ou le lait maternel (Jollès and Jollès, 1967). Concernant son mécanisme d'action, il est

généralement bien admis que le lysozyme est actif contre les bactéries Gram-positif grâce à sa fonction enzymatique qui digère la paroi cellulaire des bactéries, en coupant le lien glycosidique $\beta(1-4)$ entre les molécules de N-acetyl glucosamine et N-acetyl muramic acid du peptidoglycane (Chipman and Sharon, 1969). Ce mode d'action enzymatique (muramidase) suggère une résistance des bactéries Gram-négatif dotée d'une membrane externe qui protège le peptidoglycane. Cependant, il est également largement décrit dans la littérature que le lysozyme est actif aussi bien contre les Gram-positifs que les Gram-négatifs grâce à un deuxième mécanisme d'action non lytique. En effet, de nombreux auteurs ont montré que la réduction ou l'élimination de l'activité enzymatique du lysozyme par des traitements dénaturants (chaleur) ou par mutagénèse dirigée ne réduisait pas nécessairement l'activité bactéricide du lysozyme (Masschalck and Michiels, 2003). Laible et Germaine ont été les premiers à démontrer cet effet, en illustrant que du lysozyme humain dont l'activité muramidase était inhibée (par la réduction des ponts disulfures essentiels à l'activité lytique) avait un potentiel bactéricide aussi important que du lysozyme humain natif (Laible and Germaine, 1985). Ce mécanisme de lyse non-enzymatique a été démontré chez *Staphylococcus aureus* (Ibrahim et al., 2001) et *Listeria innocua* (Masschalck et al., 2002). La première étape de ce mécanisme non enzymatique consiste en l'attraction électrostatique du lysozyme chargé positivement par les acides teichoïques et lipoteichoïques et les phospholipides de la surface cellulaire (Ellison and Giehl, 1991; Ibrahim et al., 1996; Masschalck et al., 2001; Nash et al., 2006). Lors de ce mode d'action muramidase-indépendant, la mort cellulaire est le résultat soit de l'activation des autolysines (par interaction du lysozyme avec les acides teichoïques et/ou modification de la charge cationique membranaire) soit par une perturbation de la membrane cytoplasmique due aux caractéristiques intrinsèques du lysozyme (Hébert, 2008; Masschalck and Michiels, 2003). La découverte de ce deuxième mécanisme d'action non enzymatique classe le lysozyme parmi les peptides cationiques antimicrobiens au même titre que les défensines et les cathélicidines (Bevins and Salzman, 2011).

L'importance du rôle du lysozyme dans la physiologie intestinale a été notamment identifiée chez les nouveau-nés souffrant d'entérocrites nécrosantes liée à une absence de lysozyme produits par les cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle. Ce déficit en lysozyme induit l'adhésion à la muqueuse de microorganismes pathogènes ou non, favorisant leur translocation à travers l'épithélium intestinal (Coutinho et al., 1998). La dégranulation du lysozyme par les cellules de Paneth serait liée aux gènes LRRK2 et NOD2 (Rocha et al., 2015), qui eux-mêmes jouent un rôle dans la pathogénèse de la MC. De même, des souris déficientes en *Atg7*, impliqué dans la voie de l'autophagie et associé à la pathogénèse de la MC, montrent une taille réduite des granules des cellules de Paneth et une diminution de l'expression en lysozyme (Cadwell et al., 2008, 2009).

A notre connaissance, nous ne disposons pas de données concernant le niveau d'expression des PAMs chez les patients souffrants du SII. Cependant, une récente étude montre une réduction de la sécrétion de lysozyme dans les cellules de Paneth de souris soumises à un stress néonatal de séparation maternelle (Riba et al., 2017).

3.4 Communication bidirectionnelle : Microbiote– Intestin – Cerveau

Comme nous l'avons vu précédemment, la MC et le SII sont des pathologies multifactorielles qui cumulent de nombreux facteurs de risques génétiques et environnementaux associés au mode de vie occidental moderne. Nous venons de faire une synthèse de ces principaux facteurs. Cependant, force est de constater qu'aucun n'est suffisant à lui seul pour que la maladie s'exprime et c'est probablement leurs interactions qui expliquent l'émergence de la pathologie. Ils peuvent agir en altérant certains paramètres biologiques tels que le microbiote intestinal, la barrière épithéliale, le système immunitaire intestinal et le système nerveux entérique (Figure 17) (Bonaz and Bernstein, 2013; Spiller and Major, 2016).

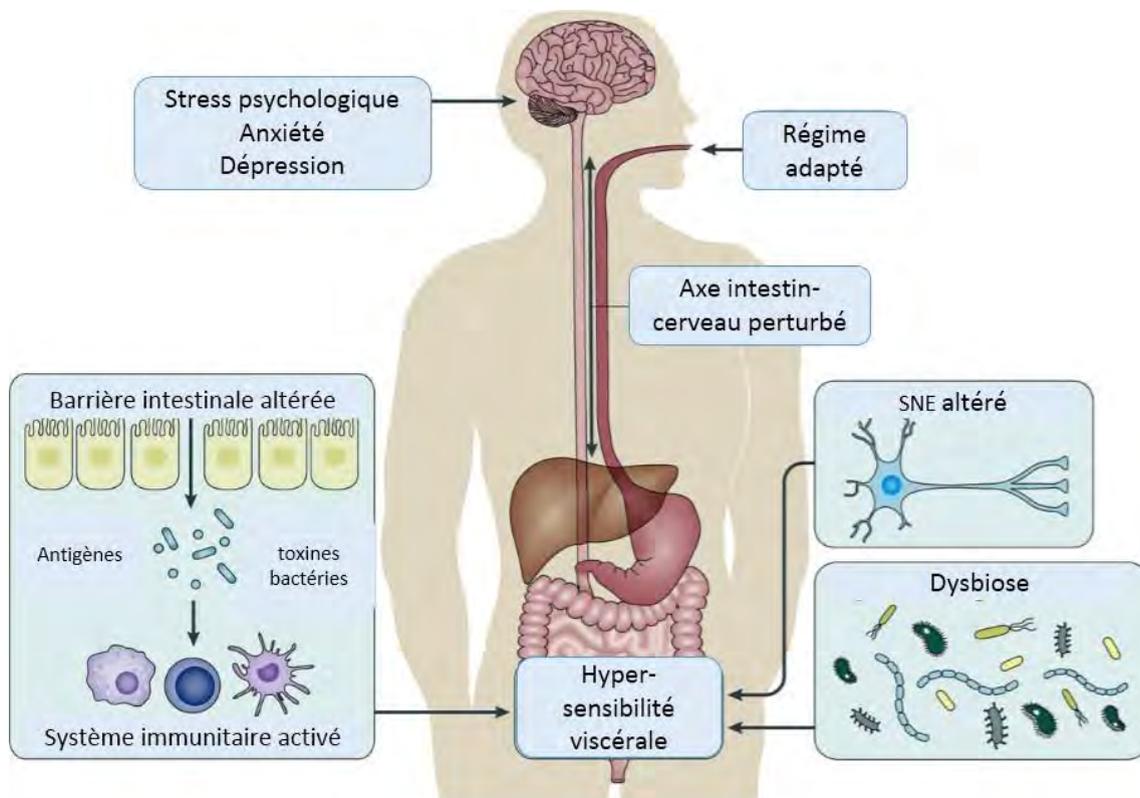


Figure 17 : Les potentiels paramètres partagés dans la MC en rémission et le SII. (Adapté de (Spiller and Major, 2016))

3.4.A Le système nerveux entérique

Le tube digestif possède une autonomie propre, appelé système nerveux entérique (SNE). Il est composé d'environ 200 millions de neurones et est localisé tout le long de l'intestin sous la forme de deux plexus : le plexus myentérique ou d'Auerbach, localisé dans la musculature et le plexus sous-muqueux ou de Meissner, localisé dans la sous muqueuse. Le SNE est la partie du système nerveux autonome (SNA) qui contrôle le système digestif aussi bien pour l'activité motrice (péristaltisme et vomissements) que pour les sécrétions et la vascularisation (Furness, 2008).

Bien qu'appartenant au SNA, le SNE est sous l'influence du système nerveux central (SNC) (Blackshaw et al., 2007; Wilhelmsen, 2000). Le SNE est en interaction avec les systèmes sympathique et parasympathique, mais il fonctionne de manière autonome. Les voies efférentes véhiculent les informations du SNC vers le tube digestif et à l'inverse les voies afférentes véhiculent les informations en provenance du tube digestif vers le SNC (Gershon, 1981). Par l'intermédiaire des afférences digestives, le cerveau est, de façon consciente ou inconsciente, en permanence informé par notre tube digestif. Le cerveau intègre les informations en provenance de l'intestin et génère une réponse adaptée. De plus, le SNE utilise les mêmes neurotransmetteurs que le SNC (acétylcholine et noradrénaline), mais également la sérotonine, dont il est le principal fournisseur (95%). Ces messages arrivent jusqu'à l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, ensemble complexe de régulations et d'interactions entre l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes cortico-surréniennes (Costa et al., 2000; Furness, 2000; Goyal and Hirano, 1996). Ce système neuroendocrinien régule les fonctions physiologiques comme la digestion mais également la perception et la réponse au stress. De plus, la sérotonine est impliquée dans la gestion des émotions, ce qui explique que les manifestations fonctionnelles liées au stress se traduisent par des manifestations digestives (Rhee et al., 2009).

Un nombre croissant d'études suggère l'implication du SNE dans les maladies digestives. Ainsi, les voies nerveuses joueraient un rôle important dans les phases d'initiation de la réponse inflammatoire (Furness, 2008). De plus, l'activité du SNE serait modulée, voire altérée, lors de processus inflammatoires intestinaux, conduisant à l'émergence de troubles fonctionnels de la motricité, de la sécrétion d'électrolytes et à une hypersensibilité viscérale (Barbara et al., 2004, 2007; Drossman, 1999).

3.4.B La sensibilité viscérale

Parmi les pathologies digestives reflétant un dysfonctionnement de l'axe intestin-microbiote-cerveau, la MC et le SII sont caractérisés notamment par une douleur viscérale. Il existe deux types de douleurs viscérales (Figure 18) : 1) L'hyperalgésie viscérale qui se traduit par une augmentation des réponses à des stimuli mécaniques ou thermiques, induisant la sensibilisation des nocicepteurs ; 2) l'allodynie qui se caractérise par la sensation d'une douleur à la suite d'une stimulation normalement non nociceptive (Gebhart, 1999).

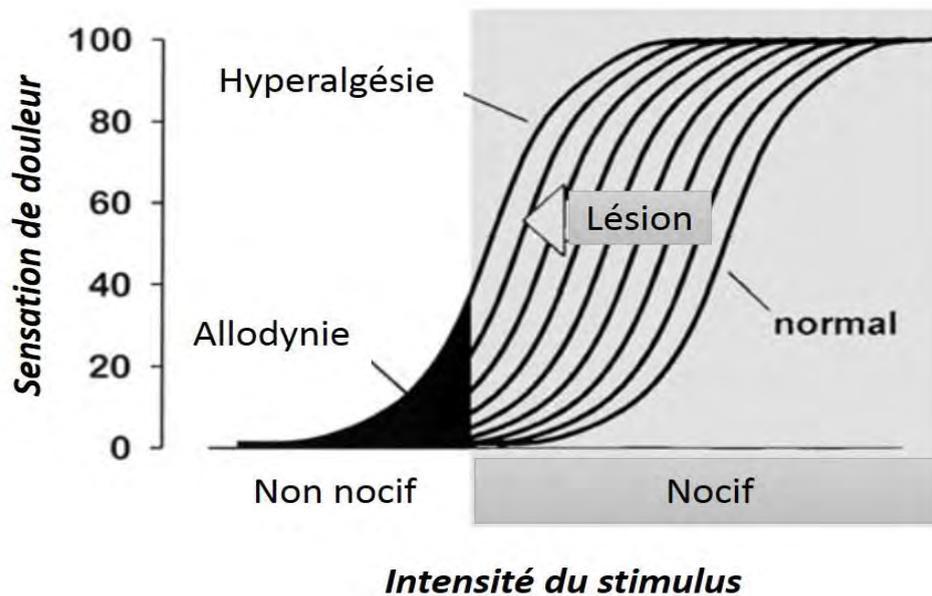


Figure 18 : Douleur ressentie lors de l'hyperalgésie et de l'allodynie en fonction de l'intensité du stimulus (Gebhart 1999).

Comme évoqué précédemment, 33 à 57% des patients ayant une MC en rémission prolongée vont développer une hypersensibilité viscérale, avec des tableaux évocateurs du SII, caractérisés par des douleurs abdominales, ballonnements et troubles du transit même en l'absence d'inflammation de la muqueuse (Faure and Giguère, 2008; Minderhoud et al., 2004; Piche et al., 2010; Simrén et al., 2002). Les patients souffrant du SII se plaignent de douleurs abdominales dans les zones viscérales présentant des afférences somatiques communes (Feng et al., 2012). De plus, plus de 35% des individus atteints de SII montrent une hypersensibilité viscérale, avec des seuils de douleurs bas associés à des sensations douloureuses plus élevées lors de distensions colorectales, technique de référence pour mesurer la douleur viscérale chez l'Homme et chez l'animal (Zhou et al., 2010, 2016).

3.4.C Stress et douleur viscérale

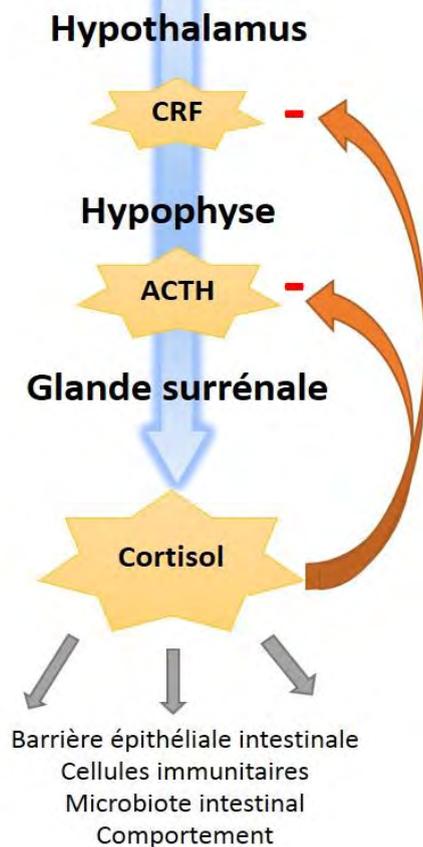


Figure 19 : Caractérisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

Le stress est considéré comme un paramètre clé dans la pathogenèse du SII. Le CRF (*corticotrophin-releasing factor*) est le principal médiateur de la réponse au stress dans l'axe intestin-cerveau (Rivier et al., 1986). De nombreux arguments plaident en faveur du rôle du stress, à travers l'axe corticotrope et le SNA sympathique et parasympathique vagale dans le SII et la MC. En effet, la réponse au stress est médiée par l'axe HPA et par le SNA (Elenkov and Chrousos, 2002). Le stress entraîne une activation de l'hypothalamus qui sécrète alors le CRF. Cette hormone amène à son tour l'hypophyse à produire l'hormone ACTH (adrénocorticotropine) qui circule dans le système sanguin pour atteindre les glandes surrénales où elle provoque le relâchement de cortisol (Dunn and Berridge, 1990). Le CRF contrôle ainsi les réponses autonomes, immunologiques et émotionnelles au stress (Turnbull and Rivier, 1997). Ce processus forme une boucle de rétrocontrôle négative où l'excès de cortisol active les récepteurs du cerveau et supprime la production de CRF (Figure 19). Cependant chez les patients souffrant de dépression, cette boucle ne fonctionne plus d'où une production excessive de CRF, et donc de cortisol. Un événement stressant augmente significativement le taux de cortisol et de CRF sanguin chez ces patients (Arborelius et al., 1999; Reul and Holsboer, 2002). Le CRF agit à travers le récepteur CRF de type 1 (CRF1) et de type 2 (CRF2), exprimés à la fois dans le cerveau dans les cellules neuronales mais aussi au niveau de l'intestin dans les cellules

caliciformes et les cellules immunitaires (Wallon et al., 2008). Le CRF libéré lors du stress active les deux récepteurs: CRF1, qui contribue à l'hypersensibilité viscérale et CRF2, qui contrecarre les effets physiologiques de l'activation du CRF1 en régulant la libération des neurotransmetteurs par les neurones myentériques (Taché et al., 2002). Le CRF influence également sur la fonction de barrière épithéliale de l'intestin, en agissant sur la production de mucus, la sécrétion d'électrolytes et d'eau et la perméabilité épithéliale (Ferrier, 2008; Taché and Perdue, 2004). La réaction excessive à un facteur

de stress peut s'expliquer par l'expression différentielle des récepteurs au CRF dans le SII, principalement attribuée à une augmentation de la signalisation des CRF1 (Fukudo, 2007).

Les effets du stress sur les fonctions du tractus GI ont été démontrés chez l'Homme et l'animal sains. Ils entraînent notamment des troubles de la motricité digestive illustrés classiquement par une inhibition de la vidange gastrique, un ralentissement de la motricité de l'intestin grêle et une accélération du transit colique (Williams et al., 1988). Ces modifications fonctionnelles sont également associées à une augmentation de la sensibilité viscérale en abaissant le seuil de perception au niveau du tube digestif (Whitehead et al., 1990). Ces troubles de la sensibilité viscérale sont corrélés à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal qui entraîne à son tour une translocation bactérienne (Piche, 2014; Zhou et al., 2010).

Dysbiose et communication intestin-cerveau

La fonction de barrière intestinale joue un rôle central dans la signalisation bidirectionnelle cerveau-intestin et la fonction immunitaire y est associée. La détérioration de la barrière intestinale et la dérégulation des réponses immunitaires associée sont des processus qui peuvent s'accompagner d'une inflammation de la muqueuse et d'une signalisation sensorielle afférente accrue conduisant à des plaintes abdominales (Cryan and Dinan, 2012; Rhee et al., 2009). Des modifications dans les interactions bidirectionnelles de l'axe intestin-cerveau sont impliquées dans la pathogenèse des troubles gastro-intestinaux fonctionnels. L'altération du microbiote intestinal est le dénominateur commun à de nombreuses pathologies intestinales inflammatoires ou liées au stress (Moloney et al., 2016). La dysbiose serait fortement impliquée dans l'altération du dialogue intestin-cerveau (Bercik et al., 2012; Mayer, 2011). Les données de la littérature scientifique montrent que cette dysbiose pourrait contribuer au maintien SII ou à la rechute de la MC en augmentant la perméabilité intestinale, en activant la réponse immunitaire des muqueuses, en augmentant la sensibilité viscérale via l'axe HPA et en modifiant la motricité intestinale (Bonaz and Bernstein, 2013; Hyland et al., 2014; Moloney et al., 2016).

Chez les patients atteints de MC, certaines espèces surreprésentées sont capables de stimuler les voies nociceptives et/ou d'induire des réactions inflammatoires (Derrien et al., 2010). Par exemple, les bactéries mucolytiques telles que *Akkermansia muciniphila* et *Enterorhabdus mucosicola* peuvent dégrader la couche de mucus afin de traverser la barrière épithéliale et stimuler les cellules immunitaires et neuronales sous-jacente (Lepage et al., 2011; Ohkusa and Koido, 2015). Aussi, certaines bactéries telles que les *Escherichia coli entero-hémorragiques* (EHEC) peuvent moduler les propriétés physico-chimiques de la barrière épithéliale, augmentant la perméabilité intestinale et

entraînant une translocation bactérienne excessive. Ce microbiote déséquilibré, peut par la suite entrer en contact avec les cellules immunitaires puis entraîner une dérégulation de la réponse inflammatoire, ou des nocicepteurs viscéraux provoquant une sensibilisation (Berin et al., 2002). Chez les patients souffrant du SII, cette dysbiose se traduit par la prolifération d'espèces bactériennes sulfato-réductrices qui produisent plus de gaz (H₂S) (Crouzet et al., 2013). Cette augmentation de gaz (hydrogène et méthane) peut à terme, affecter l'activité des cellules intestinales épithéliales et immunitaires, et conduire à une sensibilité intestinale (Chassard et al., 2012; M.P. Bennet et al., 2015; Shukla et al., 2015).

Protéases et communication intestin-cerveau

Dans les fèces provenant de patients atteints du SII, l'augmentation de l'activité des protéases est corrélée à une perturbation de la perméabilité intestinale (Róka et al., 2007). Ces protéases, pourraient être d'origine digestive, immunitaire ou microbienne. En effet, en plus des mastocytes, les bactéries du côlon peuvent produire des protéases (sérine, cystéine ...) (Figure 20). Une origine microbienne des protéases, impliquée dans l'augmentation de la perméabilité intestinale (Annaházi et al., 2013), a été démontrée en utilisant un traitement oral d'antibiotiques chez la souris, réduisant l'activité de la sérine protéase (Gecse et al., 2008).

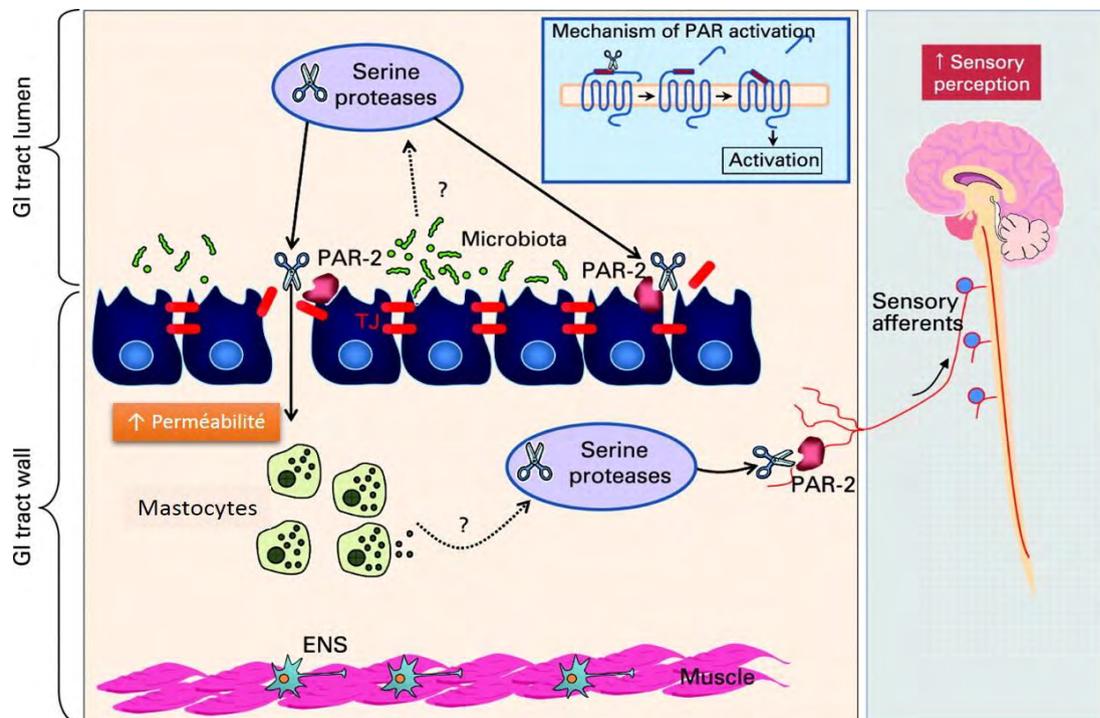


Figure 20 : Mécanisme d'action des protéases à sérine : D'origine microbienne ou mastocytaire, elles altèrent les jonctions épithéliales par un mécanisme activé par le récepteur PAR2, créant ainsi des défauts de barrière épithéliale conduisant à une perméabilité intestinale accrue. En outre, les sérines protéases activent le récepteur-2 activé par la protéinase sur les neurones sensoriels, induisant une hyperalgésie viscérale. (Adapté de (Barbara and Cremon, 2008))

De même, certaines espèces bactériennes intestinales spécifiques ont été associées à cette activité protéolytique dans les fèces. Ainsi, la perte de la diversité microbienne serait directement corrélée à l'activité des protéases. Ces protéases activent des récepteurs PAR (Protease Activated Receptor) au niveau de l'épithélium intestinal ou sur les nerfs entériques pour réguler l'inflammation, la motilité et la sécrétion (Cenac et al., 2007; Vergnolle, 2008). Par exemple, Gecse et ses collaborateurs ont montré une augmentation des sérines protéases chez les patients souffrant du SII-D (Gecse et al., 2008). Ces sérines protéases activent ensuite les récepteurs PAR-2, entraînant une cascade de signalisation, aboutissant à une augmentation de la perméabilité intestinale (Van Spaendonk et al., 2017) et à une hypersensibilité viscérale (Barbara and Cremon, 2008; Gecse et al., 2008).

Métabolites microbiens et communication intestin-cerveau

Le tryptophane, un acide aminé essentiel est un précurseur de la sérotonine (5-HT). 5-HT est une molécule de signalisation clé dans l'axe intestin-cerveau, à la fois dans le SNE (Mawe and Hoffman, 2013) et le SNC (Ruddick et al., 2006). L'information issue des études menées sur des animaux axéniques montre que le microbiote intestinal coordonne la disponibilité périphérique du tryptophane (Clarke et al., 2013). Les concentrations plasmatiques de tryptophanes peuvent être normalisées suite à la colonisation microbienne d'animaux axéniques et peuvent également être augmentées suite à l'administration de la souche probiotique *Bifidobacteria infantis* (Desbonnet et al., 2008).

Les acides gras à chaînes courtes (AGCC) sont absorbés par l'hôte et utilisés comme source d'énergie. Récemment, les AGCC ont été étudiés pour leurs effets sur le métabolisme systémique de l'hôte, en particulier comme agents induisant la satiété (Arora and Sharma, 2011; Frost et al., 2014). Afin d'augmenter la concentration en propionate et en butyrate dans le tube digestif par des moyens alimentaires, il est important de bien caractériser les bactéries qui produisent ces AGCC. De nombreux progrès ont été réalisés dans l'identification des bactéries productrices de butyrate, révélant qu'elles appartiennent à plusieurs classes différentes dans les *Firmicutes* (Louis and Flint, 2009; Louis et al., 2010). *E. rectale* / *Roseburia spp.* est un groupe abondant producteur de butyrate (Louis and Flint, 2009) dans le groupe *clostridial XIVa*. Une baisse marquée de l'abondance de ces bactéries chez des volontaires sains à l'aide d'un régime à forte teneur en protéines et à faible teneur en glucides est fortement corrélée à une chute des taux de butyrate dans les matières fécales (Duncan et al., 2007). *Faecalibacterium prausnitzii* (groupe *clostridial IV*), une autre espèce abondante produisant du butyrate (Lopez-Siles et al., 2012, 2015), possède des propriétés anti-inflammatoires (Martín et al., 2014; Miquel et al., 2014, 2015; Sokol et al., 2008). Beaucoup d'autres genres dans plusieurs grappes *clostridiales* produisent du butyrate, dont certains sont connus pour contribuer aux fonctions

spécialisées, y compris les espèces appartenant à *Clostridial XIVa* qui peuvent convertir le lactate en butyrate (Duncan et al., 2004).

En résumé, il existe de multiples voies grâce auxquelles le microbiote intestinal dialogue avec l'épithélium, les neurones entériques et les terminaisons nerveuses des nerfs vagues et rachidiens. Toutefois, de nombreuses études sont nécessaires pour évaluer comment les altérations de ces interactions microbes-hôtes résultent et contribuent à la pathogenèse de différentes maladies. Plusieurs voies potentielles directes et indirectes existent à travers lesquelles le microbiote intestinal peut moduler l'axe intestin-cerveau (Figure 21). Elles comprennent les voies endocriniennes (cortisol), immunitaires (cytokines et peptides antimicrobiens) et neuronales (vague et système nerveux entérique). Le cerveau stimule en retour ces mêmes acteurs pour influencer la composition du microbiote intestinal. Par exemple, dans des conditions de stress, l'axe HPA régule la sécrétion du cortisol qui peut stimuler les cellules immunitaires (vis-à-vis de la sécrétion des cytokines) localement dans l'intestin et sur le plan systémique (Elenkov and Chrousos, 2002; Hattay et al., 2017). Le cortisol peut également altérer la perméabilité intestinale et la fonction de barrière et modifier la composition du microbiote intestinal. À l'inverse, le microbiote intestinal et les agents agissant sur ce dernier peuvent modifier la perméabilité intestinale et les niveaux de cytokines circulantes, ce qui peut avoir un effet marqué sur les fonctions cérébrales et cognitives (Cryan and Dinan, 2012)

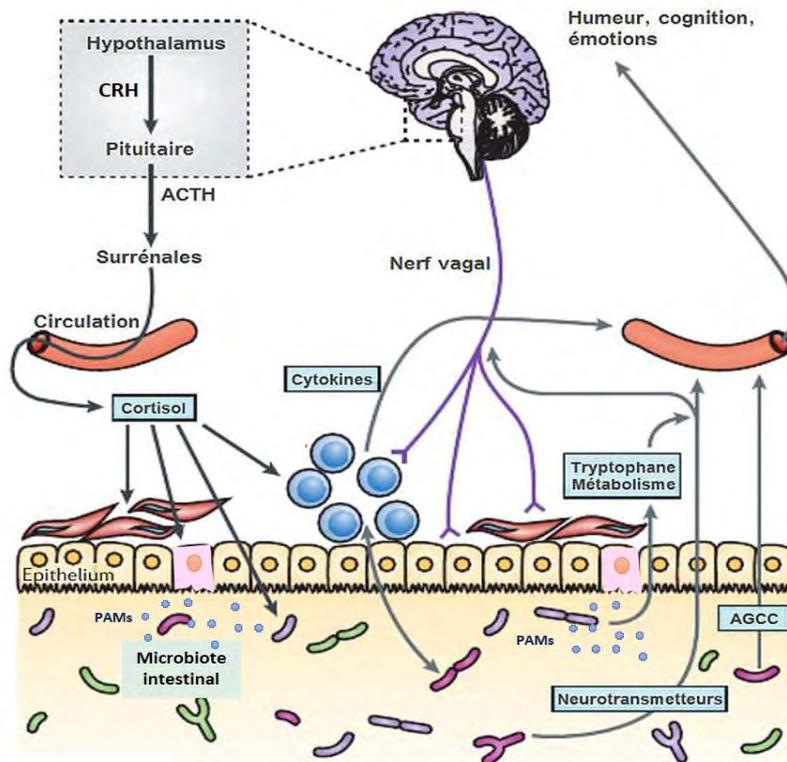


Figure 21 : Les voies impliquées dans la communication bidirectionnelle entre le microbiota intestinal et le cerveau (Cryan and Dinan, 2012).

CHAPITRE II

Modèles expérimentaux d'inflammation et de stress chez les rongeurs

Il existe plusieurs méthodes et outils pour provoquer une altération de la barrière intestinale, une dysbiose et une inflammation intestinale plus ou moins sévère sur des modèles expérimentaux. L'inflammation intestinale peut être induite par l'exposition de l'animal à divers agents physiques ou chimiques. Elle peut aussi être spontanée chez des animaux transgéniques notamment par invalidation de gènes impliqués dans l'expression de certaines cytokines ou de voies de signalisation de certaines protéines impliquées dans la réponse inflammatoire (Warren Strober et al., 2002; Westbrook et al., 2016). Une altération de la barrière intestinale peut aussi être provoquée par un stress psychologique (Söderholm and Perdue, 2001). Cependant aucun modèle ne possède l'ensemble des caractéristiques cliniques et physiopathologiques des pathologies humaines, mais ces approches expérimentales permettent à la fois de mieux étudier la physiopathologie des MICI et du SII et de tester de nouveaux agents thérapeutiques dans le traitement de ces pathologies.

1. Les modèles d'inflammation digestive

1.1 Modèles d'inflammation spontanée

1.1.A Souris C3H/HeJ Bir

Les souris C3H/HeJ Bir développent de manière spontanée une inflammation au niveau de la région iléo-caecale et du côlon proximal. Cette inflammation spontanée apparaît à 3-4 semaines de vie et se résorbe à 10-12 semaines. L'augmentation d'IFN γ et d'IL-2 durant la phase critique indique que ce modèle d'inflammation est lié à une réponse de type Th1. La pathogénèse implique une hyper-réactivité des lymphocytes T et B vis-à-vis des antigènes des bactéries lumineales (Brandwein et al., 1997; Fort et al., 2005).

1.1.B Souris SAMP/Yit

Cette souche murine développe de manière spontanée une inflammation intestinale transmurale, localisée au niveau de l'iléon, avec la présence de zones normales de muqueuse intestinale alternant avec des régions inflammatoires. Elle partage de nombreuses similitudes avec la physiopathologie de la MC, comme des altérations de la morphologie épithéliale, des granulomes, une hyperplasie des cryptes, une infiltration des cellules inflammatoires aiguës et chroniques, des lésions

cutanées spontanées et, dans certains cas, l'apparition de fistules périrectales (Mikulski et al., 2015; Rivera-Nieves et al., 2003). La progression de l'inflammation ainsi que l'augmentation de la perméabilité intestinale impliquent la stimulation des voies Th1- et Th2-dépendantes. Dans ce modèle, une altération des cellules de Paneth et/ou des cellules caliciformes sont également observées, et pourraient jouer un rôle dans l'initiation de l'inflammation. A trois semaines de vie, une augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale est observée chez ces animaux (Hibi et al., 2002; Strober et al., 2001).

1.2 Modèles génétiquement modifiés

Le développement d'une grande variété de modèles murins transgéniques ou knock-out (KO) a ouvert de nouvelles voies d'études de la pathogénèse des maladies digestives. Ils sont couramment utilisés pour étudier l'impact de l'altération de fonctions de la barrière intestinale et/ou de la régulation immunitaire.

1.2.A Les souris IL-2^{-/-}

L'IL-2 est une cytokine régulatrice indispensable au système immunitaire. Dans des conditions physiologiques, cette interleukine active les cellules T, les macrophages, les cellules NK ainsi que la différenciation des lymphocytes B. Les souris déficiente pour l'IL-2 développent une colite chronique entre la 6^{ème} et la 15^{ème} semaine de vie (Sadlack et al., 1993). Dans ce modèle, l'intestin grêle est sain, alors que le côlon est sévèrement affecté ce qui se traduit par la présence d'ulcères et un épaissement de la paroi colique. De plus, une déplétion de mucus et une dysplasie des cellules épithéliales, symptômes également décrits dans les MICI chez l'Homme, sont observés dans ce modèle. Ces souris KO montrent des concentrations élevées en IL-12 et en IFN γ , suggérant que l'infiltrat des lymphocytes T est en partie composé de cellules de type Th1 (Contractor et al., 1998; Hibi et al., 2002).

1.2.B Les souris Muc2^{-/-}

La mucine Muc2 est le constituant principal de la couche de mucus recouvrant l'épithélium intestinal, en particulier le côlon. Son niveau est abaissé chez les patients souffrants de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Le défaut de sécrétion de mucus chez les souris Muc2^{-/-} entraîne une colite spontanée dès la 5^{ème} semaine qui s'aggrave avec l'âge de la souris. Cette inflammation se traduit par une morphologie anormale marquée par une augmentation de l'épaisseur de la muqueuse intestinale, l'aplatissement et l'ulcération des cellules épithéliales, la perte générale de l'architecture cellulaire, une légère augmentation des cellules inflammatoires, et une diminution de la différenciation cellulaire dans le côlon (Sluis et al., 2006).

1.2.C Les souris IL-10^{-/-}

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire cruciale, produite par les cellules B, T et les macrophages. L'IL-10 a pour rôle de diminuer la fonction des cellules Th1, NK et des macrophages. Les souris KO pour l'IL-10 présentent une inflammation pouvant toucher l'ensemble de l'intestin (Kühn et al., 1993). Cependant les lésions sont le plus couramment observées au niveau du duodénum, du jéjunum et du côlon proximal. Il a été montré que l'inflammation développée dans ce modèle évolue en deux phases distinctes. Dans la phase précoce, l'IL-12 joue un rôle clé, impliquant une réponse de type Th1. Dans la phase tardive, l'absence d'IL-12 et la production d'IL-4 et d'IL-13, indiquent un mécanisme de type Th2 (Spencer et al., 2002). La déplétion en cytokines induites par la réponse de type Th1 comme l'IFN γ et l'IL-12, empêche le développement d'une colite dans ce modèle (Berg et al., 1996). En condition exempte de pathogènes spécifiques (« Specific pathogen free », SPF), ces souris développent une inflammation moins sévère et limitée au niveau du côlon proximal, suggérant que dans ce modèle, le microbiote joue un rôle crucial dans le développement de la réponse immunitaire dérégulée. En effet, il a été décrit récemment une diminution progressive de la diversité microbienne à trois et quatre semaines chez les souris IL-10^{-/-}. La dysbiose qui y est associée se traduit par une augmentation de *Proteobacteria* et d'*Escherichia coli* (Maharshak et al., 2013).

1.2.D Les souris Stat-3^{-/-}

STAT-3 (Signal transducer and activator of transcription) est un facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation de l'IL-10 (Wittkopf et al., 2015). L'invalidation du gène STAT-3 dans les macrophages et les neutrophiles entraîne chez les souris déficientes pour ce gène le développement d'une colite transmurale très proche de la MC aussi bien dans l'intestin grêle que dans le côlon (Takeda et al., 1999; Welte et al., 2003). Cependant aucune colite n'est observée chez les animaux déficients pour STAT-3 dans les lymphocytes T, suggérant que l'inflammation développée chez les souris KO pour l'IL-10 provient d'un dysfonctionnement des macrophages et non des lymphocytes T.

1.3 Modèles chimio-induits

Les modèles d'inflammation intestinale et de colite induites par des substances chimiques chez les rongeurs sains ou génétiquement susceptibles au développement d'une colite sont couramment utilisés pour faciliter l'induction des réponses inflammatoires associées à la pathologie ainsi que pour obtenir une meilleure reproductibilité. Ces différents modèles présentent une ou plusieurs signatures similaires à celles observées chez les patients atteints d'une MICI.

1.3.A Dextran Sulfate Sodium (DSS)

Le dextran sulfate sodium (DSS) est un polysaccharide connu pour induire chez le rongeur des colites lorsqu'il est administré par voie orale dans l'eau de boisson. L'inflammation est reproductible et peut être aiguë ou chronique selon la dose et la durée de traitement. Les altérations observées après un traitement au DSS 4% de 4 jours sont proches de celles observées au cours de la rectocolite hémorragique : perte de poids, sang dans les fèces, diarrhées, ulcération, infiltration de cellules immunitaires (Hs et al., 1993; Okayasu et al., 1990). Néanmoins, la sévérité de l'inflammation induite par le DSS est dose-dépendante et également dépendante de la durée de l'administration ainsi que de l'espèce de l'animal (Melgar et al., 2005). A plus faible dose, le DSS 1-2% induit une hypersensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale qui dure pendant plusieurs semaines même après résorption complète de la colite (Eijkelkamp et al., 2009).

1.3.B Acide Trinitro-benzene sulfonique (TNBS)

L'administration intra-rectale de TNBS, dissout dans l'éthanol à 50%, à des souris ou rats sains induit une colite expérimentale. L'éthanol est utilisé pour altérer l'intégrité de la paroi intestinale. Le TNBS est un haptène, capable de se lier aux protéines tissulaires et de stimuler la voie de l'immunité Th1. La dose de TNBS et d'éthanol est soumise à de nombreuses variations comme le montre la littérature (Antoniou et al., 2016). Plus précisément, une gamme de 50 à 150 mg/kg a été utilisée par divers chercheurs. Morris et al. qui a établi le modèle chez le rat a utilisé une dose de 100 mg/kg (Morris et al., 1989). Chez la souris, une dose unique de TNBS de 50 mg/kg de poids corporel a entraîné un très faible niveau inflammatoire (« colite histologique ») associé à un score inflammatoire de Wallace (Wallace et al., 1989) d'environ 2, tandis qu'une dose de 150 mg/kg de poids corporel a induit un taux de mortalité de 20 à 30%, associé à des niveaux de colite élevés à très élevés (score de wallace minimal de 5) (Antoniou et al., 2016). En outre, un œdème de la muqueuse, une distorsion des cryptes et la formation d'abcès se développent accompagnés d'une infiltration de leucocytes, d'érythrocytes, neutrophiles, macrophages et lymphocytes dans la muqueuse et la sous-muqueuse. Au bout de 14 jours, les lésions se résorbent. L'inflammation peut être chronique si des cycles d'instillations répétées sont mis en place (Lamb et al., 2006).

1.3.C *Toxoplasma gondii* et *Giardia muris*

Toxoplasma gondii induit une iléite granulomateuse chez des souris C57BL / 6 qui imite la MC iléale (Liesenfeld, 2002). Après une infection par voie orale, les souris C57BL / 6 présentent des zones discontinues d'inflammation intestinale transmurale, à travers l'iléon distal. L'examen histologique démontre des infiltrats de cellules mononucléaires et de cellules polymorphonucléaires dans la lamina

propria, la sous-muqueuse et les couches musculaires. La pathologie intestinale induite par *T. gondii* nécessite l'induction de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , TNF- α , et la NO synthase inducible (iNOS) ainsi que les effets régulateurs du TGF- β (Buzoni-Gatel et al., 2001). Le développement de l'inflammation dans ce modèle est également dépendant du microbiote intestinal. Comme pour les modèles murins expérimentaux de MICI cités ci-dessus, tels que les souris KO ou chimio-induits, la contribution du microbiote résidant est primordiale dans le développement de la pathologie intestinale induite par *Toxoplasma gondii* (Molloy et al., 2013; Rachinel et al., 2004). L'infection par *Giardia muris* est associée à une inflammation légère à modérée du petit intestin caractérisée par une infiltration de cellules intra-épithéliales, une morphologie de la villosité altérée, une diminution de l'activité des disaccharides et une dépendance aux lymphocytes T (Heimesaat et al., 2006; Scott et al., 2004).

1.3.D Indométacine

L'indométacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), supprime la synthèse des prostaglandines et nuit à la défense de la muqueuse dans l'intestin grêle. Les souris axéniques sont moins sensibles à l'indométacine suggérant l'implication du microbiote commensal dans la pathogenèse de l'entéropathie liées à l'administration de AINS (Robert and Asano, 1977; Uejima et al., 1996). De façon dose-dépendante, l'administration d'indométacine induit des lésions intestinales inflammatoires chez les souris impliquant le microbiote intestinal, la libération de cytokines telles que le TNF- α et la stimulation des TLR-4 (Terán-Ventura et al., 2014; Watanabe et al., 2008; Xiao et al., 2017). Récemment, Craven et collaborateurs ont décrit un modèle expérimental d'inflammation de l'iléon via l'administration orale d'indométacine (Craven et al., 2012). Dans cette étude, une administration par voie orale de 0,1 mg/jour/souris d'indométacine (faible dose) et à 1,0 mg/jour/souris d'indométacine (forte dose) ont été réalisées. Les altérations ainsi obtenues sont comparées à celles obtenues dans les modèles d'infection à *Toxoplasma gondii* et *Giardia muris*. Sur le plan histologique, l'iléite induite par l'indométacine se traduit par une inflammation granulomateuse, une atrophie des villosités, une hyperplasie des cryptes, un défaut de fonctionnement des cellules de Paneth et une dysbiose (Craven et al., 2012). Ainsi, l'ensemble de ces lésions sont comparables à celles décrites dans les précédents modèles utilisant *Toxoplasma gondii* et *Giardia muris*.

2. Les modèles de stress

Comme décrit précédemment, le rôle du stress dans la genèse ou l'aggravation des symptômes des troubles fonctionnels intestinaux est largement démontré. Même si les observations obtenues chez l'animal ne peuvent pas être directement transposées à l'homme, les modèles expérimentaux de

stress sont classiquement utilisés pour mimer la pathologie fonctionnelle du SII et contribuent à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le SII. Par exemple, l'hypersensibilité viscérale est observée chez l'animal suite à un stress psychologique. De plus, le caractère anxieux et/ou dépressif présent chez certains patients atteints de SII est également retrouvé chez les animaux soumis à un stress (Hattay et al., 2017).

2.1 Le rat Wistar-Kyoto

La souche Wistar-Kyoto (WKY) spontanément hypertendue a été élevée à partir de la souche Wistar en 1963 par Okamoto permet d'étudier les modulations de la sensibilité viscérale liées au stress et sont proposés comme modèles animaux lors des études précliniques sur le SII (Larauche et al., 2011; Okamoto and Aoki, 1963). En condition basale, des taux de corticostérone élevés sont naturellement présents chez ces animaux (Djordjevic et al., 2007). Ces animaux montrent une augmentation du nombre de contractions abdominales en réponse à une distension colorectale (Gunter et al., 2000). Les rats WKY sont hyper-réactifs au stress et montrent une dérégulation des axes hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HPA) et hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien (HPT) (Djordjevic et al., 2007). La réaction au stress est également plus élevée chez les rats WKY illustrée par une augmentation prolongée des taux de corticostérone après un stress aigu, comparée aux rats Wistar (Will et al., 2003).

2.2 Les stress aigus

2.2.A Le stress acoustique

Le modèle de stress acoustique est utilisé comme modèle de stress aigu pour étudier ses effets notamment sur la fonction de barrière intestinale. Dans ce modèle, la séance de stress acoustique dure 2 h et peut être répétée jusqu'à 4 jours. Les animaux sont placés dans des cylindres individuels et soumis à un stress acoustique appliqué grâce à un bain à ultrasons d'une fréquence de 46 kHz placé à 20 cm des animaux et réglé à un volume sonore de 82 dB (Demaude, 2006). Dans ces conditions *in vivo*, les animaux soumis à ce stress acoustique développent une augmentation de la perméabilité colique associée à une dégranulation importante des mastocytes ainsi qu'à une surproduction d'IFN γ (Demaude et al., 2009). De plus, une diminution du taux de différenciation des colonocytes ainsi que de l'expression des protéines de jonctions occludines et zonuline s'associent à l'altération de la barrière épithéliale dans ce modèle. Ces observations apparaissent 2 à 4 h après la session de stress et perdurent jusqu'à 72 h post-stress (Demaude, 2006; Demaude et al., 2009).

2.2.B Le stress de contention/immobilisation

Ces modèles sont utilisés pour induire des changements de comportement, ainsi que des désordres gastro-intestinaux. Il existe différentes méthodes de contraintes et d'immobilisations : l'animal peut être placé dans un cône en plexiglas rigide sans possibilité de se mouvoir ou peut avoir les membres antérieurs attachés (Abidin et al., 2004; Bizon et al., 2001). La durée du stress ainsi appliquée peut être variable selon les auteurs. En effet, certains expérimentateurs font le choix de soumettre les animaux à une session unique de 10 min (Jackson and Moghaddam, 2004), tandis que d'autres répètent des sessions de stress de 6 h/jour jusqu'à trois semaines (McLaughlin et al., 2007). Le manque de standardisation rend difficile la comparaison des différentes études utilisant ce type de modèle. Parmi ces différents protocoles, le modèle de contention de 2 h est le plus souvent utilisé dans le cadre d'une meilleure compréhension de la physiopathologie du SII. En effet, les animaux soumis à ce stress montrent une augmentation de la perméabilité intestinale ainsi qu'une accélération du temps de transit intestinal (Gue et al., 1987; Kanauchi, 2010; Mazzon et al., 2002) et une hypersensibilité viscérale (Bradesi et al., 2002; Bueno and Fioramonti, 2002).

2.3 Les stress chroniques

2.3.A Le stress de séparation maternelle

L'isolement social est connu pour entraîner de profondes modifications du comportement. Durant les premières semaines de vie, les interactions mère-enfant permettent le bon développement psychique et psychologique du nouveau-né (Levine, 2002). Le stress de séparation maternelle (SSM) consiste à séparer, pendant les premières semaines de vie, le nouveau-né de sa mère et du reste de la portée. La durée de la séparation ou encore le nombre de jours de séparation peuvent varier selon les auteurs. Ce modèle de stress est basé sur l'hypothèse que les événements indésirables en début de vie peuvent laisser une empreinte et prédisposer l'individu au développement d'une maladie à l'âge adulte. Par exemple, une forte prévalence d'abus sexuels subis lors de la petite enfance est décrite chez les patients souffrant du SII à l'âge adulte (Delvaux et al., 1997). Chez le rat, le SSM induit une hypersensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale à l'âge adulte (Barreau et al., 2004). Des perturbations de la barrière intestinale comme la translocation bactérienne, des lésions de la muqueuse, et une hyperperméabilité intestinale sont décrites chez des animaux à l'âge adulte préalablement soumis au SSM pendant la période néonatale (Li et al., 2014; Riba et al., 2017; Zani et al., 2016).

2.3.B Le stress d'évitement passif de l'eau ou *Water Avoidance Stress* (WAS)

Le stress d'évitement passif de l'eau (« *Water Avoidance Stress* », WAS) est un stress non invasif qui consiste à placer le rongeur sur une petite plateforme transparente, elle-même située dans une bassine transparente contenant une réserve d'eau froide (Figure 22). Les animaux sont placés sur la plateforme durant une période de 1h/jour pendant 10 jours. Les animaux contrôles sont placés de façon similaire 1h/jour pendant 10 jours dans une bassine vide (Bonaz and Taché, 1994).

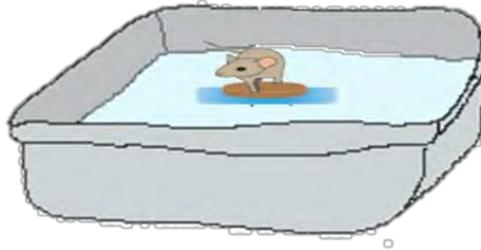


Figure 22 : Dispositif du *Water Avoidance Stress* (WAS).

Le stress chronique WAS provoque un état d'anxiété prolongé chez le rongeur reproduisant les effets d'un stress psychologique chronique à l'âge adulte. Il induit une hyperalgésie viscérale qui peut perdurer jusqu'à 1 mois après l'induction du stress chez le rat. De plus, le nombre de fèces expulsés est augmenté ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IFN- γ (Bradesi et al., 2005). Dans ce modèle, la corticostéronémie est augmentée (Söderholm et al., 2002). De même, l'administration chronique durant 10 jours consécutifs de corticostérone chez le rat produit des altérations similaires à celles observées lors d'un WAS (Hong et al., 2011). Dès le 3^{ème} jour de stress, la perméabilité intestinale perméabilité trans- et para-cellulaire est également augmentée (Santos et al., 1999, 2001). Des altérations du microbiote intestinal ont également été observées. En effet, NLRP6 (*Nod Like Receptor Family Pyrin domain containing 6*) est nécessaire pour le maintien d'une homéostasie du microbiote intestinal. Or, des souris déficientes en NLRP6 présentent un microbiote altéré qui prédispose les animaux à l'inflammation intestinale (Elinav et al., 2011). Le WAS induit une inhibition de NLRP6 due à la libération de CRF, provoquant un déséquilibre du microbiote intestinal (Sun et al., 2013). Cet effet peut être reversé par un agoniste au récepteur PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*), qui rétablit l'expression de NLRP6 (Anand et al., 2012; Sun et al., 2013). Par ailleurs, l'administration de probiotiques améliore la dysbiose, la perméabilité intestinale et la sensibilité viscérale liée au WAS (Nébot-Vivinus, 2014).

En résumé, le WAS altère la barrière intestinale, induisant une augmentation de la perméabilité intestinale, favorisant le passage de motifs bactériens puis l'activation des cellules immunitaires. Cette cascade d'événement se traduit par un état micro-inflammatoire associé à une dysbiose, et *in fine* une hypersensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale (Hattay et al., 2017).

CHAPITRE III

Stratégies alternatives visant à moduler le microbiote intestinal pour une amélioration de la qualité de vie des patients en rémission de la MC et du SII.

Aujourd'hui il est possible de distinguer les traitements utilisés lors des poussées inflammatoires de la maladie et ceux utilisés en traitement de fond pour maintenir voire prolonger les périodes de rémission. Comme décrit précédemment, il est maintenant admis que le microbiote intestinal joue un rôle clé dans le maintien de l'état physiologique de l'hôte, alors que son altération peut contribuer de manière significative à la genèse de différents troubles fonctionnels intestinaux et à un état inflammatoire de la muqueuse intestinale (Quigley, 2012; Sartor, 2008, 2015; Tap et al., 2017). Au cours des dernières années, l'intérêt de se concentrer sur une modulation sélective du microbiote dans l'objectif d'obtenir un effet bénéfique dans les troubles intestinaux a considérablement augmenté. Ainsi, différentes approches ont été utilisées, principalement via l'usage d'antibiotiques, de probiotiques, de prébiotiques, de symbiotiques, ainsi que de produits fermentés contenant notamment des peptides bioactifs (Gallo et al., 2016).

1. Les antibiotiques

Le dérèglement du microbiote intestinal chez les patients atteints du SII ou de la MC peut justifier l'utilisation d'antibiotiques (Khan et al., 2011). Selon leur spectre d'activité, cet usage peut diminuer sélectivement l'invasion tissulaire et éliminer les espèces bactériennes agressives ou diminuer globalement les concentrations bactériennes luminales en contact avec la muqueuse (Sartor, 2004). Par exemple, les données scientifiques convergent toutes vers une amélioration globale des symptômes chez des patients souffrants du SII après la prise de Rifamixine (Menees et al., 2012; Pimentel et al., 2011). De même, la Néomycine semble être efficace chez les patients SII-C (Pimentel et al., 2006). Néanmoins, l'utilisation des antibiotiques à visée thérapeutique sur le long terme dans le SII est sujette à controverse car susceptible de permettre le développement de bactéries résistantes.

2. Les probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels. Ce sont généralement des bactéries sélectionnées qui colonisent naturellement

l'intestin. L'utilisation de souches probiotiques suscite aujourd'hui un grand intérêt car ils modulent le profil microbien intestinal existant (Hill et al., 2014). De nombreuses études montrent que certaines souches probiotiques peuvent affecter le comportement émotionnel (Rao et al., 2009; Tillisch et al., 2013), la réponse au stress (Ait-belgnaoui et al., 2009; Ait-Belgnaoui et al., 2014) et les troubles fonctionnels intestinaux (Kato-Kataoka et al., 2016; Theodorou et al., 2014). L'administration de *Bifidobacterium infantis* sur des rats soumis à un stress chronique de nage forcée pendant 14 jours permet la réduction des niveaux de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL-6 (Desbonnet et al., 2008). De plus, les taux plasmatiques de tryptophane sont également significativement augmentés chez les rats traités avec *B. infantis* par rapport aux témoins. Bien que *B. infantis* ait pu jouer un rôle d'antidépresseur en augmentant les taux de tryptophane, un précurseur sérotoninergique et en réduisant ces marqueurs pro-inflammatoires, aucune amélioration de la performance liée à la nage forcée n'a été observée. Ces niveaux élevés de tryptophane peuvent potentiellement réduire la surcharge dépressive et les effets aberrants du système nerveux entérique dans le SII (Desbonnet et al., 2008). L'essai clinique réalisé par O'Mahony pendant 8 semaines sur 77 sujets avait pour but de juger l'efficacité de *B. infantis* et *L. salivarius* dans le traitement des symptômes du SII (O'Mahony et al., 2005). Les sujets ingéraient soit 10^{10} UFC de bactéries/jour soit un placebo. Dans cette étude, *B. infantis* a permis une réduction significative de l'ensemble des symptômes liés au SII (ballonnements, douleurs abdominales, difficulté pour aller à la selle). De plus, l'évaluation du rapport IL-10/IL-12 avant traitement par la souche probiotique révélait un taux anormal en faveur d'un état pro-inflammatoire. Ce taux était normalisé chez les patients ayant ingéré *B. infantis*, suggérant un effet immuno-modulateur bénéfique de cette souche chez les patients atteints de troubles fonctionnels intestinaux (O'Mahony et al., 2005). D'autres essais thérapeutiques réalisés chez des patients souffrant du SII mettent en évidence les effets bénéfiques de souches probiotiques (Dapoigny et al., 2012; Ducrotté et al., 2012). Par ailleurs, l'administration chronique (4 semaines) chez des patients SII à prédominance diarrhéique, de lait fermenté avec présence de souches probiotiques (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium longum*), améliore la perméabilité intestinale au test du lactulose/mannitol et excrétion du sucralose comparé à ceux recevant du lait non fermenté (Zeng et al., 2008). Des approches expérimentales menées sur Lactibiane Tolerance® (LT) composé de différentes souches bactériennes caractérisées par leurs propriétés anti-inflammatoires (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium lactis*) ont permis d'évaluer la fonction de barrière intestinale à la fois *in vitro* (cellules T84 en conditions basales et inflammatoires), et *in vivo* sur le modèle WAS. Dans cette étude, les auteurs montrent que LT aide à prévenir l'hypersensibilité viscérale et à rétablir les perturbations de la barrière épithéliale liées au

stress (Nébot-Vivinus, 2014). Ainsi, les probiotiques sont largement utilisés et évalués par leurs apports potentiellement bénéfiques dans les pathologies intestinales (Darbaky et al., 2017). Toutefois, il faut noter que de nombreuses études cliniques se sont révélées négatives en raison d'un d'importants effet placebo rencontrés dans la population des patients SII (Pitz et al., 2005; Spiller, 1999). Selon une méta-analyse, cet effet placebo est en moyenne de 40% (Patel et al., 2005). L'effet placebo serait par ailleurs différent suivant les critères évalués : il est en effet plus élevé pour le critère « amélioration globale des symptômes » que pour le critère « réduction de la douleur abdominale » (Irvine et al., 2006).

3 Les prébiotiques

Les prébiotiques sont actuellement définis comme des « composés alimentaires fermentés qui favorisent spécifiquement la croissance d'un ou plusieurs genres bactériens dans le tractus gastro-intestinal et offrent ainsi des avantages pour la santé de l'hôte » (de Jesus Raposo et al., 2016). Ces avantages pour la santé sont divers et incluent la modulation immunitaire grâce à une augmentation des immunoglobulines intestinales spécifiques, et des interleukines immuno-régulatrices avec une réduction des interleukines pro-inflammatoires (de Jesus Raposo et al., 2016). Les avantages pour la santé d'une consommation de prébiotiques comprennent également la production d'acides gras à chaîne courte, comme l'acétate, le propionate, le butyrate et le lactate. La production d'acétate contribue à la production de butyrate, substrat primaire des colonocytes, contribuant ainsi à l'intégrité de l'épithélium digestif (Roberfroid et al., 2010). Les prébiotiques sont généralement des glucides alimentaires. Les deux glucides majeurs qui répondent aux critères des prébiotiques sont les fructo-oligosaccharides (FOS) et les galacto-oligosaccharides (GOS), mais aussi le lactulose et l'inuline. La présence naturelle des oligosaccharides dans le lait maternel humain, de structure similaire aux β -GOS conduit à une augmentation du nombre de *Bifidobactéries* chez les nourrissons allaités (Newburg et al., 2016). Le nombre de *Bifidobactéries* est négativement associées à la douleur viscérale chez les patients souffrant de SII par rapport aux sujets sains (Rajilić-Stojanović et al., 2011; Shukla et al., 2015). Ainsi, l'obtention d'effet bifidogène grâce à un apport en prébiotiques présente une cible thérapeutique d'appoint d'intérêt. Toutefois, à ce jour, peu d'essais cliniques randomisés sur l'effet des prébiotiques sur le SII sont en cours et les données actuelles sont discordantes. Deux études chez l'adulte atteint de SII à des doses de 6 g/jour d'oligo-fructose (Hunter et al., 1999) et de 20 g/jour d'inuline (Olesen and Gudmand-Høyer, 2000) ne montre pas d'amélioration des symptômes chez ces patients. En revanche, un autre essai montre une amélioration des scores cliniques grâce à un traitement journalier de 5 g de FOS dans la population SII (Paineau et al., 2008; Whelan, 2013). Un essai réalisé avec du β -GOS, montre une stimulation dose-dépendante à 3,5 et 7,0 g/jour de *Bifidobactéries* (Silk et al., 2009). Cet effet bifidogène s'accompagne d'une réduction des symptômes importante par

rapport au placebo, avec une efficacité plus importante pour la dose la plus faible (Silk et al., 2009). En résumé, la nature du prébiotique et la dose administrée peuvent avoir des effets opposés : bénéfique ou délétère chez les patients SII (Wilson and Whelan, 2017). Ainsi, dans la MC et le SII, certains prébiotiques administrés à fortes doses aggravent sensiblement les symptômes cliniques (Whelan, 2013). En effet, les fibres qui contiennent le plus de prébiotiques sont souvent celles qui contiennent le plus de FODMAPs (*Fermentable Oligo-Di et Mono-saccharides And Polyols*), connus pour entraîner des ballonnements et des douleurs abdominales. L'efficacité d'un régime faible en FODMAPs dans le traitement des symptômes gastro-intestinaux fonctionnels du SII (Halmos et al., 2014; Staudacher et al., 2014) et des MICI a été récemment démontré (Prince et al., 2016). Dans ces régimes, les teneurs en inuline, oligo-fructose et GOS sont tous restreints. Dans ce contexte, d'autres études sont nécessaires pour comprendre l'effet bénéfique et/ou délétère des prébiotiques dans les troubles gastro-intestinaux, en particulier en tenant compte des teneurs en FODMAPs présents (Halmos et al., 2016).

4. Les symbiotiques

Les symbiotiques sont « un mélange de probiotiques et de prébiotiques qui affecte de manière bénéfique l'hôte en améliorant la survie et l'implantation de suppléments alimentaires microbiens vivants dans le tractus gastro-intestinal, en stimulant sélectivement la croissance et/ou en activant le métabolisme d'un nombre limité de bactéries favorisant la santé, et permet ainsi d'améliorer le bien-être de l'hôte » (Ceapa et al., 2013; Wang et al., 2012). Généralement, les combinaisons de symbiotiques englobent *Bifidobacteria* ou *Lactobacilli* associés à des FOS ou de l'inuline. Le symbiotique SCM-III (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* et *Bifidobacteria* dans un milieu enrichi en ions et vitamines) a un effet significativement bénéfique sur la translocation bactérienne intestinale et les paramètres métaboliques inflammatoires et microbiens locaux et systémiques (Marotta et al., 2003; Tsuchiya et al., 2004). L'administration du symbiotique SCM-III à des patients souffrant du SII a permis une amélioration générale significative de la qualité de vie dès la 6^{ème} semaine de traitement, bien qu'aucun des patients n'aient été complètement soulagés (Tsuchiya et al., 2004). Une autre étude réalisée sur 636 patients atteints de SII-C montre que l'administration pendant 36 jours d'un symbiotique incluant la souche probiotique *Bifidobacterium longum* W11 et le prébiotique FOS « Actilight », réduit la douleur abdominale, les ballonnements et améliore le transit (Colecchia et al., 2006).

5. Produits fermentés sources de peptides bioactifs

Outre leur rôle nutritionnel de base, les protéines alimentaires sont sources de peptides bioactifs cryptés dans leur séquence et qui peuvent moduler différentes fonctions du tractus gastro-intestinal et contribuer au maintien de la santé du consommateur (Kitts and Weiler, 2003). Une technique nommée «peptidomique» est aujourd’hui mis en avant permet de définir le peptidome, soit l’ensemble des peptides présent dans les produits alimentaires ou les matières premières, ou encore obtenu après un process (Gagnaire et al., 2009; Minkiewicz et al., 2008; Soloviev and Finch, 2005).

Les peptides bioactifs peuvent présenter, entre autres, des propriétés antioxydantes, hypotensives, immunomodulatrices, ou opioïdes et par conséquent exercer des effets bénéfiques en agissant sur le système nerveux, le tractus digestif, le système cardiovasculaire et le système immunitaire (Haque et al., 2008; Kamau et al., 2010; Nagpal et al., 2011). Actuellement, les protéines du lait sont considérées comme la principale source de peptides bioactifs (Kitts and Weiler, 2003). La présence de ces peptides a déjà été signalée dans des produits laitiers fermentés tels que le yaourt, le lait caillé ou le kéfir (Kitts and Weiler, 2003). Les caséines et les protéines solubles sont des sources de peptides bioactifs contenant 2 à 50 résidus. Les peptides biologiquement actifs dérivés du lait se trouvent initialement sous forme inactive mais peuvent être libérés sous l’action (Figure 23): (i) de l’hydrolyse enzymatique comme celle de la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine ; (ii) de la fermentation du lait et (iii) de la protéolyse par des enzymes dérivées de microorganismes (Korhonen and Pihlanto, 2003).

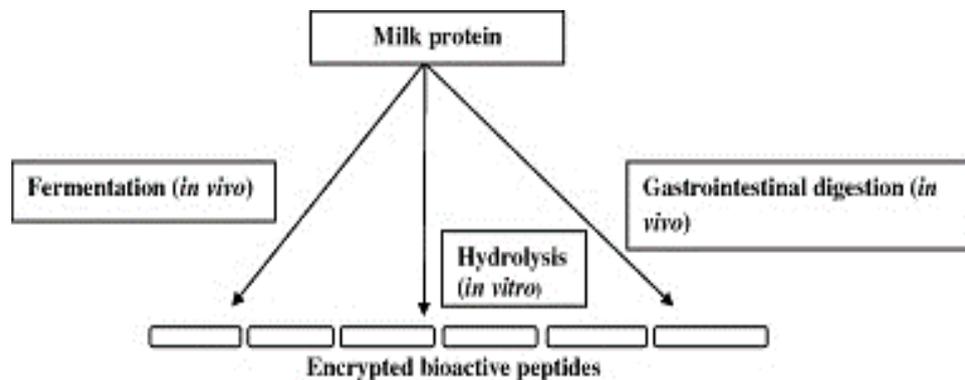


Figure 23 : Mécanismes pour la libération de peptides bioactifs à partir de protéines de lait (Korhonen and Pihlanto, 2003).

Ainsi, les peptides bioactifs peuvent être libérés *in vivo* pendant la digestion par l’action d’enzymes digestives telles que la pepsine, la trypsine ou la chymotrypsine (Korhonen and Pihlanto, 2003). Plusieurs peptides bioactifs (antibactériens, immunomodulateurs, hypotenseurs et opioïdes) sont libérés par la digestion des caséines et/ou des protéines solubles (Gobbetti et al., 2002, 2004;

Meisel et al., 2003; Yamamoto et al., 2003). Ils atteignent ainsi la lumière du tube digestif où certains peuvent être partiellement résistants à une nouvelle digestion enzymatique. Leurs effets physiologiques sont activés seulement après protéolyse pendant la digestion. Certains partagent des motifs structurels similaires aux peptides endogènes (Dave et al., 2014)

Dans les produits fermentés, la principale fonction des bactéries lactiques (LAB) est d'acidifier rapidement la matrice alimentaire en fermentant les glucides en acide lactique, favorisant ainsi la durée de conservation et la sécurité sanitaire du produit alimentaire. Suivant leur activité fermentaire, les LAB contribuent au développement de saveur par leur capacité d'hydrolyser des hydrates de carbones, des protéines, des peptides et des lipides, précurseurs d'arômes, et de les convertir par la suite en une variété de composés aromatiques (Thierry et al., 2015). Certaines bactéries lactiques (LAB) comme *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus helveticus* libèrent des peptides bioactifs après le processus de fermentation grâce à un arsenal de peptidases intracellulaires distinctes comprenant des endopeptidases, des amino-peptidases, des tri-peptidases et des di-peptidases (Christensen et al., 1999; Hafeez et al., 2014). Divers peptides bioactifs ainsi produits sont de véritables produits antimicrobiens, immunomodulateurs et antioxydants (Gobbetti et al., 2004; Korhonen and Pihlanto, 2003).

Enfin, la méthode la plus courante pour produire des peptides bioactifs à partir du lait est l'hydrolyse enzymatique de protéines entières. Dans ce cadre, des enzymes digestives et des combinaisons de différentes protéinases comprenant l'alcalase, la chymotrypsine, la pepsine et la thermolysine ainsi que des enzymes provenant de sources bactériennes et fongiques sont largement utilisées pour générer des peptides bioactifs (Mohanty et al., 2016).

Plusieurs boissons lactées fermentées contenant des peptides bioactifs ajoutés et/ou générés pendant la fermentation sont actuellement commercialisées comme le lait aux effets hypotenseurs tels que "Calpis" ou "Ameal S" (Calpis Co, Japon) et Evolus (Valio Oy, Finlande) contiennent des peptides provenant de la β -caséine et de la κ -caséine (FitzGerald et al., 2004). Par ailleurs, des variants de β -casofencine, peptide bioactif issu de l'hydrolyse des β -caséines d'origine bovine, modulent les fonctions de barrière physique de l'intestin *in vivo* et *ex vivo* chez le rat en augmentant la population des cellules à mucus et l'expression de MUC2 et réduit la perméabilité paracellulaire de l'intestin au niveau du jéjunum (Bruno et al., 2017).

En conclusion, les peptides bioactifs issus de la fermentation par les bactéries lactiques endogènes ou de l'alimentation (ferments) modulent les fonctions digestives de l'hôte. La compréhension de leur mécanisme d'action ouvre des perspectives intéressantes en santé humaine (Marco et al., 2017)

CHAPITRE IV : Le lait d'ânesse, une matrice alimentaire riche en peptides antimicrobiens

L'âne, *Equus asinus*, est un membre de la famille des équidés. La domestication de l'âne a commencé vers 6000 av. J.-C. dans la Libye actuelle. Au fil des siècles, les ânes se sont répandus en Asie, en Inde, en Amérique du Sud et en Europe. Les ânes ont une durée de vie de 30 à 50 ans et ont historiquement été utilisés pour faire de l'équitation, pour le transport à courte distance et en tant qu'animal de trait. D'autres utilisations comprennent la production de viande (très limitée) dans certains pays et la production laitière (utilisée en nutrition humaine et dans l'industrie cosmétique).

1. Histoire

Le lait d'ânesse est connu, de façon plus ou moins empirique, depuis l'Antiquité pour ses vertus bienfaisantes. Hippocrate (460 – 370 av. J.-C.) le recommandait pour lutter contre les douleurs articulaires, la cicatrisation des plaies ou les occlusions intestinales. De même, dans son ouvrage encyclopédique « Histoire naturelle, livre 28 » dans le chapitre traitant des remèdes tirés des animaux, Pline l'Ancien (23 - 79 apr. J.-C.) le proposait pour combattre la fièvre, la fatigue, les rides du visage, ou les ulcérations (Pline l'Ancien). Buffon (1707-1788) mentionne, dans son « Histoire naturelle », les



bienfaits généraux du lait d'ânesse : « Le lait d'ânesse est un remède éprouvé et spécifique pour
Figure 24 : L'allaitement des nouveau-nés au pis de l'ânesse, à l'intérieur de l'étable de la nourricerie Parrot, F. Haenen, 1883.

certains maux, et l'usage de ce remède s'est conservé depuis les Grecs jusqu'à nous » (Buffon, 1788). Au XIX^{ème} siècle, il était également courant de nourrir les nouveau-nés non-allaités directement au pis de l'ânesse (Figure 244). Ce fut le cas par exemple dans les années 1880 dans une nourricerie de l'Hospice des Enfants-Assistés à Paris (Lauziers, 2011). A Toulouse, il existait un établissement en ville dédié à des ânesses laitières de race gasconne en lactation, et un autre à la campagne, pour l'élevage des ânonns et des femelles futures productrices (Figure 255). Une tournée journalière était alors organisée en ville (Baillet, 1888).



Figure 25 : Le marchand de lait d'ânesse.

2. Le lait d'ânesse aujourd'hui : contexte mondial et productions

Le lait d'ânesse est considéré comme un produit rare et précieux. La réserve de lait, principalement alvéolaire, ne permet pas un grand stockage et nécessite une libération d'ocytocine pour assurer la vidange de la mamelle (Salimei and Fantuz, 2012). Ainsi, la présence de l'ânon à proximité de sa mère est nécessaire. La durée de la lactation chez l'ânesse s'échelonne entre 6 et 12 mois. Une ânesse en lactation fournit entre 1,4 et 2,0 litres de lait par jour. Les saisons, l'alimentation de l'ânesse, ainsi que le nombre de traites par jour modifient la quantité et la qualité nutritionnelle du lait d'ânesse (Alabiso et al., 2009; Polidori et al., 2010).

2.1 La production mondiale industrielle

La Chine est un des pays qui, en 2014, comptait le plus d'ânesses dans le monde avec 6 033 500 animaux derrière l'Ethiopie (7 428 037 animaux) et devant le Pakistan (4 942 000 animaux) (FAO 2017). Toutefois, peu de données sur la production de lait d'ânesse en Ethiopie ou au Pakistan sont

disponibles. Dans le Nord-est de la Chine, dans les provinces de Xinjiang et Shanxi, la production annuelle de lait d'ânesse atteint les 40 000 tonnes de lait, plaçant la Chine au 1^{er} rang mondial (Guo et al., 2007; Yang et al., 2006). L'entreprise chinoise agroalimentaire YuKunLun créée en 2007 contribue fortement à la production nationale de lait d'ânesse. L'entreprise dispose d'une chaîne de production permettant de fabriquer 20 tonnes de lait d'ânesse en poudre lyophilisée et 500 tonnes de lait frais par an, destinées à la consommation humaine notamment en tant que substitut au lait maternel (Zhang Ming, Yukunlun, 2015). En Amérique du Sud, le Chili se démarque avec la société « Donkey milk Farm », qui exporte ses produits cosmétiques à base de lait d'ânesse aux Etats-Unis, au Japon, en Allemagne au Canada et en Argentine. En Europe, l'Italie avec ses 24 900 animaux assure la plus forte production de lait d'ânesse, grâce à l'entreprise « Eurolactis » créée en 2007 qui produit 52000 litres de lait d'ânesse par an, en s'appuyant sur un millier d'ânesses. Eurolactis a fait le choix de commercialiser ce lait sous plusieurs formes : cosmétique et alimentaire. Eurolactis est partenaire d'un important programme de recherche, financé par la Communauté Européenne, destiné à assurer l'alimentation et la survie des grands prématurés. Une étude clinique portée actuellement sur 168 prématurés et réalisée au Département de néonatalogie Santa Anna de l'Hôpital Regina Margherita de Turin est en cours (Eurolactis, 2017).

2.2 La production de lait d'ânesse française

D'après l'INAM, le nombre estimé d'ânes en France est de 82 000 individus avec 7 races d'ânes répertoriées (INAM, 2014). Aujourd'hui, on compte environ 60 producteurs de lait d'ânesse (Figure 266). Concernant la valorisation du lait d'ânesse en France, selon l'observatoire économique et social (INAM, 2014), les produits finis commercialisés par les éleveurs d'ânesses laitières sont de trois types : cosmétiques, lait frais et lait lyophilisé. Pour la fabrication de cosmétiques ou de gélules, certains éleveurs transforment eux-mêmes le lait tandis que d'autres font appel à un laboratoire ou à un artisan indépendant. Les produits sont distribués par divers moyens : vente directe à la ferme, internet, magasin de producteurs, marchés ou intermédiaires.

Autrefois très utilisé, le lait d'ânesse a été oublié un temps pour revenir aujourd'hui sur le devant de la scène avec de nombreuses applications possibles. La recherche scientifique s'intéresse de plus en plus à cette matrice alimentaire, qui par sa composition biochimique et microbiologique, représente un intérêt nutritionnel et santé grandissant pour l'Homme.

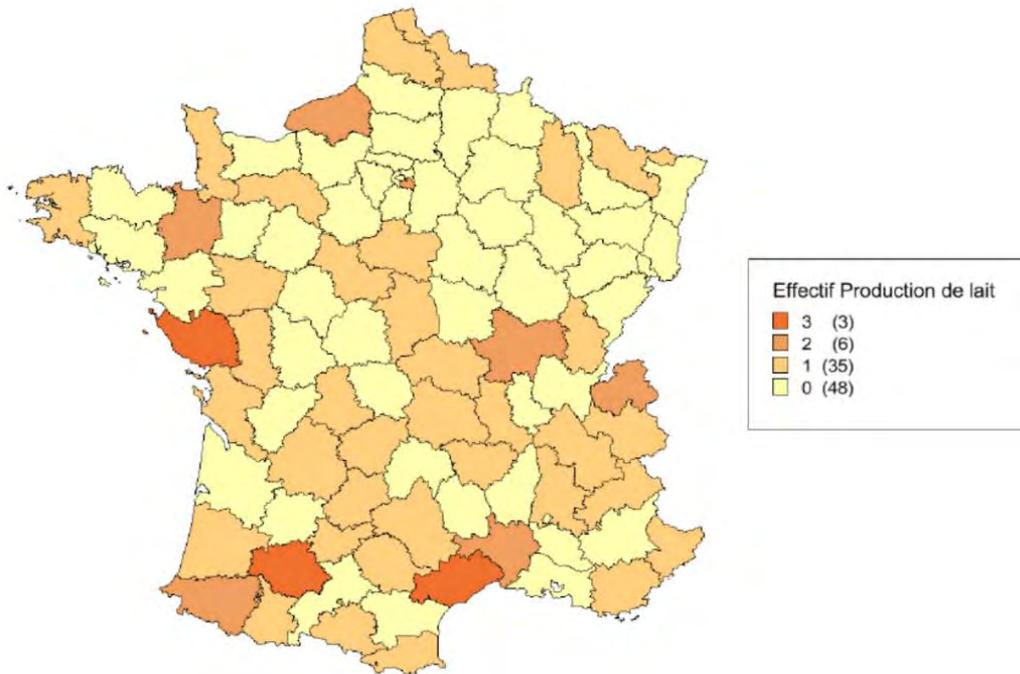


Figure 26 : Producteurs de lait d'ânesse en France en 2014. (Observatoire économique et social de l'INAM, 2014).

3. Caractéristiques biochimiques du lait d'ânesse

3.1 Composition générale du lait d'ânesse

Comparé au lait de vache, le pH du lait d'ânesse, tout comme le lait maternel humain, est neutre ou légèrement alcalin (7,0 – 7,2) (Tableau 2).

La teneur en lactose du lait d'ânesse varie de 6 à 7 g / 100 g et est supérieure à celle du lait de vache (4,4 - 4,9 g / 100 g). Cette teneur élevée en lactose facilite l'absorption intestinale du calcium et du phosphore et favorise le transfert des minéraux dans la structure osseuse, ce qui contribue à prévenir l'ostéoporose (Heaney, 2000). Le lactose est également responsable de la palatabilité du lait d'ânesse. Cependant, cette forte teneur en lactose peut être une contrainte pour les personnes intolérantes au lactose (Salimei and Fantuz, 2012; Salimei et al., 2004a).

Le taux de matières grasses contenu dans le lait d'ânesse est très faible et varie entre 0,29 et 1,82 g pour 100 g de lait. Les acides gras saturés (AGS) sont les acides gras les plus représentés dans la fraction lipidique. La teneur en acides gras polyinsaturés (AGPI) $\omega 3$ est élevée (7,4 - 13,7 g / 100 g d'AG), mais s'équilibre avec la quantité d'AG polyinsaturés $\omega 6$ (8,6 - 12,3 g / 100 g d'AG), conduisant à un ratio $\omega 3 / \omega 6$ proche de 1. Les acides linoléique (C18 :3 $\omega 3$) et linoléique (C18 :2 $\omega 6$) sont les AGPI les plus représentés. De plus, la présence de traces d'AGPI dits mineurs, comme l'acide

eicosadiénoïque et l'acide arachidonique, mais essentiels dans le développement néonatal, ont été retrouvés dans le lait d'ânesse dans différentes études (Chiofalo B., 2001; Salimei et al., 2004a). Les variations en teneur et en type des AGPI dépendent de la race de l'ânesse et de la nature de son alimentation (Alabiso et al., 2009; Chiofalo et al., 2011).

Tableau 2 : Composition biochimique du lait d'ânesse. Composé d'après Gaucheron et al, 2011, Salimei et al. 2012, Guo et al, 2007 et Aspri et al., 2017.

	Lait d'ânesse	Lait humain	Lait de vache
pH	7,0 - 7,2	7,0 - 7,5	6,6 - 6,8
Energie (kj/kg)	1719	2680	2883
Lactose (g / 100 g)	5,8 - 7,0	6,3 - 7,0	4,4 - 4,9
Lipides (g / 100 g)	0,3 - 1,8	3,5 - 4,0	3,5 - 3,9
Protéines (g / 100 g)	1,3 - 1,8	0,9 - 1,7	3,1 - 3,8
Caséines (g / 100 g)	0,6 - 1,0	0,3 - 0,4	2,4 - 2,8
Protéines solubles (g / 100 g)	0,49 – 0,80	0,68 – 0,83	0,55 – 0,70

Le lait d'ânesse contient entre 1,3-1,8 g de protéines pour 100 g de lait. D'une façon générale, le stade de lactation, la santé et l'alimentation de l'animal influent sur la teneur en matières azotées du lait (Polidori et al., 2010). Le lait d'ânesse est un lait pauvre en matières azotées, tout comme le lait de jument et de femme, où la matière azotée ne représente que 20% de la matière sèche contre 80% dans le lait de vache (Salimei and Fantuz, 2012). Les caséines représentent 40 à 50% de la matière azotée du lait d'ânesse, valeur plus faible que celle retrouvée dans le lait de vache (80%) mais similaire au lait maternel humain (Guo et al., 2007; Polidori and Vincenzetti, 2012). L'ensemble de ces données suggèrent que le lait d'ânesse possède une meilleure digestibilité pour l'homme que le lait de vache. Les connaissances disponibles sur les caséines du lait d'ânesse sont limitées, contrairement aux espèces laitières conventionnelles. Une combinaison de méthodes d'électrophorèse, de chromatographie et de protéomique a permis d'identifier quatre types de caséines (α 1, α 2, β et k-caséine). La distribution des caséines dans le lait d'ânesse montre que la caséine β était la forme prédominante, suivie de l' α 1 puis de l' α 2 qui apparaissent comme des composants mineurs (Chianese et al., 2010; Polidori and Vincenzetti, 2012; 2016). Les protéines solubles dans le lait d'ânesse représentent 40 à 50% de la matière azotée, en comparaison au lait maternel humain ou au lait de vache où elles représentent respectivement 18% et 66% de la matière azotée. Ainsi, le rapport protéines solubles/caséines du lait d'ânesse est proche de 1 alors qu'il est de 0,2 pour le lait de vache

et de 2 pour le lait de femme. Les protéines solubles sont principalement représentées par l' α -lactalbumine, la β -lactoglobuline et le lysozyme. Des composants mineurs comme la sérum albumine, la lactoferrine et les immunoglobulines ont également été décrits (Carminati and Tidona, 2017). Le rôle de ces différentes protéines sera détaillé plus bas.

Le lait d'ânesse est riche en vitamines hydrosolubles et liposolubles (Tafaro et al., 2007). La teneur totale en vitamines du lait varie selon le régime alimentaire de l'ânesse. En effet, les teneurs en vitamines hydrosolubles sont plus impactées que les vitamines liposolubles par le régime alimentaire de l'ânesse en lactation (Claeys et al., 2014). Les taux élevés en vitamines présentes dans le lait d'ânesse en fait un excellent aliment avec un effet bénéfique sur la nutrition humaine et la santé (Cunsolo et al., 2011). Les niveaux de vitamines de différents laits sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Concentration en vitamines du lait d'ânesse, lait humain et lait de vache. Composée à partir de (Aspri et al., 2017; Salimei and Fantuz, 2012; Uniacke-Lowe et al., 2010)

Vitamines (mg/L)	Lait d'ânesse	Lait humain	Lait de vache
Vitamine A	0,017	0,3 - 0,7	0,32 – 0,50
Vitamine B1	0,41	0,003 – 0.015	0,37
Vitamine B2	0,64	0,4 – 0,6	1,8
Vitamine B3	0,74	1,7	0,9
Vitamine B12	1,10	0,5	0,004
Vitamine C	5,7	5,0 – 10,0	1,5
Vitamine E	0,051	3,0 – 8,0	0,98 – 1,28

Plus précisément, la vitamine B12 (cobalamine), responsable du maintien de cellules nerveuses saines, est présente en concentration beaucoup plus élevée que dans les laits bovins et humains. De plus, d'autres vitamines du groupe B, telles que la thiamine (vitamine B1) et la riboflavine (vitamine B2), sont en concentrations plus élevées que dans le lait maternel humain. Le lait d'ânesse présente une quantité inférieure en vitamine A et E par rapport au lait bovin et humain. La teneur totale en vitamine C contenue dans le lait d'ânesse (5,7 mg/L) correspond aux apports quotidiens recommandés en vitamine C pour des enfants âgés de 6 à 12 mois.

Dans l'ensemble, la composition en minéraux et en oligo-éléments du lait d'ânesse est très proche du lait de la femme. Toutefois, le lait d'ânesse présente des niveaux plus élevés en calcium et en phosphore, avec cependant un rapport Ca/P similaire à celui du lait maternel humain (Tableau 4).

Concernant les oligo-éléments essentiels, le lait d'ânesse contient des concentrations similaires en Zn, Co et I, avec le lait humain, alors que les concentrations en Fe, Cu et Se sont plus faibles. Au cours du premier mois de lactation, le lait est la seule source nutritionnelle pour l'ânon, et contient les plus hauts niveaux d'éléments minéraux, favorisant une croissance rapide de l'ânon. Au cours de la lactation, une diminution significative de la composition en minéraux dans le lait en accord avec une réduction de la teneur en caséine est observée. En effet, ces minéraux sont principalement associés aux micelles des caséines (Aspri et al., 2017; Fantuz et al., 2012)

Tableau 4 : Concentration en minéraux du lait d'ânesse, lait humain et lait de vache. Composé à partir de (Aspri et al., 2017; Fantuz et al., 2012; Salimei and Fantuz, 2012)

Minéraux (mg/L)	Lait d'ânesse	Lait humain	Lait de vache
Ca	330 – 1140	278	122
P	320 – 650	140	119
K	240 – 747	530	152
Na	100 – 268	180	58
Mg	40 – 83	35	12
Fe	0,43 – 2,66	0,72	0,08
Zn	1,23 – 3,19	1 – 3	0,53
Cu	0,08 – 0,30	0,2 – 0,4	0,06
Se	0,00446	0,1 – 0,2	0,01
Co	0,00049	0,0001 – 0,0002	0,0005
I	0,0749	0,062	0,1 – 0,9

3.2 Focus sur les protéines solubles

- L'α-lactalbumine

Deux variants d'α-lactalbumines ont été isolés à partir du lait d'ânesse et désignés α-LA A et B. Ces deux α-LA présentent la même séquence en acides aminés (123 aa) et la même masse moléculaire de 14,22 kDa mais ont des points isoélectriques différents (5,5 pour α-LA A et 5,2 pour α-LA B). Ces deux formes d'α-LA ne se distinguent que par la présence d'ion Ca²⁺. L'α-LA A est la forme apoprotéique (qui ne fixe pas le calcium), et l'α-LA B la forme holoprotéique (qui fixe le calcium) (Giufreda et al., 1992). D'après la littérature, la concentration d'α-LA dans le lait d'ânesse varie entre 0,8 et 2,7 g/L. L'α-LA est résistante aux enzymes gastriques et duodénales avec 95% de la protéine non dégradée après

un test *in vitro* (Tidona et al., 2014). Ainsi, elle atteint l'intestin sans modification majeure comme pour l' α -LA du lait maternel humain (Inglingstad et al., 2010).

- Le Lysozyme

Dans le lait d'ânesse, deux variants de lysozyme (A et B), d'une masse moléculaire de 14,66 kDa (Figure 27), ont été décrits (Blake et al., 1965; Walsh et al., 1998). Tous les deux possèdent 129 acides aminés mais diffèrent par trois substitutions d'acides aminés en position 48, 52 et 61 (Cunsolo et al., 2007; Herrouin et al., 2000). Le lysozyme est présent en très forte quantité dans le lait d'ânesse. En effet, sa concentration peut atteindre jusqu'à 4g/L (Šarić et al., 2014; Vincenzetti et al., 2008). De plus, cette concentration élevée (15% des protéines totales), reste constante tout au long des 150 jours de lactation (Guo et al., 2007).

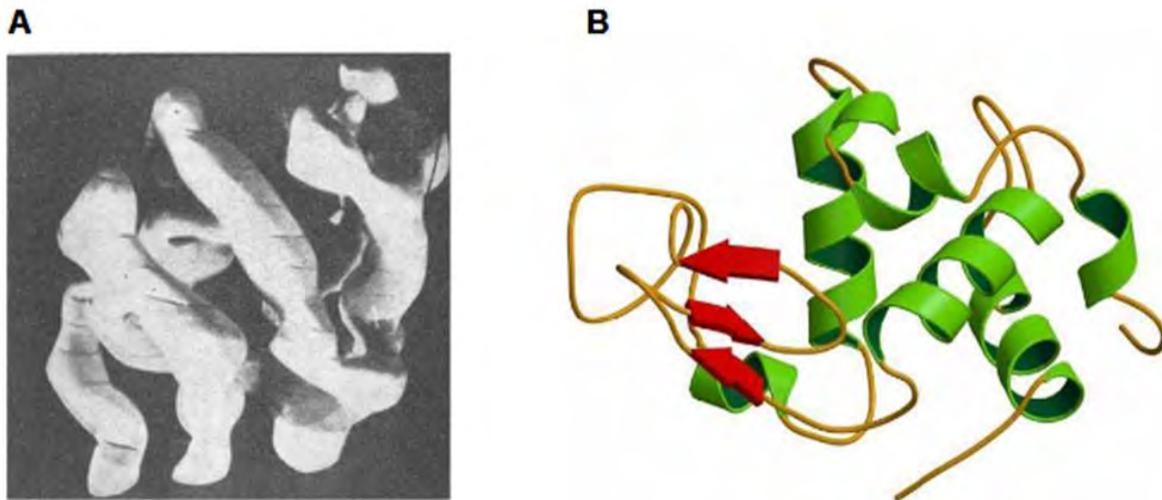


Figure 27: Structure tridimensionnelle du lysozyme. A) Modèle original de à une résolution de 6 Å (Blake et al., 1965). B) Représentation en ruban (Walsh et al., 1998).

La séquence en acides aminés du lysozyme provenant du lait d'ânesse est très différente de celle du lysozyme provenant du lait maternel humain, du lait de vache, ou du blanc d'œuf de poule avec respectivement 52%, 45% et 50% d'homologie de séquence (Tableau 5). Comme décrit plus haut, le lysozyme a une action bactéricide (Laible and Germaine, 1985). L'activité lytique du lysozyme du lait d'ânesse a été très peu étudiée. Toutefois, la littérature montre que, l'activité enzymatique du lysozyme des laits de jument et de femme est plus élevée comparée au lysozyme de blanc d'œuf de poule avec respectivement 4,2 et 3,5 contre 1 Unité d'activité (Hopper and McKenzie, 1974). Enfin, le lysozyme provenant du lait d'ânesse est résistant à la digestion avec seulement 25% de la protéine digérée *in vitro* par le suc gastro-intestinal (Tidona et al., 2014). Il est également thermostable, et

résiste à un traitement thermique de 63°C pendant 30 min (Coppola 2002 ; Di cagno et al 2004 ; Chiavari 2005). Quant à l'ajout de lysozyme dans les produits alimentaires, il a été montré chez la souris et le rat une tolérance orale du lysozyme pour une concentration de 4 g/kg (Masschalck and Michiels, 2003; Proctor and Cunningham, 1988). Suite à ces études, les agences sanitaires ont pu conclure que l'addition d'une faible quantité de lysozyme (E1105) dans certains produits ne présentait pas de danger manifeste pour la santé humaine (500 mg/L pour la filière viticole).

Tableau 5: Homologies de séquence du lysozyme de lait d'ânesse, de femme, de jument, de vache et de blanc d'oeuf de poule. (Blast des séquences FASTA)

Homologie de séquences du lysozyme (%)	Ânesse	Femme	Jument	Vache	Blanc d'oeuf de poule
Ânesse	100	52,3	97,7	45,4	50,0
Femme	52,3	100	50,8	67,7	60,0
Jument	97,7	50,8	100	44,6	49,2
Vache	45,4	67,7	44,6	100	53,8
Blanc d'oeuf	50,0	60,0	49,2	53,8	100

- La β -lactoglobuline

Dans le lait d'ânesse, la β -lactoglobuline (β -LG) a une masse moléculaire d'environ 18,4 kDa et une concentration moyenne de 1,3 - 5,5 mg/mL. Dans la littérature deux formes de β -LG sont décrites : β -LG I et β -LG II (Gubic et al., 2016). β -LG I est la forme majoritaire avec 162 acides aminés et représente 80% de la β -LG totale. Elle est monomérique et a un pHi de 5,9. β -LG I possède deux variants : β -LG IA et β -LG IB de respectivement 18,528 et 18,514 kDa. La forme β -LG II, minoritaire dans le lait d'ânesse représente 20% de la β -LG totale, possède 163 acides aminés et compte cinq variants : A, B, C, D et E de masse moléculaire allant de 18,227 à 18,311 kDa. Elle est également monomérique et possède un pHi de 4,5.

Le pourcentage d'homologie de séquence entre les deux formes β -LG I et β -LG II n'est que de 65,6%, suggérant qu'elles soient codées par deux gènes différents (Halliday et al., 1991; Herrouin et al., 2000). La β -LG, absente dans le lait maternel humain mais fortement représentée dans le lait de vache, est considéré, avec les caséines, comme une des principales protéines mises en cause dans l'allergie aux protéines de lait de vache (Uniacke-Lowe et al., 2010). Dans ce contexte, certaines études mettent en avant l'intérêt d'identifier du lait dépourvu de β -LG afin de résoudre des cas potentiels de réactions allergiques (Bu et al., 2013). De plus la β -LG bovine est résistante aux enzymes gastro-intestinales humaines. En revanche, la β -LG du lait d'ânesse est fortement dégradé *in vitro* par le suc

gastrique et duodéal humain (Inglingstad et al., 2010; Tidona et al., 2014). Cette plus forte dégradabilité de la β -LG asine pourrait, selon Tidona et ses collaborateurs, améliorer la tolérance à la β -LG et par conséquent, favoriser la production de peptides bioactifs dans l'intestin via l'activité du microbiote intestinal (Tidona et al., 2011).

- La lactoferrine

Cette protéine multifonctionnelle exerce plusieurs activités biologiques différentes selon les espèces. Il a été décrit pour la lactoferrine humaine une activité antimicrobienne significative *in vivo* et *in vitro* (de Araújo and Giugliano, 2001). L'activité antimicrobienne de la lactoferrine contre une large gamme de pathogènes Gram-positifs et Gram-négatifs semble dépendre d'une part de sa capacité à séquestrer le fer, ce qui produit un environnement déficitaire en fer limitant la croissance microbienne, et d'autre part à la perméabilisation des parois cellulaires bactériennes en se liant aux lipopolysaccharides via son extrémité N-terminale (Valenti and Antonini, 2005). La concentration de cette protéine dans le lait d'ânesse, d'environ 80 mg/L, est plus élevée que chez les ruminants mais plus faible que dans le lait maternel humain (Kanyshkova et al., 2001). Certaines données plaident en faveur d'une action synergique de la lactoferrine et du lysozyme pour agir contre les bactéries Gram-négatives. En effet la lactoferrine peut relier certains composants de la membrane bactérienne externe (lipopolysaccharides), formant ainsi des pores qui favorisent le passage du lysozyme qui consécutivement, perturbe les liaisons glycosidiques du peptidoglycane (Šarić et al., 2014; Tidona et al., 2014). La lactoferrine du lait d'ânesse de 97,4 kDa est facilement digérée par les enzymes gastriques et duodénales (Tidona et al., 2011). Cette donnée suggère que la lactoferrine peut jouer son rôle biologique directement dans l'intestin (Brock, 2002) sous la forme de peptides bioactifs comme la lactoferricine et la lactoferrampine (Furlund et al., 2013). De plus, Tidona et ses collaborateurs ont constaté que l'activité antimicrobienne du lait d'ânesse digéré *in vitro* contre différentes bactéries pouvait être due à la protéine intacte et à ses peptides obtenus par digestion (Tidona et al., 2011).

- Les immunoglobulines

Les immunoglobulines (Ig) dans le lait sont une famille de protéines de défense importante pour le nouveau-né, qui protègent naturellement la muqueuse intestinale contre les potentiels micro-organismes pathogènes. Trois classes d'Ig sont retrouvées dans le lait équin : IgA, IgG et IgM (Uniacke-Lowe et al., 2010). Chez l'Homme, les IgG sont transférés au fœtus *in utero*, alors que chez l'âne elles sont fournies seulement après la gestation via le colostrum puis le lait. En effet, chez l'ânesse, le placenta ne laisse pas passer les immunoglobulines maternelles de la mère au fœtus. Le lait d'ânesse possède une teneur en Igs plus élevée comparée à celle observée dans le lait humain. Cette forte

quantité permet d'inhiber toute croissance microbienne indésirable dans le lait d'ânesse et contribue fortement au développement de l'immunité de l'ânon. Cette dernière observation est souvent utilisée comme argument pour attribuer des effets bénéfiques pour la santé à la consommation de lait cru, comme le décrit Claeys et ses collaborateurs (Claeys et al., 2013). Cependant, une récente étude *in vitro* montre que les Igs du lait d'ânesse sont fortement dégradés par les enzymes gastriques et duodénales humaines où seulement 33% restent non digérées (Tidona et al., 2011).

- La lactoperoxydase

La lactoperoxydase est une enzyme oxydoréductase et possède une fonction protectrice contre les infections par des microorganismes. Elle se trouve en faible concentration dans le lait d'ânesse frais, tout comme dans le lait maternel humain (environ 0,1 mg/mL) (Vincenzetti et al., 2008). Elle est connue pour être inactivée par une température élevée. Cependant, cette enzyme pourrait être d'un intérêt nutritionnel important pour le lait frais, car agirait en synergie avec la lactoferrine et le lysozyme et contribuerait à assurer une bonne conservation du lait d'ânesse (Šarić et al., 2014).

Génération de peptides bioactifs liés à la dégradation

En plus des peptides et protéines bioactives solubles contenus dans le lait d'ânesse, certains traitements chimiques et physiques permettent la génération d'autres composés biologiquement actifs. Dans une étude de Nazzaro et ses collaborateurs, le lait d'ânesse a été acidifié et hydrolysé par la pepsine puis l'activité inhibitrice du lait d'ânesse après hydrolyse a été testée sur la croissance de différents microorganismes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* (Nazzaro, 2010). Le lait ainsi hydrolysé possédait une action inhibitrice sur la croissance de *S. aureus* et *E. faecalis* de manière dose-dépendante. Les résultats obtenus mettent en évidence la génération de peptides bioactifs générés par l'hydrolyse des protéines du lactosérum qui favorise son activité antimicrobienne (Nazzaro, 2010). Le lait d'ânesse est également décrit comme une source de peptides antimicrobiens libérés lors de la digestion *in vitro* (Tidona et al., 2011). Dans cette étude, le lait d'ânesse brut et digéré inhibent tous deux la croissance des bactéries pathogènes testées (*Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*). L'effet inhibiteur observé est significativement plus élevé pour les échantillons préalablement digérés par rapport aux échantillons de lait cru. Ainsi, l'activité antimicrobienne du lait d'ânesse pourrait résulter d'un effet synergique lié à la synthèse de peptides issus de la dégradation enzymatique gastro-intestinale et aux protéines intactes présentes naturellement dans le lait tel que le lysozyme (Tidona et al., 2011).

4. Composition microbiologique et réglementation sanitaire du lait d'ânesse

4.1 Qualité microbiologique du lait d'ânesse

Les données microbiologiques du lait d'ânesse cru rapportées dans la littérature montrent un nombre total de bactéries faible allant de 2,40 à 4,60 log₁₀ cfu/mL (Cavallarin et al., 2015; Coppola et al., 2002; Malissiova et al., 2016; Pilla et al., 2010; Salimei et al., 2004b). La raison de cette faible charge microbiologique peut être due au bon bilan de santé des ânes, à l'excellente position anatomique naturelle du pis (Salimei and Fantuz, 2012), ainsi qu'à la présence de composants antimicrobiens naturels, tels que le lysozyme, les immunoglobulines, la lactoferrine et la lactoperoxydase contenues dans le lait d'ânesse (Aspri et al., 2017).

Pour ce qui concerne la présence d'agents pathogènes d'origine sanitaire tels que *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Campylobacter spp.*, ceux-ci n'ont jamais été rapportés dans la littérature sauf la présence de *B. cereus* et *Staphylococcus spp* (Cavallarin et al., 2015; Sarno et al., 2012). Toutefois, certaines souches pathogènes pour l'Homme comme *Streptococcus* ont été détectées dans du lait d'ânesse cru, sans complications observées (Verraes et al., 2014). *Enterococcus faecalis* est la bactérie potentiellement pathogène la plus thermotolérante parfois détectée dans le lait d'ânesse cru (Aspri et al., 2016). Cette bactérie, responsable de problèmes de santé public (septicémies, infections intestinales, diarrhées) est résistante au lysozyme. En effet, *E. faecalis* résiste à des concentrations saturantes (50 mg/mL) en lysozyme dans un milieu liquide (Benachour et al., 2012; Hébert et al., 2007).

Les bactéries lactiques (LAB) du lait d'ânesse ont été très peu étudiées. Selon certains travaux, le contenu de LAB du lait d'ânesse varie entre 1,0 et 4,2 log cfu /mL (Carminati et al., 2014; Chiavari et al., 2005; Coppola et al., 2002; Zhang et al., 2008). Les LAB représentent un groupe hétérogène de microorganismes naturellement présents dans de nombreux aliments et dans le tractus gastro-intestinal et urogénital des animaux et de l'Homme. Ces LAB peuvent produire des composés antimicrobiens, tels que des bactériocines ou des substances inhibitrices similaires à la bactériocine. Par exemple, *Lactobacillus plantarum* isolé dans le lait d'ânesse produit des bactériocines ayant un effet inhibiteur vis-à-vis de la croissance de *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecium* (Murua et al., 2013). De la même manière, une souche de *Lactobacillus paracasei* productrice de bactériocines a été isolée dans le lait d'ânesse (Sa et al., 2011). Les bactériocines possèdent des propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de plusieurs bactéries pathogènes comme *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (Sa et al., 2011).

4.2 Réglementation sanitaire

L'intérêt croissant pour le lait d'ânesse en tant que source alimentaire pour les consommateurs sensibles, tels que les nourrissons souffrant d'allergies ou les personnes âgées immunodéprimées, nécessite une réglementation stricte en matière de qualité sanitaire des aliments. Or, au niveau français il n'existe pas de réglementation spécifique concernant le lait d'ânesse. Cependant, l'Union européenne a fixé des règles spécifiques pour la production de lait cru et de lait destiné à la transformation provenant de tous types de mammifères ([règlement CE 853/2004](#)). De plus, pour des raisons de sécurité, des restrictions sont appliquées par les États membres. Le règlement CE 853/2004 permet la vente de lait d'ânesse en vertu de la clause « autres espèces productrices de lait », où le nombre total de bactéries dénombrés à 30°C doit être inférieur à 1 500 000 ufc/mL (soit 6,17 log₁₀) pour le lait cru, et inférieur à 500 000 ufc/mL (soit 5,7 log₁₀) pour le lait destiné à la transformation.

5. Propriétés santé du lait d'ânesse

Le lait d'ânesse, par sa composition microbiobienne et biochimique est, avec le lait de jument, le lait qui ressemble le plus au lait maternel humain. Plus précisément, le lait d'ânesse et le lait humain ont des teneurs similaires en lactose, en protéines totales et en protéines solubles. Le lait d'ânesse présente un profil nutritionnel homogène particulièrement intéressant et certaines études préconisent son utilisation notamment chez les nourrissons et les personnes âgées (Uniacke-Lowe et al., 2010).

5.1 Alternative aux allergies aux protéines du lait de vache (APLV)

Comme l'APLV l'indique, il s'agit d'une réponse immunologique anormale aux protéines de lait de vache chez certains individus. L'APLV, l'une des allergies alimentaires les plus répandues, affecte 2 à 7% des enfants de moins de 6 mois (Polidori and Vincenzetti, 2013a). La réaction allergique au lait de vache est conduite par divers mécanismes immunologiques tels qu'une réaction d'hypersensibilité immédiate via la production d'IgE ou une réaction retardée non-IgE médiée. Les principaux allergènes du lait de vache sont les caséines (α -1 et β -caséines) suivie de la β -lactoglobuline (Caffarelli et al., 2010; Muraro et al., 2002; Osman Swar, 2011). La stratégie thérapeutique pour répondre à l'APLV est l'élimination totale du lait de vache. Le lait représente une source importante en nutriments jusqu'à l'âge de 2 ans, il est donc important de le substituer par des laits provenant d'autres espèces animales. Le lait sélectionné doit offrir une adéquation nutritionnelle et être hypoallergénique. Cependant, l'utilisation de lait d'autres espèces doit être surveillée par des pédiatres. La faible allergénicité du lait d'ânesse est principalement due à la faible teneur en caséine (Vincenzetti et al., 2008, 2014). De plus, le lait d'ânesse est facilement digéré en raison de sa teneur élevée en protéines solubles (Tidona et al., 2014). Cependant, en raison des faibles teneurs en matières grasses dans le lait d'ânesse, une

supplémentation en triglycérides à chaîne moyenne pourraient être envisagée pour améliorer l'énergie globale et la teneur en matières grasses du lait d'ânesse (Salimei and Fantuz, 2012). Les résultats de l'étude clinique de Iacono et ses collaborateurs suggèrent que les nourrissons souffrant d'APLV pourraient consommer du lait d'ânesse (210-250 mL par kg de poids corporel par jour) enrichi en lipides (Iacono et al., 1992). Une autre étude *in vivo* démontre que 24 sujets souffrant d'APLV sur 25 ont toléré le lait d'ânesse (96%) (Tesse et al., 2009). Il est évident que de nouvelles études cliniques sont nécessaires pour consolider les résultats décrits dans ces précédentes études.

5.2 Effet anti-tumoral et anti-viral du lait d'ânesse *in vitro*

En 2009, Mao et ses collaborateurs ont démontré des propriétés anti-tumorales et anti-prolifératives du lait d'ânesse sur une lignée cellulaire tumorigène humaine issue d'un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire (cellules A459) (Mao et al., 2009). En parallèle, les auteurs ont montré que la fraction du lait d'ânesse qui contenait le lysozyme était aussi la plus efficace par rapport aux autres fractions (lait écrémé, caséines du lait d'ânesse, lactosérum, protéines du lactosérum de masse moléculaires inférieure ou égale à 10 kDa) pour inhiber la prolifération des cellules tumorales A459. Ainsi, les protéines solubles joueraient un rôle fondamental dans l'activité anti-proliférative du lait d'ânesse, *in vitro*.

Une récente étude menée par Brumini et ses collaborateurs met en avant une activité antivirale du lait d'ânesse sur l'échovirus (*Enteric Cytopathogenic Human Orphan Virus*) de type 5, virus à ARN infectant le tractus gastro-intestinal et provoquant des troubles digestifs chez l'Homme (Brumini et al., 2013). En effet, dans leur étude l'infection des cellules épithéliales intestinales Caco-2 par l'échovirus de type 5 est réduite après ajout de lait d'ânesse. Cette activité anti-virale est majoritairement portée par les protéines solubles (lactoperoxydase, lysozyme, immunoglobuline, lactoferrine, sérum albumine, α -lactalbumine et β -lactoglobuline), suggérant une activité synergique de ces protéines (Brumini et al., 2013).

5.3 Réponse immuno-modulatrice et activité antimicrobienne du lait d'ânesse

L'activité antimicrobienne du lait d'ânesse a été démontrée efficace contre des bactéries spécifiques souvent associées à une infection intestinale. Le lait d'ânesse contient plusieurs protéines antimicrobiennes (lysozyme, lactoferrine, lactoperoxydase...) qui ont la capacité d'éviter le développement d'infections gastro-intestinales en agissant à la fois dans le tractus digestif comme décrit précédemment et également sur la glande mammaire de l'animal (Brumini et al., 2015; Nazzaro, 2010; Tidona et al., 2011). Certains résultats suggèrent que le lait d'ânesse a un effet immuno-modulateur. En effet, chez les personnes âgées, une consommation de lait d'ânesse induit la synthèse

de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et de monoxyde d'azote (Jirillo et al., 2010; Tafaro et al., 2007). Récemment, Trinchese et ses collaborateurs ont montré qu'une administration de lait d'ânesse chez des rats était associée à une augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes (thiols) et anti-détoxifiantes (glutathione-S-transférase, NADH quinone oxidoreductase) chez le rat. Cette étude met en évidence les bénéfices métaboliques d'une consommation de lait d'ânesse, en rapport avec la modulation de leur microbiote intestinal via l'augmentation d'AGCC comme le butyrate (Trinchese et al., 2015).

6. Transformation alimentaire du lait d'ânesse

La disponibilité du lait d'ânesse, comme déjà discuté précédemment, est plutôt limitée et par conséquent, la conservation et l'entreposage sont deux paramètres clés pour prévenir toutes les détériorations. Le lait d'ânesse est principalement consommé pour ses avantages liés à la santé. Par conséquent, l'impact de tout traitements technologiques sur les composants nutritionnels précieux du lait d'ânesse doit être évalué.

6.1 Congélation du lait d'ânesse cru

Lorsque le lait d'ânesse est conservé à -20°C, Vincenzetti et ses associés ont observé une dégradation significative des caséines et du contenu en protéines totales. Après deux mois de stockage à -20°C, la matière protéique totale est réduite et accentuée après trois mois de stockage (Vincenzetti et al., 2011). Cependant, la concentration en lysozyme et son activité enzymatique ne sont pas affectées par la congélation à -20°C (Vincenzetti et al., 2011). De la même manière, pour l' α -LA et la β -LG, une concentration stable dans le lait d'ânesse a été observée après trois mois de congélation à -20°C. Cette étude montre également une chute des taux en vitamine C après la congélation avec une concentration de 5,7 mg/L dans le lait d'ânesse cru qui diminue à 4,5 mg/L après un mois à -20°C et à 3,5 mg/L après trois mois à -20°C (Polidori and Vincenzetti, 2013b; Vincenzetti et al., 2011).

6.2 Du lait d'ânesse en poudre : la lyophilisation

Quelques asineries françaises proposent la consommation de gélules de lait d'ânesse comme complément alimentaire. La lyophilisation n'a pas d'impact sur la concentration en protéines totales, la concentration en caséines totale, le lysozyme (concentration et activité) et la β -LG (Vincenzetti et al., 2011). Seules les concentrations en vitamine C et en α -lactalbumine sont légèrement impactées par la lyophilisation (Vincenzetti et al., 2011).

6.3 Du lait d'ânesse en bouteille : Pasteurisation

Peu de données concernant l'effet de la pasteurisation du lait d'ânesse sont disponibles, cependant, une récente étude montre que le pH du lait d'ânesse traité thermiquement (72°C / 1min ; 87°C / 1min) est plus stable au cours du temps, comparé au lait cru. De même, la pasteurisation du lait d'ânesse à 63 ° C pendant 30 minutes et 72 ° C pendant 15 secondes n'affectent pas de manière significative le taux d'immunoglobulines (IgA, IgG) par rapport au lait cru (Aspri et al., 2017). Ces données concernant la pasteurisation du lait d'ânesse diffèrent de celles obtenues sur le lait maternel humain, où les immunoglobulines A, G et M et le lysozyme se révèlent sensibles à un traitement thermique de 62°C pendant 30 minutes (Sousa et al., 2014).

6.4 Fermentation du lait d'ânesse

En raison de sa composition biochimique, notamment ses faibles teneurs en caséines, le lait d'ânesse est difficilement transformable en fromage. Cependant, le lait d'ânesse a la capacité de former un faible coagulum dans des conditions acides, ce qui permet la formation d'un gel et potentiellement la production de produits de type yaourt. Chiavari et ses collaborateurs ont produit des boissons fermentées provenant du lait d'ânesse en utilisant les souches bactériennes probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus casei* (Chiavari et al., 2005). Ces souches restaient viables après 30 jours de stockage. De même, la concentration en lysozyme était inchangée par rapport aux valeurs initiales (3,7 g/L), mais aucune donnée liée à l'activité enzymatique du lysozyme n'a été décrite.

DEFINITION DES OBJECTIFS ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

Les objectifs de cette thèse étaient d'évaluer les propriétés santé du lait d'ânesse à l'aide de modèles expérimentaux mimant respectivement la MC et le SII afin d'apporter des preuves précliniques robustes et permettre une meilleure valorisation de ce dernier. Le rationnel de l'évaluation de cette matrice alimentaire était basé sur sa valeur nutritionnelle, notamment sa forte concentration en lysozyme et sa ressemblance au lait maternel humain. Nos objectifs étaient de déterminer l'effet d'une consommation de lait d'ânesse sur les altérations de la barrière épithéliale digestive, de la sensibilité viscérale, du microbiote intestinal et de l'état inflammatoire lors d'une iléite expérimentale et d'un stress chronique chez la souris adulte mâle. Lors de cette première étape nous sommes attachés à démontrer le rôle clé du lysozyme dans les effets bénéfiques préalablement observés. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à définir un barème de pasteurisation dans l'objectif de conserver l'activité en lysozyme présente dans le lait d'ânesse. Cette étape avait pour objectif de proposer aux producteurs de lait d'ânesse une méthode simple peu coûteuse qui leur permettra de commercialiser un lait irréprochable sur le plan sanitaire avec une forte valeur ajoutée. Enfin nous nous sommes attachés à vérifier que ce lait pasteurisé conservait bien les propriétés santé que nous avons démontré pour le lait cru sur deux paramètres traduisant l'état physiologique de la muqueuse digestive i.e. la perméabilité intestinale et son niveau d'inflammation (Figure 28).

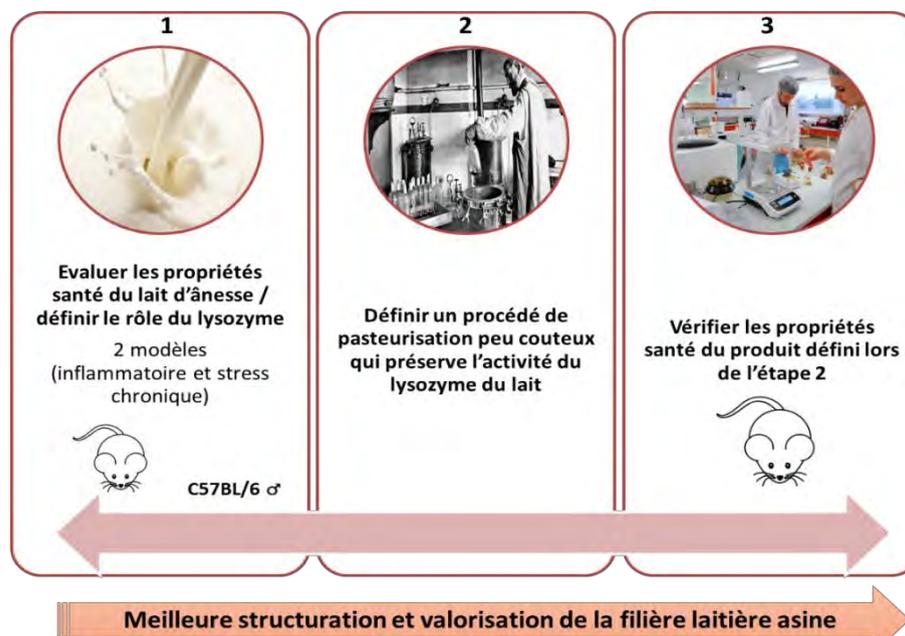


Figure 28: Définition des objectifs de thèse et démarche expérimentale.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

RESULTAT I :

Une consommation de lait d'ânesse exerce des propriétés anti-inflammatoires en normalisant les niveaux de peptides antimicrobiens dans les cellules de Paneth dans un modèle d'iléite chez la souris. Publié dans « *European journal of Nutrition* ».

Sophie Yvon, Maiwenn Olier, Mathilde Leveque, Gwenaëlle Jard, Hélène Tormo, Djamila Haimoud-Lekhal, Magali Peter, Hélène Eutamène.

Contexte et objectifs : La maladie de Crohn se caractérise par une atteinte préférentielle de l'iléon. Une dysbiose associée à un dysfonctionnement des cellules de Paneth (PC) illustré par un déficit en peptides antimicrobiens a été décrite. De nos jours, de nouvelles stratégies de manipulations du microbiome sont mis en avant, impliquant des régimes spécifiques pour induire et/ou maintenir la rémission clinique. Le lait d'ânesse est une matrice présentant naturellement de forts taux de peptides antimicrobiens (lysozyme).

Méthodes : Des souris C57BL/6 mâles ont reçu par voie orale de l'indométacine ou du PBS pendant 5 jours et ont été co-traitées avec un véhicule, du lait d'ânesse ou du lait d'ânesse chauffé pendant 7 jours. La longueur intestinale et les scores de dégâts macroscopiques ont été déterminés. Les échantillons iléaux ont été prélevés pour les dommages microscopiques, l'immunomarquage du lysozyme et l'évaluation de l'expression de l'ARNm des α -défensines. Les contenus iléaux et fécaux ont été collectés pour mesurer l'activité enzymatique du lysozyme et de la lipocaline-2. Les profils du microbiote fécal ont été comparés en utilisant une analyse quantitative par PCR en temps réel (Figure 29).

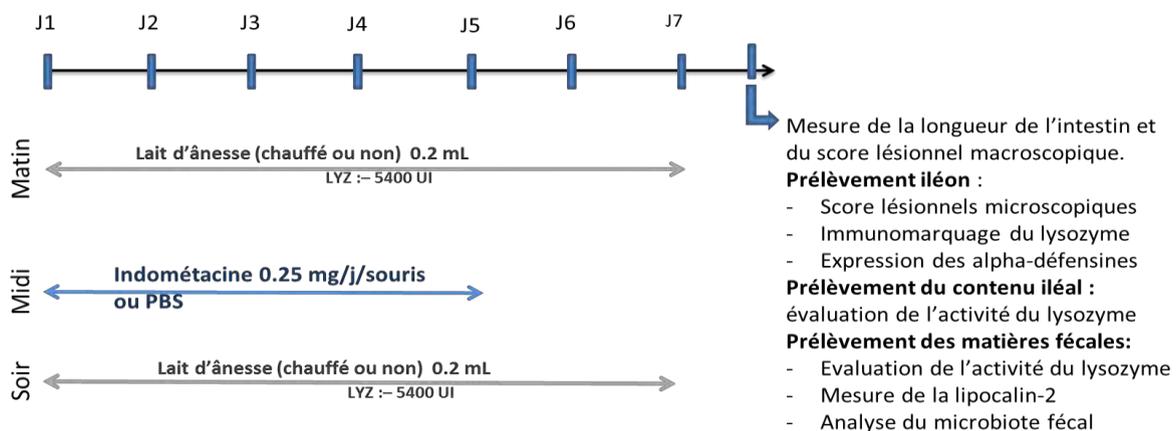


Figure 29 : Design expérimental de la première étude

Résultats : L'administration d'indométacine a provoqué une iléite chez la souris caractérisée par (1) une diminution du poids corporel et de la longueur intestinale, (2) une augmentation significative des scores lésionnels macroscopiques, microscopiques et de la lipocaline-2, (3) une réduction de l'expression de l'ARNm des α -défensines et des niveaux de lysozymes dans les cellules de Paneth reflétés par une diminution de l'activité du lysozyme dans les fèces et (4) un changement global de l'abondance relative des communautés microbiennes ciblées. Le traitement au lait d'ânesse a considérablement réduit presque tous ces dommages, alors que le lait d'ânesse chauffé n'a aucun impact sur l'iléite.

Conclusion : La consommation de lait d'ânesse exerce des propriétés anti-inflammatoires chez la souris en rétablissant les niveaux endogènes de peptides antimicrobiens qui contribuent à réduire le déséquilibre du microbiote intestinal pour *in fine* réduire l'iléite.

Mots clés : Lait d'ânesse, Peptides antimicrobiens, Maladie de Crohn, Iléite, Dysbiose.



Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice

Sophie Yvon^{1,2} · Maïwenn Olier¹ · Mathilde Leveque¹ · Gwenaëlle Jard² · Helene Tormo² · Djamilia Ali Haimoud-Lekhal² · Magali Peter² · Hélène Eutamène^{1,2}

Received: 13 April 2016 / Accepted: 23 August 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract

Purpose In this study, we showed the beneficial effects of donkey milk (DM) on inflammatory damages, endogenous antimicrobial peptides levels and fecal microbiota profile in a mice model of Crohn's disease. Nowadays, new strategies of microbiome manipulations are on the light involving specific diets to induce and/or to maintain clinical remission. Interest of DM is explained by its high levels of antimicrobial peptides which confer it anti-inflammatory properties.

Methods C57BL/6 mice were orally administered with or without indomethacin for 5 days and co-treated with vehicle, DM or heated DM during 7 days. Intestinal length and macroscopic damage scores (MDSs) were determined; ileal samples were taken off for microscopic damage (MD), lysozyme immunostaining and mRNA α -defensin assessments. Ileal luminal content and fecal pellets were collected for lysozyme enzymatic activity and lipocalin-2 (LCN-2) evaluations. Fecal microbiota profiles were compared using a real-time quantitative PCR-based analysis.

Results Administration of indomethacin caused an ileitis in mice characterized by (1) a decrease in body weight and

intestinal length, (2) a significant increase in MDS, MD and LCN-2, (3) a reduction in both α -defensin mRNA expression and lysozyme levels in Paneth's cells reflected by a decrease in lysozyme activity in feces, and (4) a global change in relative abundance of targeted microbial communities. DM treatment significantly reduced almost of all these ileitis damages, whereas heated DM has no impact on ileitis.

Conclusions DM consumption exerts anti-inflammatory properties in mice by restoring the endogenous levels of antimicrobial peptides which contribute in turn to reduce microbiota imbalance.

Keywords Donkey milk · Antimicrobial peptides · Crohn's disease · Ileitis · Dysbiosis

Abbreviations

CD	Crohn's disease
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DM	Donkey milk
GULDA	GUt low-density array
IBD	Inflammatory bowel disease
MD	Microscopic damage
MDS	Macroscopic damage scores
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
PBS	Phosphate-buffered saline
PCA	Principal component analysis

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00394-016-1304-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

*- Hélène Eutamène
helene.eutamene@toulouse.inra.fr

¹ UMR 1331 Toxalim INRA, INP-ENVT, INP-PURPAN, Université de Toulouse 3 Paul Sabatier, Neuro-Gastroenterology and Nutrition Group, 180 chemin de Tournefeuille-BP.93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France

² Département des Sciences Agronomiques et Agroalimentaire, équipe Agroalimentaire et Nutrition, Université de Toulouse INP-PURPAN, 75 voie du TOEC, 31076 Toulouse Cedex 3, France

Introduction

Crohn's disease (CD) is one of the two forms of inflammatory bowel diseases (IBDs). The inflammation in CD patients mainly occurs in the ileum [1]. This pathology is reflected in symptomatic spurts with variable severity and duration, resulting in abdominal cramps, diarrhea, fatigue

and loss of body weight. The disease flares alternate with phases of clinical remission [2]. Nowadays, there is growing consensus that the ultimate strategy of IBD management is to focus on inducing and maintaining clinical remission [3]. The etiology of CD remains unclear, but data plead for a multifactorial etiology considering genetic, immunological, microbial and environmental factors [4, 5]. Among these factors, a dysbiosis is usually associated with CD and contributes to the initiation and/or perpetuation of chronic mucosal inflammation [6–8]. As compared to healthy subjects, alteration of the gut microbiota profile of CD patients is observed and is notably characterized by an imbalance of the ratios between the two major phyla Firmicutes and Bacteroidetes [9, 10]. Among the Firmicutes phylum, a decrease in *Faecalibacterium prausnitzii* was observed in the ileal mucosa of patients operated for Crohn's ileitis. Interestingly, this ratio was inversely correlated with the risk of postoperative recurrence [11–13]. Moreover, a significant increase in Enterobacteriaceae in IBD patients relative to the healthy population has also been described. In addition to this microbiota imbalance, a dysfunction of Paneth cells has also been reported [14]. These epithelial cells located in the bottom of the ileal crypts are the main source of antimicrobial peptides such as α -defensins or lysozyme [14–16]. These antimicrobial peptides act as innate immunomodulators, leading to the protection against pathogenic invasion. In turn, these peptides allow selective control of inflammation by regulating microbial status in the intestine [17]. A molecular characteristic of patients with ileal CD is a reduction in the expression of α -defensins human defensin 5 and 6 in Paneth cells, resulting in an impaired defense barrier through a reduction in luminal antibacterial host defense capacity [18–21].

Therapeutic manipulation of intestinal microbiota can target selective beneficial bacteria species versus detrimental species. These new strategies of microbiome manipulations are on the light and may involve antibiotics, probiotics, prebiotics and use of specific diets [22–25]. In this way, among natural food matrices, donkey milk presents a high level of antimicrobial peptides and potentially seems a good candidate for reducing ileitis damage. Donkey milk (DM) has important nutritional properties for humans linked to its similar composition to human milk [26, 27]. DM is mainly used for infant nutrition as a natural substitute milk when breast feeding is not possible or to replace bovine milk in diet therapy of patients affected by cows' milk protein allergy [28–30]. In particular, DM presents high levels of antimicrobial peptides such as lysozyme and lactoferrin (20 and 5 % of the total soluble proteins, respectively) that give it antibacterial properties [31], as well as anti-tumoral and anti-proliferative properties on A549 human lung cancer cells [32].

Therefore, the objectives of this study were to characterize using an adapted experimental mouse model of ileitis mimicking CD [33], the effect of a chronic administration of donkey milk on macroscopic and microscopic inflammatory scores as well as on microbiota profile and on endogenous antimicrobial peptides levels contained in Paneth cells.

Materials and methods

Donkey milk

Fresh milks from donkeys located in southwest of France ("Les Ânes d'Autan", Graulhet and "La ferme du Hitton", Biran) were used in this study. Immediately after milking, samples were kept in an ice box ($<4^{\circ}\text{C}$) and stored 1 h later in the laboratory at -20°C until lysozyme activity measurements. These enzymatic activities were measured using an EnzCheck Lysozyme Assay Kit (Molecular Probes E-22013, Thermo Fisher Scientific). The obtained results from these assays allowed application to all the animals orally treated by DM the same total daily activity of lysozyme, i.e., 11800 UI in a total adjusted volume (0.4 ± 0.05 mL). In parallel, to completely eliminate lysozyme activity samples of DM were heated at 140°C at $\text{pH} = 9.5$ for 40 mn, and checked using the same EnzCheck Lysozyme Assay Kit.

Animals

Eight-week-old male C57BL/6 (weighting 23 ± 0.5 g) (Janvier, Le Genest St Isle, France) was used in this study. Mice were maintained in the pathogen-free animal facility at a constant temperature ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) on a 12-/12-hour light/dark cycle. Mice had free access to water and to standard rodent food (Harlan, Global diet 2018 containing crude protein 18.6 %, crude fat 6.2 %, crude ash 5.3 % and crude fiber 3.5 %). Animal care and work protocols were approved by the local ethical committee, according to the EU directive 2010/63/EU (Agreements #Toxcom0143HE).

Experimental protocol

Male C57BL/6 were divided into six groups ($n = 12$ per group), i.e., three control groups (basal conditions) and three indomethacin groups (inflammatory conditions). In both conditions, animals received orally twice per day either vehicle (0.2 mL of PBS) or donkey milk (DM, 11800 UI in 0.2 ± 0.05 mL) or heated DM (0.2 mL). The first treatments were performed 2 h before, during and 2 days after ileitis induction by indomethacin administration. Adapted from Craven et al. [33], ileitis was induced by oral administration of indomethacin diluted in PBS (0.25 mg/mouse) for 5 days. Body weight was evaluated everyday.

the day before and from the beginning of the treatment until 2 days post-indomethacin. Then, animals were sacrificed, and intestinal length and macroscopic damage score were determined. Ileal samples were taken for (1) microscopic damage score (2) lysozyme immunostaining and mRNA α -defensin assessments. Ileal content and fecal pellets were collected for lysozyme activity evaluation. Fecal materials were also taken for microbiota characterization and lipocalin-2 quantification as intestinal inflammatory biomarker.

Mice body weight and intestinal length

The body weight of mice was recorded the day before and followed every day after the ileitis induction by indomethacin administration until the day of sacrifice. The intestine length was measured after the sacrifice.

Macroscopic damage scores (MDSs)

Immediately after sacrifice, the ileum was removed and rinsed with saline. Intestinal damages were scored according to an adapted scale of Wallace et al. [34]. Briefly, the presence of mucosal hyperemia, the intestine wall thickening, the severity and extent of ulceration and necrosis, the tissue adhesion and the occurrence of diarrhea were rated according to a macroscopic damage score ranging from 0 (normal appearance) to 7.5 (severe damages).

Microscopic damage scores (MD)

Pieces of collected ileum samples were fixed in 4 % formaldehyde for 24 h, embedded in paraffin blocks and cut into 5 μ m sections for histology analysis. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin. Microscopic damage scores of inflammation were assessed using a histological grading scale adapted to Fabia et al. [35]. This scale takes into account the leukocyte infiltration, the vascular dilatation, the presence or not of edema, the thickening of the mucosa, the ulceration and the status of the mucus layer. Microscopic damage score is ranging from 0 (normal appearance) to 5 (severe inflammatory damages).

Quantification of fecal lipocalin-2 by ELISA

For quantification of lipocalin-2 (LCN-2) by ELISA, frozen fecal samples were reconstituted in PBS and vortexed for 20 min to get a homogenous fecal suspension as described previously [36]. Then, the samples were grinded using FastPrep and centrifuged for 10 min at 12.000 rpm and 4 °C. Clear supernatants were collected and stored at -20 °C until analysis. LCN-2 levels were measured using the DuoSet murine LCN-2 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Immunohistochemistry: lysozyme immunostaining

Sections of ileum segments (5 μ m) were hydrated and dipped in a bath of citrate buffer 10 mM, pH 6 at 95 °C, to regenerate antigens. After saturation of the non-specific binding site, sections were incubated successively with antibodies of rabbit anti-lysozyme (1/100) overnight at 4 °C and with antibody of donkey anti-rabbit alexa488 (1/2000). The slides were rinsed with PBS and covered with mounting medium containing DAPI (P36931, Invitrogen). The number of Paneth cells containing lysozyme per crypt was quantified in a blinding manner using a 90i Nikon fluorescence microscope.

mRNA expression by real-time reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR): α -defensins mRNA expression

Total mRNA was extracted from ileum segment with RNeasy mini kit. A total of 500 ng were used to perform reverse transcription during 60 min at 37 °C. The real-time PCR was performed using 25 ng of cDNA in a final volume of 20 μ L containing SYBR Green TaqMan Universal PCR Mix. Fluorescence was recorded and analyzed. Analysis of the 18S ribosomal RNA was performed with the TaqMan assay kit control to normalize gene expression overall α -defensins. Specific primers were obtained from Eurogentec (Angers, France): forward, 5'-GGT-GAT-CAG-CAT-ACC-CCA-GCA-TCA-GT-3'; reverse, 5'-AAG-AGA-AAA-CTA-CTG-AGG-AGC-AGC-3' to amplify the α -defensins. To normalize our values, the reference gene 18S as: forward, 5'-GACCAW-ACA-CGG-GAA-ACC-3'; reverse, 5'-CAA-AGAATC-GCT-CCA-CCA-AC-3' has been chosen.

GUT low-density array (GULDA) analysis: relative abundance of 20 different bacterial 16S rRNA gene targets in fecal sample from C57BL/6 mice

Total community of DNAs was extracted in a randomized and a blinded manner from fecal samples using mechanical lysis plus column method (ZR Fecal DNA MiniPrep kit Zymo research, Irvine, USA). The DNA concentration was determined using Qubit® ds DNA HS assay kit (Life technologies) and adjusted to 1 ng/ μ L prior to use as a template in qPCR. Change in the abundance of 20 different bacterial 16S rRNA gene targets was obtained using the GULDA approach as previously described [37, 38]. Herein, this method was adapted using only 20 bacterial targets for communities in mice. Indeed, 31 bacterial targets described in the assay were not detected in mice. According to this method, the universal bacterial primer set U1 was included as the reference gene (four technical

replicas of each amplification). Each 384-well PCR plate (MicroAmp optical reaction plates, Applied Biosystems, Naerum, Denmark) accommodated simultaneous analysis of four DNA samples per group (control vs indomethacin vs control + donkey milk vs indomethacin + donkey milk) in duplicate. Quantitative real-time PCR was performed on a ViiA7 from Applied Biosystems in a total volume of 5 μ L containing 2.5 μ L $2 \times$ Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.18 μ L of each primer (10 μ M), 1 μ L template DNA and 1.14 μ L nuclease-free water. Liquid handling was performed with a Bravo platform (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Following the previously described thermocycling program, the raw fluorescence data recorded by the ViiA7 RUO Software were exported to the LinRegPCR program to perform baseline correction, to calculate the mean PCR efficiency per amplicon group and to calculate the initial quantities. No (arbitrary fluorescence units) for each amplicon. The relative abundance of the 20 specific amplicon groups was obtained by normalization to the No value obtained for the universal bacterial amplicon group determined in the same array (No, specific/No, universal). A limit of detection of 10^{-6} (No, specific/No, universal) was set, and samples below this limit were set to $5 \cdot 10^{-6}$. The normalized No-values (log10 transformed) obtained from each amplicon group were used as input for multivariate principal component analysis (PCA) using FactoMineR (version 1.31.3).

Lysozyme activity in both ileal and fecal materials

After sacrifice, ileal contents and feces were collected. The samples were stored at 4 °C. Each sample was mixed and homogenized in 500 μ L of kit buffer. After centrifugation (10 min, 8000 rpm, 4 °C), pellets were discarded and supernatants were filtered by 0.8 μ m-sized syringe filters.

The activities of lysozyme contained in these supernatants were measured as previously described using the EnzCheck Lysozyme Assay Kit (E-22013). To normalize the values obtained, a protein assay was performed using the protein assay kit (Interchim). Results were expressed in lysozyme units of activity/mg protein.

Data analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. For statistical analysis, GraphPad prism (GraphPad, San Diego, CA) was used. Multiple comparisons within groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$. For microbiota data, statistical analysis for comparison between the relative abundance for specific amplicon groups was performed using the GraphPad prism software. Indicated p values < 0.05 refer to significance using one-way analysis of variance (ANOVA)

followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test.

Results

Effect of donkey milk on body weight and intestinal length

In basal conditions, after 7 days of oral administration of DM, animals did not show any difference in body weight nor in intestinal length compared with control mice (Fig. 1a, b). Body weight loss started 24 h after ileitis induction by indomethacin administration, to reach $\approx 5\%$

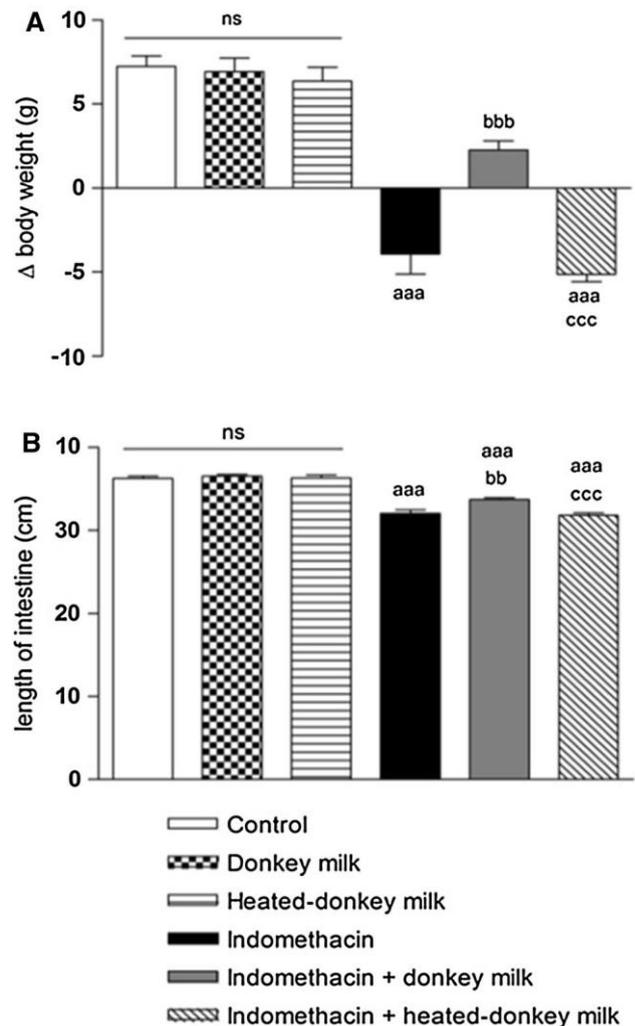


Fig. 1 Effect of donkey milk treatment on **a** body weight and **b** length of intestine. Values are expressed by mean \pm SEMs, $n = 12$. *ns* nonsignificantly different: $p > 0.05$. *a*, *aa*, *aaa* $p < 0.05$, 0.01, 0.001, respectively, vs Control. *b*, *bb*, *bbb* $p < 0.05$, 0.01, 0.001, respectively, vs Indomethacin. *c*, *cc*, *ccc* $p < 0.05$, 0.01, 0.001, respectively, vs Indomethacin + Donkey milk

on day 7 post-indomethacin compared to non-inflamed mice (Fig. 1a). A significant reduction ($p < 0.05$) in intestinal length was measured on day 7 post-indomethacin (Fig. 1b). Under inflammatory conditions, mice treated orally with DM showed a significant reduction in both body weight loss as well as a significant less reduction in intestinal length compared to indomethacin ileitis mice (Fig. 1a, b). Interestingly, heated DM treatment failed to reverse the deleterious effects of indomethacin on these two parameters, i.e., body weight and intestinal length (Fig. 1a, b).

Donkey milk treatment attenuates the severity of indomethacin-induced ileitis

In basal conditions, PBS, DM and heated DM did not induce inflammation. Indomethacin administration resulted in ileum inflammation reflected by ileal ulcerative areas, hyperemia, tissue adhesion and diarrhea, leading to a

significant increase $p < 0.001$ in MDS 7 days after ileitis induction compared with non-ileitis mice (Fig. 2a). In the same way, compared with control mice, indomethacin administration promoted a drastic increase ($p < 0.001$) of MD scores (Fig. 2b) illustrated by leukocytes infiltration into the mucosa, thickening of the mucosa and ulceration (Fig. 2d). Moreover, fecal LCN-2 levels were significantly increased in inflammatory conditions (Fig. 2c). Oral DM treatment significantly decreased fecal LCN-2 and both ($p < 0.001$) MDS and MD scores. Again, oral heated DM treatment had no effect on the inflammatory damages induced by indomethacin administration (Fig. 2).

Donkey milk treatment restored the antimicrobial peptides contained in Paneth's cells in ileitis mice

No modification of the number of Paneth cells was observed in ileal tissue sections (Table 1). In basal

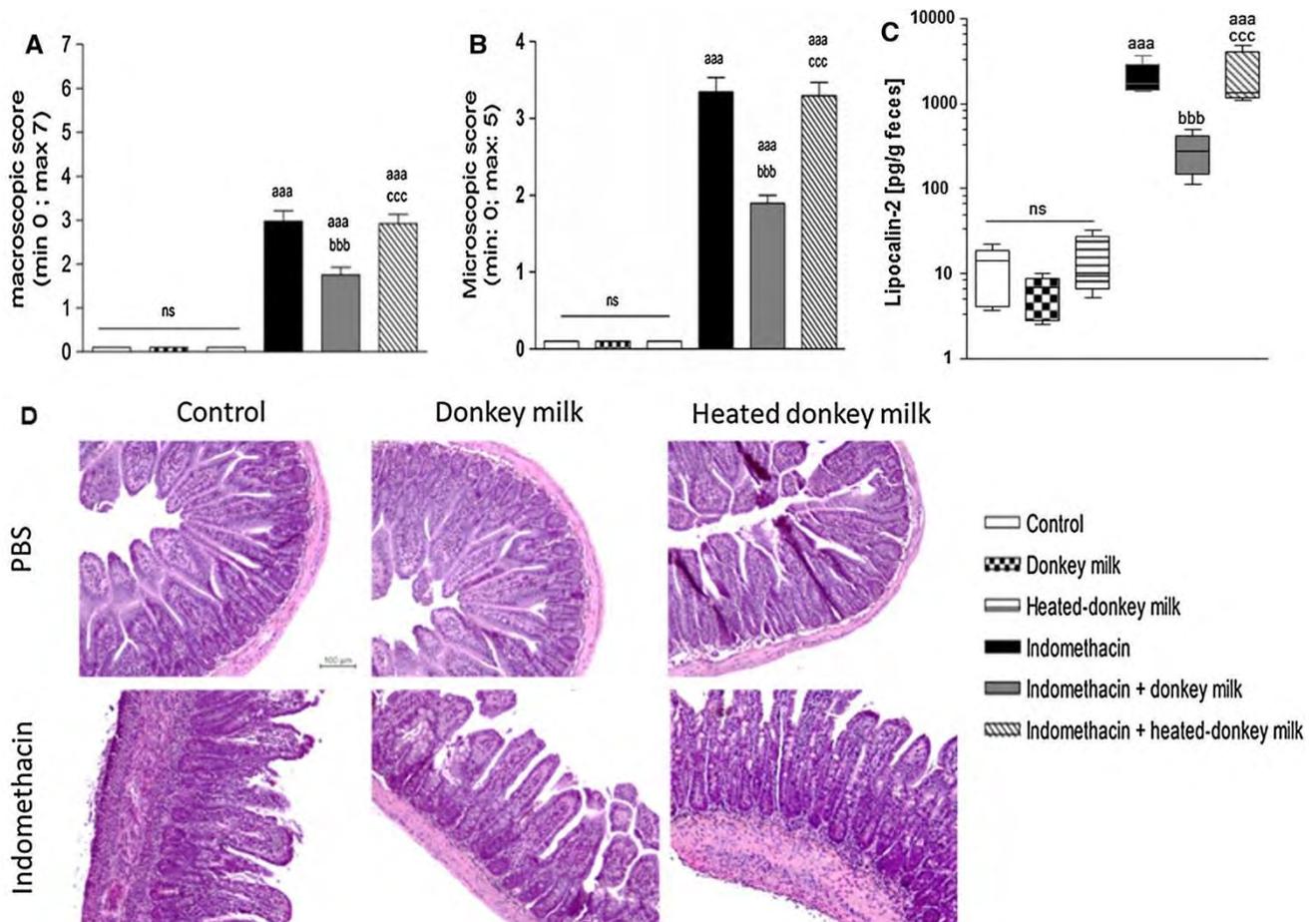


Fig.2 Effect of donkey milk treatment on **a** macroscopic damage scores, **b** microscopic damage scores, **c** fecal lipocalin-2 and **d** histological illustrations. Values are expressed by mean ± SEMs, $n = 12$. *ns* nonsignificantly different: $p > 0.05$. *a, aa, aaa* $p < 0.05, 0.01, 0.001$, respectively, vs Control. *b, bb, bbb* $p < 0.05, 0.01, 0.001$, respectively, vs Indomethacin. *c, cc, ccc* $p < 0.05, 0.01, 0.001$, respectively, vs Indomethacin + Donkey milk. **d** shows histological profiles with all the treatment

conditions, treatment with DM did not change the mRNA levels of α -defensins compared with control (PBS). In contrast, DM intervention significantly increases lysozyme levels contained in Paneth's cells. In ileitis mice, indomethacin induced a decrease of 55 % of α -defensins mRNA expression and a significant decrease ($p < 0.001$) in lysozyme levels contained in Paneth cells compared with control animals (Fig. 3a-c).

In ileitis animals, donkey milk treatment significantly restored ($p < 0.001$) the expression and the levels of these two antimicrobial peptides (α -defensins and lysozyme) versus indomethacin animals ($p < 0.001$). No significant difference on these two antimicrobial peptides expression or levels in Paneth's cells between animals treated with indomethacin plus heated DM versus indomethacin was observed.

Table 1 Effect of each treatment on the number of Paneth cells

	Control	Donkey milk	Heated donkey milk	Indomethacin	Indomethacin + donkey milk	Indomethacin + heated donkey milk
Mean	6.50 ± 0.31	6.33 ± 0.47	6.58 ± 0.38	6.33 ± 0.35	6.67 ± 0.28	6.41 ± 0.39

No significant difference between each treatment. $n = 12$ per group

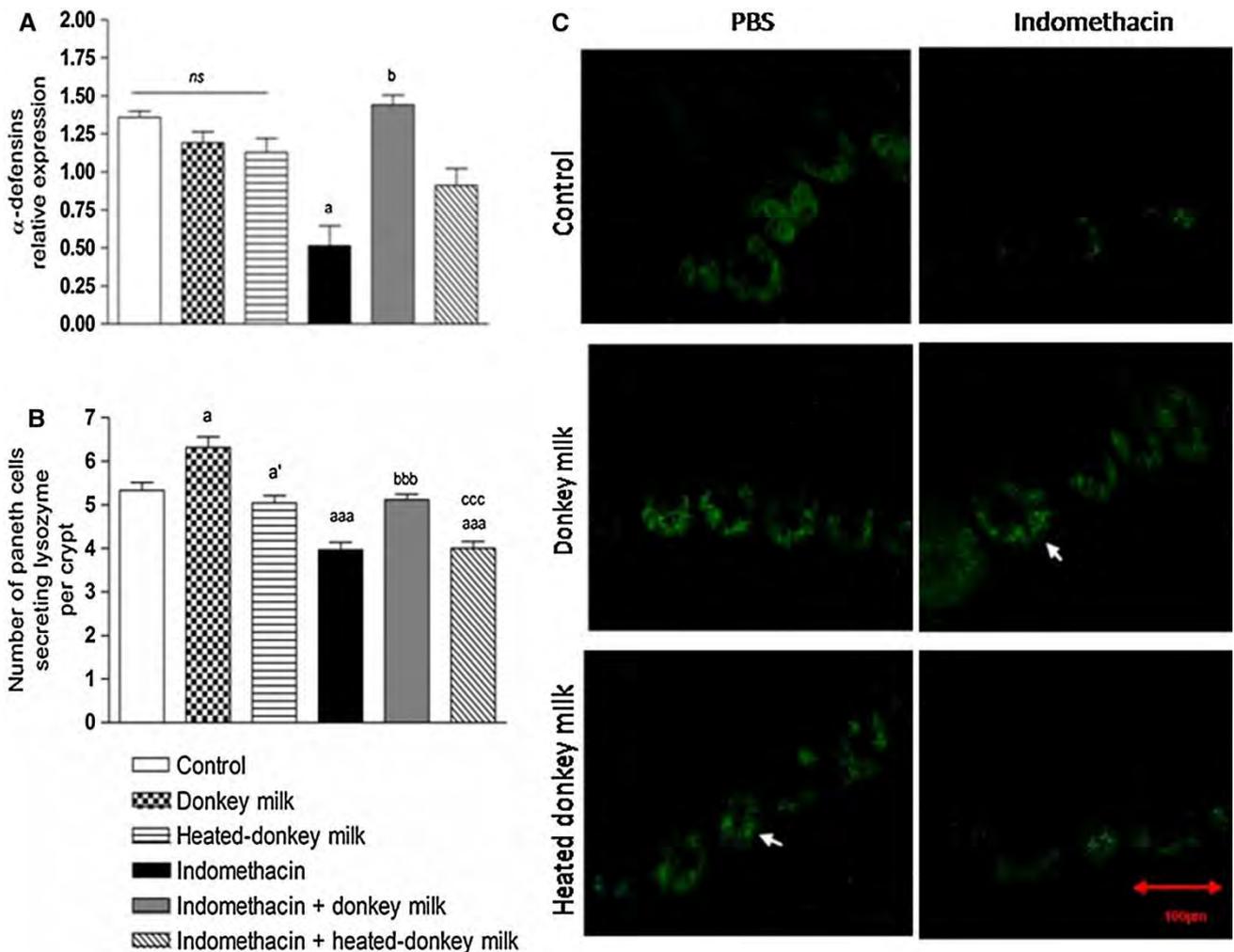


Fig. 3 Effect of donkey milk treatment on antimicrobial peptides. **a** Relative expression of α -defensins by qPCR. **b** Number of Paneth cells secreting lysozyme per crypt. **c** Lysozyme immunostaining (green) in Paneth cells of mice according to treatments. The arrows are pointing lysozyme in Paneth cells. Values are expressed by mean ± SEMs, $n = 12$. *ns* non significantly different; $p > 0.05$. *a, aa, aaa* = $p < 0.05, 0.01, 0.001$, respectively, vs Control. *a'* $p < 0.05$ vs Donkey milk. *b, bb, bbb* $p < 0.05, 0.01, 0.001$, respectively, vs Indomethacin. *c, cc, ccc* $p < 0.05, 0.01, 0.001$, respectively, vs Indomethacin + Donkey milk

Effect of donkey milk treatment on lysozyme activity contained both in ileal luminal content and in fecal pellets

In basal conditions, no impact of the different treatments applied (PBS, DM or heated DM) was observed on lysozyme activity recovered both in ileal luminal contents and in fecal materials (Fig. 4a, b). Indomethacin administration significantly decreased ($p < 0.01$) lysozyme activity in the feces compared with control mice (PBS) (Fig. 4c). In mice submitted to ileitis and treated with DM, a higher significant lysozyme activity was assessed both in luminal ileal content as well as in fecal material compared with

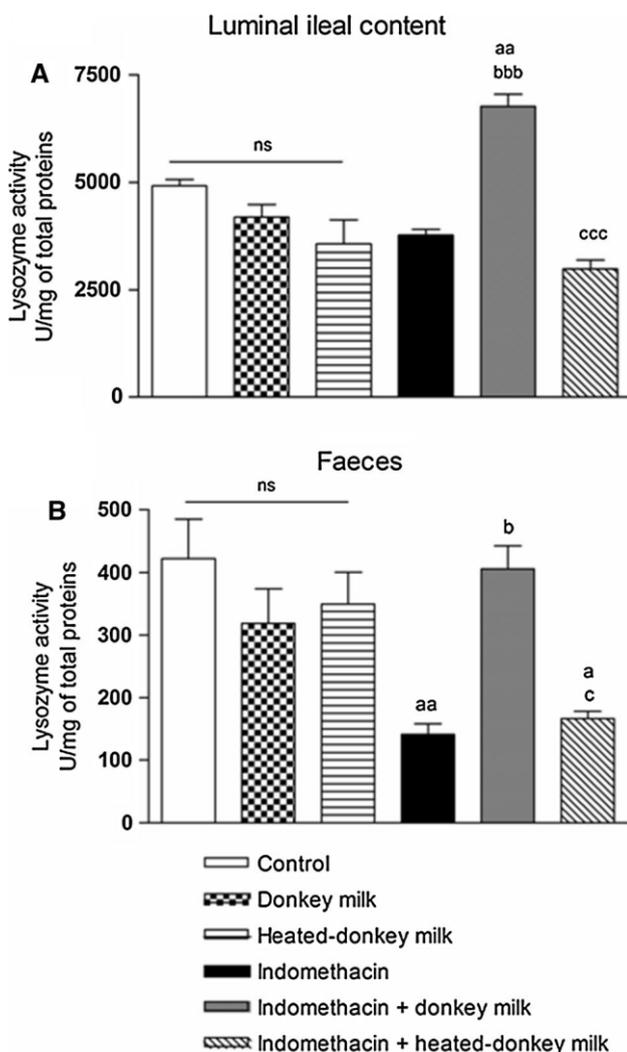


Fig. 4 Effect of donkey milk treatment on lysozyme activity in **a** ileal luminal content and **b** feces, expressed per mg of total proteins. Values are expressed by mean \pm SEMs, $n = 12$. *ns* nonsignificantly different: $p > 0.05$. *a*, *aa*, *aaa* $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 , respectively, vs Control. *b*, *bb*, *bbb* $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 , respectively, vs Indomethacin. *c*, *cc*, *ccc* $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 , respectively, vs Indomethacin + Donkey milk

animals treated with indomethacin. The exogenous oral supply by heated DM had no impact on ileal and fecal lysozyme activity decrease induced by indomethacin, i.e., similar values with indomethacin group were observed.

Effect of Donkey milk on dysbiosis observed in ileitis mice

In basal condition, DM treatment had no significant impact on the fecal microbiota profile compared to control group (Fig. 5a and Supplemental Fig. 1). In contrast, Indomethacin induced a significant variation of fecal targeted microbial communities compared to control animals (Fig. 5a and Supplemental Fig. 2). On the dimension 2 of the score plot that represents 17.76 % of the total variance, treatment conditions of mice explained 26 % of variability of the individual coordinates on this dimension ($\eta^2 = 0.22$; $p = 0.02$), and only the coordinate of indomethacin group was statistically different from the others ($p = 0.006$). Interestingly, DM administration to indomethacin-treated mice led to a partial migration of individuals from right to left along dimension 2 compared to indomethacin-treated mice (Fig. 5a). The loading plot indicated that *Clostridium* cluster XIVa was the bacterial community the most negatively correlated with dimension 2 (correlation = -0.76 , $p = 4.7e^{-8}$), whereas *Akkermansia muciniphila* and *Enterococcus spp.* were the two species the most positively correlated with this dimension (correlation = 0.55 , $p = 4.88e^{-4}$) (Fig. 5b–d). Regarding their respective relative abundance, increase in *A. muciniphila* abundance that resulted from the indomethacin treatment ($p < 0.001$) was completely reversed by administration of DM ($p < 0.05$) (Fig. 5c and Supplemental Fig. 3). Similarly, the decrease in abundance of *Clostridium* cluster XIVa resulting from the indomethacin treatment ($p < 0.01$) was limited by DM administration, whereas bacteria belonging to this cluster such as *C. coccooides* and *Eubacterium rectale* were not affected by DM in basal conditions (Fig. 5e and Supplemental Fig. 3).

Discussion

Crohn’s disease is a chronic inflammatory bowel disease occurring most commonly in the ileum [39]. The pathogenesis of CD is partially attributed to an intestinal microbiota imbalance that mediates and/or participates in immune-mediated intestinal inflammation in genetically predisposed subjects [40]. Nowadays, therapeutic strategies are focused on maintaining or inducing clinical remission via modification of the intestinal bacteria using antibiotics, probiotics, prebiotics, a diet or a combination of all these approaches [22]. In this study, we show that a chronic oral intervention with a natural food matrix containing high levels of

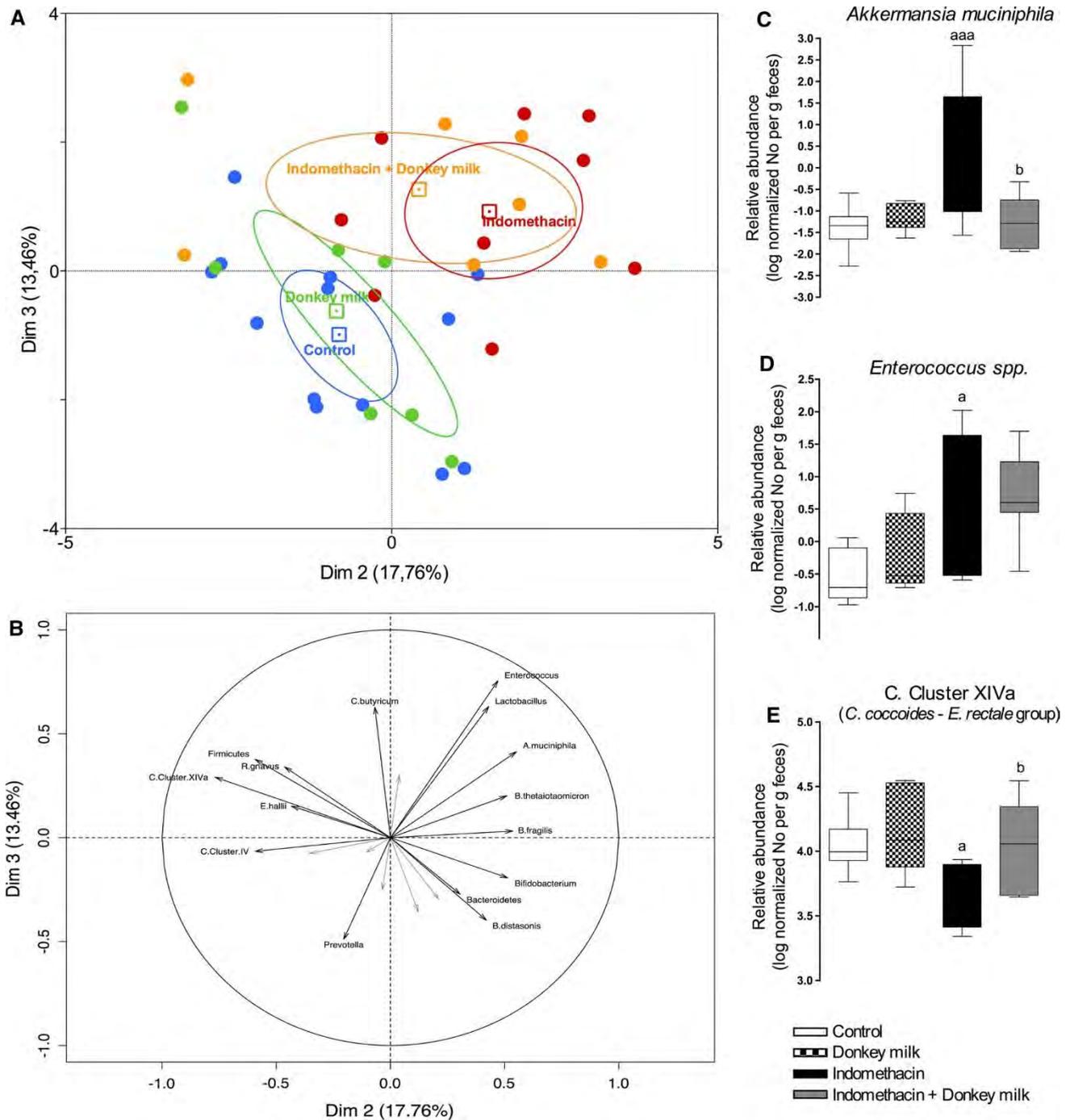


Fig. 5 Effect of donkey milk treatment on fecal microbiota. **a** Principal component analysis (PCA) of microbial communities, score plot. **b** Loading plot. Relative abundance of **c** *Akkermansia muciniphila*, **d** *Enterococcus* spp., **e** *Clostridium cluster XIVa*. Values are expressed by box plots, control $n = 13$, donkey milk $n = 7$, indomethacin $n = 9$ and indomethacin + donkey milk $n = 7$. ns nonsignificantly different: $p > 0.05$. a, aa, aaa $p < 0.05, 0.01, 0.001$, respectively, vs Control. b, bb, bbb $p < 0.05, 0.01, 0.001$, respectively, vs Indomethacin

lysozyme, i.e., donkey milk exerts anti-inflammatory properties in a mouse model of ileitis. This effect is associated with a normalization of antimicrobial peptides (lysozyme and α -defensin) levels contained in Paneth's cells as well as a reduction in the dysbiosis associated with ileitis.

Several nutritional components are able to modify metabolic homeostasis and inflammatory state [41, 42]. Linked to its physicochemical properties and its nutritional value, donkey milk (DM) has recently been suggested as a healthy dietary factor for infants, adults and elderly [26, 43–45].

This food matrix is low in fat but high in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [46], contains high levels of growth factors [47]. It also hosts *Lactobacillus plantarum* that can be considered a probiotic strain [48]. Interestingly, DM also presents high levels in antimicrobial peptides similar to those contained in human milk e.g., lactoferrin (2 g/L) and lysozyme (1–4 g/L) [26, 45]. Therefore, in the present study, anti-inflammatory properties of DM were evaluated after a chronic daily oral administration at a constant enzymatic activity of lysozyme (11800 UI/mice). This activity of lysozyme was contained in a total volume of 0.4 mL (0.2 mL twice daily) and considered relevant, since it corresponds to the equivalent of a daily drinking glass of milk for human (100 mL) [49].

Short-term medication with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as indomethacin medication causes a variety of damage to the small intestine, including bleeding, ulcerations and perforations [50, 51]. Further, NSAIDs induce no damage in the small intestine in germ-free rats [52] as well as in animals treated with antibiotics for Enterobacteria suppression [53]. In humans, these observations are largely corroborated, since luminal factors such as bacteria are well described to interact with NSAID to promote an increase in intestinal permeability, a key indicator in NSAID-induced intestinal injury of the distal part of the intestine [54, 55]. Moreover, ingestion of NSAIDs is known to be involved in clinical IBD risk relapse [56]. In mice, oral administration of high dose of indomethacin (1 mg/mouse/day for 3 days) induces ileal inflammation via alteration of the intestinal microbiome mimicking conditions seen in chronic and relapsing CD [33]. In our study, we demonstrate that oral treatment with a lower dose of indomethacin (0.25 mg/mouse for 5 days) also promotes ileitis in mice. A drop of body weight, reduction in the length of the small intestine, as well as a drastic increase in fecal lipocalin-2 and both macroscopic and microscopic damage scores characterizes this inflammatory state. Our study shows that oral DM treatment prevented all these ileitis parameters. As described before, DM is a complex matrix containing several mediators such as interferon γ (IFN γ), lysozyme, lactoferrin, TGF- β and even lactic flora which can participate synergistically in the anti-inflammatory properties of DM. For instance, IFN γ is known to stimulate the antimicrobial activity of macrophages, cytotoxic T cells and natural killer cells (NK) cells [57]. Lactoferrin also contributes to the antibacterial and anti-tumoral properties of DM [44]. *Lactobacillus plantarum* found in DM was recently described to produce bacteriocins promoting bactericidal effects on different strains e.g., *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus faecium*, in vitro [48]. Moreover, the lactic flora present in DM plays an anti-inflammatory role through release of nitric oxide [43]. In a previous study, we demonstrated the

anti-inflammatory effect of *Lactobacillus farciminis* on a model of colitis induced by TNBS in rats, via the endogenous production of NO by this probiotic strain [58]. Herein, to counteract the enzymatic activity of lysozyme, heated DM (140 °C at pH = 9.5 during 40 mn) was used. Interestingly, heated DM had no impact on the ileitis induced by indomethacin. However, we cannot rule out that the heat treatment applied for degradation of lysozyme has an effect on the other biocompounds contained in DM, and we speculate that the anti-inflammatory effect of DM is linked to a reduction in the antimicrobial properties of DM mediated by lysozyme (1–4 g/L) which reduces dysbiosis. For a long time, lysozyme, a small enzyme, was only known for its antimicrobial activity against Gram-positive bacteria due to its muramidase activity. However, several studies suggest other mechanisms of action against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, such as perturbation of DNA or RNA synthesis and membrane permeabilization [59–61].

Therefore, we investigated the effect of DM on the fecal microbiota profile in our model. In basal conditions, compared to control animals, treatment with DM has no effect on the targeted microbial populations which we analyzed. We did observe a clear dysbiosis in indomethacin-induced ileitis. This dysbiosis is illustrated by a reduction in the Firmicutes *Clostridium coccooides* and both a significant increase in *Enterococcus* spp and *Akkermansia muciniphila* in the feces of ileitis mice. Both a decrease in Firmicutes as well as a significant increase in *Enterococci* are reported in fecal material coming from CD patients compared to healthy subjects [62–64]. Concerning *Akkermansia muciniphila* only few data make a link between this microorganism and intestinal inflammation. Ganesh and collaborators show that commensal *A. muciniphila* exacerbates *S. typhimurium*-induced intestinal inflammation [65]. IBD often causes increased mucus content in feces. *A. muciniphila* is known to exert mucolytic properties in vitro [66] and to be involved in “a positive feedback loop” by stimulating mucus renewal [67]. Healthy colonocytes produce a mucus layer rich in O-acetylated sialic acids [68]. In contrast, colonic mucin from UC patients is characterized by reduced sulfatation and changes in the degree of mucin glycosylation [69]. Recently, an increased binding capacity of *A. muciniphila* to mucin from UC patients has been shown compared to healthy mucin [70]. Although the chemical changes to mucin were not evaluated in this study, the data reported below allow us to suggest a modulation of the composition of mucus in our ileitis model leading to an increased ability of *A. muciniphila* to bind to this mucus. Interestingly, we show that a chronic treatment with DM in part normalizes both Firmicutes *Clostridium coccooides* and *A. muciniphila* populations in fecal material of ileitis mice, partly counteracting the dysbiosis caused by ileitis. These data suggest that the improvement in symptoms of ileitis

observed after oral DM intervention may be related to the restoration of a healthy microbiome.

Concomitantly, in our model of ileitis, we found a significant reduction in endogenous antimicrobial peptides contained in Paneth cells illustrated by a 55 % reduction on mRNA expression of α -defensins and lysozyme levels without affecting Paneth cell numbers present in the ileal crypt versus control. Paneth cells play a crucial role in mucosal defense and were shown to be functionally impaired in IBD, particularly in patients with CD [21, 71]. For example, compared to healthy subjects, a decreased expression of α -defensin 5 and 6 in ileal Paneth cells from CD patients has been described [19, 20, 72]. Moreover, in a model of ileitis, a significant loss of lysozyme in the base of ileal crypts of SPF-TNF^{delta}ARE mice was recently described, while number of UEA-1 positive cells remained the same [6]. Taken together, these data illustrate that in our model, indomethacin-driven ileitis is mediated by a reduction in Paneth cell function rather than number. In our model, DM treatment restored the expression of α -defensins and lysozyme levels in Paneth cells in ileitis mice to physiological levels. These results suggest that DM consumption leads to a restoration of the functionality of Paneth cells. In physiological conditions, antimicrobial peptides produced by Paneth cells are released into the intestinal lumen where they play a central role in the regulation of the intestinal microbiome [73]. Interestingly, in our study we demonstrate that DM treatments in basal condition significantly increase lysozyme levels contained in Paneth cells. However, compared with control no difference in basal condition was observed in lysozyme activity in both ileal luminal contents and in fecal materials (Fig. 4). Taken together, all these data suggest that in physiological conditions, oral DM treatment enhances the intestinal innate immunity representing by increased storage of lysozyme in Paneth cells. By this way, DM may reinforce host defense against intestinal inflammation such as ileitis. Indeed, we show that DM treatment increases the activity of lysozyme both in ileal luminal content and in feces of ileitis mice. In contrast, heated DM fails to reverse the defect of Paneth cell functionality observed in ileitis animals and promotes a decrease in lysozyme activity in ileal luminal content and in fecal material. Even if we cannot exclude a direct effect of the lysozyme activity coming from DM, all these results indicate a better functionality of Paneth cells, suggesting that DM can reinforce Paneth cell-mediated innate immunity, limiting development of ileitis by counteracting the imbalance of intestinal microbiota.

In summary, consistent with the therapeutic modification of the intestinal microbiota as a new strategy for maintaining or inducing clinical remission in CD patients [22], this study allows to propose donkey milk as a helpful dietary intervention used to maintain/extend the remission

periods in CD patients by restoring the endogenous levels of lysozyme and α -defensins in Paneth's cells which in turn contributes to reducing dysbiosis related to ileitis.

Acknowledgments: The authors acknowledge “Les Ânes d’Autan” and “La ferme du Hitton” for providing donkey milk. This work was supported by Ecole d’Ingénieurs de PURPAN (Toulouse, France) and Institut National Ânes et Mulets (Paris, France).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Sophie Yvon, Maïwenn Olier, Mathilde Leveque, Gwenaelle Jard, Helene Tormo, Djamilia Ali Haimoud-Lekhal, Magali Peter, Hélène Eutamène have no conflict of interest.

References

1. Radford-Smith G, Pandeya N (2006) Associations between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn's disease-Are we there yet? *World J Gastroenterol* 12:7097
2. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ, Practice Parameters Committee of American College of Gastroenterology (2009) Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 104(465–483):484. doi:10.1038/ajg.2008.168
3. Sartor RB (2011) Efficacy of probiotics for the management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol* 7:606
4. Korzenik JR (2007) Is Crohn's disease due to defective immunity? *Gut* 56:2–5. doi:10.1136/gut.2006.095588
5. Kamada N, Seo S-U, Chen GY, Núñez G (2013) Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 13:321–335. doi:10.1038/nri3430
6. Schaubek M, Clavel T, Calasan J et al (2015) Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2015-309333
7. Hold GL (2014) Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol* 20:1192. doi:10.3748/wjg.v20.i5.1192
8. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M (2002) Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* 37:1034–1041
9. Scanlan PD, Shanahan F, O'Mahony C, Marchesi JR (2006) Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 44:3980–3988. doi:10.1128/JCM.00312-06
10. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E et al (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55:205–211. doi:10.1136/gut.2005.073817
11. Sokol H, Seksik P, Furet JP et al (2009) Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 15:1183–1189. doi:10.1002/ibd.20903
12. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vanechoutte M, Doerffel Y (2008) Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis* 14:147–161. doi:10.1002/ibd.20330
13. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L et al (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients.

- Proc Natl Acad Sci USA 105:16731–16736. doi:[10.1073/pnas.0804812105](https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105)
14. Salzman NH, Bevins CL (2013) Dysbiosis—a consequence of Paneth cell dysfunction. *Semin Immunol* 25:334–341. doi:[10.1016/j.smim.2013.09.006](https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.006)
 15. Menendez A, Willing BP, Montero M et al (2013) Bacterial stimulation of the TLR-MyD88 pathway modulates the homeostatic expression of ileal Paneth cell α -defensins. *J Innate Immun* 5:39–49. doi:[10.1159/000341630](https://doi.org/10.1159/000341630)
 16. Salzman NH (2010) Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* 1:401–406. doi:[10.4161/gmic.1.6.14076](https://doi.org/10.4161/gmic.1.6.14076)
 17. Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM (2010) Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 135:1–11. doi:[10.1016/j.clim.2009.12.004](https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.12.004)
 18. Jäger S, Stange EF, Wehkamp J (2010) Antimicrobial peptides in gastrointestinal inflammation. *Int J Inflamm* 2010:1–11. doi:[10.4061/2010/910283](https://doi.org/10.4061/2010/910283)
 19. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E et al (2005) Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18129–18134
 20. Wehkamp J, Wang G, Kübler I et al (2007) The Paneth cell α -defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 179:3109–3118
 21. Cadwell K, Patel KK, Komatsu M et al (2009) A common role for Atg16L1, Atg5, and Atg7 in small intestinal Paneth cells and Crohn disease. *Autophagy* 5:250–252. doi:[10.4161/auto.5.2.7560](https://doi.org/10.4161/auto.5.2.7560)
 22. D'Haens GR, Sartor RB, Silverberg MS et al (2014) Future directions in inflammatory bowel disease management. *J Crohns Colitis* 8:726–734. doi:[10.1016/j.crohns.2014.02.025](https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.02.025)
 23. Ren W-K, Yin J, Zhu X-P et al (2013) Glutamine on intestinal inflammation: a mechanistic perspective. *Eur J Inflamm* 11:315–326. doi:[10.1177/1721727X1301100201](https://doi.org/10.1177/1721727X1301100201)
 24. Frøslie KF, Jahnsen J, Moum BA, Vatn MH (2007) Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology* 133:412–422. doi:[10.1053/j.gastro.2007.05.051](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.051)
 25. Ren W, Chen S, Yin J et al (2014) Dietary arginine supplementation of mice alters the microbial population and activates intestinal innate immunity. *J Nutr* 144:988–995. doi:[10.3945/jn.114.192120](https://doi.org/10.3945/jn.114.192120)
 26. Guo HY, Pang K, Zhang XY et al (2007) Composition, physicochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *J Dairy Sci* 90:1635–1643. doi:[10.3168/jds.2006-600](https://doi.org/10.3168/jds.2006-600)
 27. Uniacke-Lowe T, Huppertz T, Fox PF (2010) Equine milk proteins: chemistry, structure and nutritional significance. *Int Dairy J* 20:609–629. doi:[10.1016/j.idairyj.2010.02.007](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.007)
 28. Muraro MA, Giampietro PG, Galli E (2002) Soy formulas and nonbovine milk. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89:97–101
 29. Carroccio A, Cavataio F, Montalto G et al (2000) Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clin Exp Allergy* 30:1597–1603
 30. Tidona F, Sekse C, Criscione A et al (2011) Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *Int Dairy J* 21:158–165. doi:[10.1016/j.idairyj.2010.10.008](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.10.008)
 31. Zhang X-Y, Zhao L, Jiang L et al (2008) The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control* 19:1191–1195. doi:[10.1016/j.foodcont.2008.01.005](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.005)
 32. Mao X, Gu J, Sun Y et al (2009) Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. *Int Dairy J* 19:703–708. doi:[10.1016/j.idairyj.2009.05.007](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.05.007)
 33. Craven M, Egan CE, Dowd SE et al (2012) Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn's Disease. *PLoS One* 7:e41594. doi:[10.1371/journal.pone.0041594](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041594)
 34. Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL (1989) Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 96:29–36
 35. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML et al (1993) The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 28:155–162
 36. Chassaing B, Srinivasan G, Delgado MA et al (2012) Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One* 7:e44328. doi:[10.1371/journal.pone.0044328](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044328)
 37. Bergström A, Licht TR, Wilcks A et al (2012) Introducing Gut low-density array (GULDA)—a validated approach for qPCR-based intestinal microbial community analysis. *FEMS Microbiol Lett* 337:38–47. doi:[10.1111/1574-6968.12004](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12004)
 38. Bergstrom A, Skov TH, Bahl MI et al (2014) Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of danish infants. *Appl Environ Microbiol* 80:2889–2900. doi:[10.1128/AEM.00342-14](https://doi.org/10.1128/AEM.00342-14)
 39. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH (2002) Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 15:79–94
 40. Danese S, Fiocchi C (2006) Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 12:4807–4812
 41. Hotamisligil GS, Erbay E (2008) Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol* 8:923–934. doi:[10.1038/nri2449](https://doi.org/10.1038/nri2449)
 42. Trinchese G, Cavaliere G, Canani RB et al (2015) Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *J Nutr Biochem*. doi:[10.1016/j.jnutbio.2015.05.003](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.05.003)
 43. Tafaro A, Magrone T, Jirillo F et al (2007) Immunological properties of donkey's milk: its potential use in the prevention of atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 13:3711–3717
 44. Jirillo F, Jirillo E, Magrone T (2010) Donkey's and goat's milk consumption and benefits to human health with special reference to the inflammatory status. *Curr Pharm Des* 16:859–863
 45. Salimei E, Fantuz F (2012) Equid milk for human consumption. *Int Dairy J* 24:130–142. doi:[10.1016/j.idairyj.2011.11.008](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.11.008)
 46. Gastaldi D, Bertino E, Monti G et al (2010) Donkey's milk detailed lipid composition. *Front Biosci E* 2:537–546
 47. Brumini D, Criscione A, Bordonaro S et al (2015) Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. *Dairy Sci Technol*. doi:[10.1007/s13594-015-0246-1](https://doi.org/10.1007/s13594-015-0246-1)
 48. Murua A, Todorov SD, Vieira ADS et al (2013) Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of *Lactobacillus plantarum* with potential beneficial properties from donkey milk. *J Appl Microbiol* 114:1793–1809. doi:[10.1111/jam.12190](https://doi.org/10.1111/jam.12190)
 49. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22:659–661. doi:[10.1096/fj.07-9574LSF](https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF)
 50. Morris AJ, Madhok R, Sturrock RD et al (1991) Enteroscopic diagnosis of small bowel ulceration in patients receiving non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet Lond Engl* 337:520
 51. Fujimori S, Seo T, Gudis K et al (2007) Diagnosis and treatment of obscure gastrointestinal bleeding using combined capsule endoscopy and double balloon endoscopy: 1-year follow-up study. *Endoscopy* 39:1053–1058. doi:[10.1055/s-2007-967014](https://doi.org/10.1055/s-2007-967014)

52. Robert A, Asano T (1977) Resistance of germfree rats to indo- methacin-induced intestinal lesions. *Prostaglandins* 14:333–341
53. Konaka A, Kato S, Tanaka A et al (1999) Roles of enterobacte- ria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin- induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol Res* 40:517–524. doi:[10.1006/phrs.1999.0550](https://doi.org/10.1006/phrs.1999.0550)
54. Bjarnason I, Williams P, So A et al (1984) Intestinal permeability and inflammation in rheumatoid arthritis: effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet Lond Engl* 2:1171–1174
55. Fujimori S, Gudis K, Takahashi Y et al (2010) Distribu- tion of small intestinal mucosal injuries as a result of NSAID administration. *Eur J Clin Invest* 40:504–510. doi:[10.1111/j.1365-2362.2010.02290.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02290.x)
56. Takeuchi K, Smale S, Premchand P et al (2006) Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:196–202
57. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon- gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163–189. doi:[10.1189/jlb.0603252](https://doi.org/10.1189/jlb.0603252)
58. Lamine F, Fioramonti J, Bueno L et al (2004) Nitric oxide released by *Lactobacillus farciminis* improves TNBS-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 39:37–45
59. Derde M, Nau F, Lechevalier V et al (2015) Native lysozyme and dry-heated lysozyme interactions with membrane lipid monolayers: lateral reorganization of LPS monolayer, model of the *Escherichia coli* outer membrane. *Biochim Biophys Acta* 1848:174–183. doi:[10.1016/j.bbamem.2014.10.026](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.026)
60. Ellison RT, Giehl TJ (1991) Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* 88:1080–1091
61. Ibrahim HR, Kato A, Kobayashi K (1991) Antimicrobial effects of lysozyme against gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid. *J Agric Food Chem* 39:2077–2082. doi:[10.1021/jf00011a039](https://doi.org/10.1021/jf00011a039)
62. Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L et al (2006) Specifi- cities of the fecal microbiota in inflammatory bowel dis- ease. *Inflamm Bowel Dis* 12:106–111. doi:[10.1097/01.MIB.0000200323.38139.c6](https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000200323.38139.c6)
63. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J et al (2010) A pyrosequenc- ing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenter- ology* 139(1844–1854):e1. doi:[10.1053/j.gastro.2010.08.049](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.049)
64. Rajca S, Grondin V, Louis E et al (2014) Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20:978–986. doi:[10.1097/MIB.0000000000000036](https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000036)
65. Ganesh BP, Klopffleisch R, Loh G, Blaut M (2013) Commen- sal *Akkermansia muciniphila* exacerbates gut inflammation in salmonella typhimurium-infected gnotobiotic mice. *PLoS One* 8:e74963. doi:[10.1371/journal.pone.0074963](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074963)
66. Derrien M, Van Baarlen P, Hooiveld G et al (2011) Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol* 2:166. doi:[10.3389/fmicb.2011.00166](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00166)
67. Belzer C, de Vos WM (2012) Microbes inside—from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *ISME J* 6:1449–1458. doi:[10.1038/ismej.2012.6](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.6)
68. Klein A, Roussel P (1998) O-acetylation of sialic acids. *Bio- chimie* 80:49–57
69. Larsson JMH, Karlsson H, Crespo JG et al (2011) Altered O-gly- cosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 17:2299–2307. doi:[10.1002/ibd.21625](https://doi.org/10.1002/ibd.21625)
70. Earley H, Lennon G, Balfe A et al (2015) A preliminary study examining the binding capacity of *akkermansia muciniphila* and *desulfovibrio* spp., to Cölonic mucin in health and ulcerative colitis. *PLoS One* 10:e0135280. doi:[10.1371/journal.pone.0135280](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135280)
71. Wehkamp J, Koslowski M, Wang G, Stange EF (2008) Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intes- tinal and cölonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol* 1(Suppl 1):S67–S74. doi:[10.1038/mi.2008.48](https://doi.org/10.1038/mi.2008.48)
72. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD et al (2008) Reduced -defen- sin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 57:903–910. doi:[10.1136/gut.2007.142588](https://doi.org/10.1136/gut.2007.142588)
73. Muniz LR, Knosp C, Yeretssian G (2012) Intestinal antimicro- bial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front Immunol*. doi:[10.3389/fimmu.2012.00310](https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00310)

RESULTAT II

La fraction du lait d'ânesse contenant l'activité enzymatique du lysozyme est responsable de la réduction de l'hyperperméabilité et de l'hypersensibilité viscérale induite par un stress chronique chez la souris : un effet médié par un effet bifidogène et la normalisation des niveaux de peptides antimicrobiens dans les cellules de Paneth.

Sophie Yvon, Valérie Bézirard, Mathilde Levêque, Carine Froment, Julien Marcoux, Odile Schiltz, Gwenaëlle Jard, Asma Zened², Djamila Ali Haimoud-Lekhal, Maïwenn Olier, Magali Peter, Helene Eutamene

Article en préparation.

Contexte et objectifs : Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est un trouble gastro-intestinal fonctionnel caractérisé par une douleur viscérale corrélée à une augmentation de la perméabilité intestinale, une inflammation de la muqueuse de bas grade, une dysbiose ainsi qu'une augmentation de l'activité des protéases luminales. Les événements stressants de la vie sont décrits pour développer et exacerber les symptômes du SII. Chez la souris, le stress d'évitement passif de l'eau (WAS) provoque une hyperperméabilité intestinale et une hypersensibilité viscérale semblables à celles observées chez les patients SII. Des traitements probiotiques ou des interventions alimentaires spécifiques peuvent avoir des effets bénéfiques chez les patients atteints du SII. Dans ce contexte, le lait d'ânesse (DM) via sa forte teneur en peptides antimicrobiens tels que le lysozyme et la lactoferrine pourrait être une bonne alternative.

Méthodes : La fraction du lait d'ânesse contenant le lysozyme a été isolée et analysée par nanoLC-MS et MS/MS. Les souris ont été soumises à un stress chronique d'évitement passif de l'eau (WAS) et ont reçu *per os* soit de l'eau, soit du DM, soit la fraction contenant le lysozyme (LYZ fraction). Différents paramètres ont été évalués comme la sensibilité viscérale, la perméabilité intestinale, l'état micro-inflammatoire, l'activité protéasique et le profil du microbiote fécal (Figure 30).

Résultats : Un stress chronique (WAS) augmente l'hypersensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale, la perméabilité intestinale, les niveaux de lipocalin-2 fécale (reflétant l'état micro-inflammatoire) et l'activité des sérines protéases. Une diminution de l'expression du lysozyme dans les cellules de Paneth a également été observée après un WAS. Une administration chronique de DM ou de la LYZ fraction contenant le lysozyme réduit significativement l'ensemble de ces perturbations induites par le WAS.

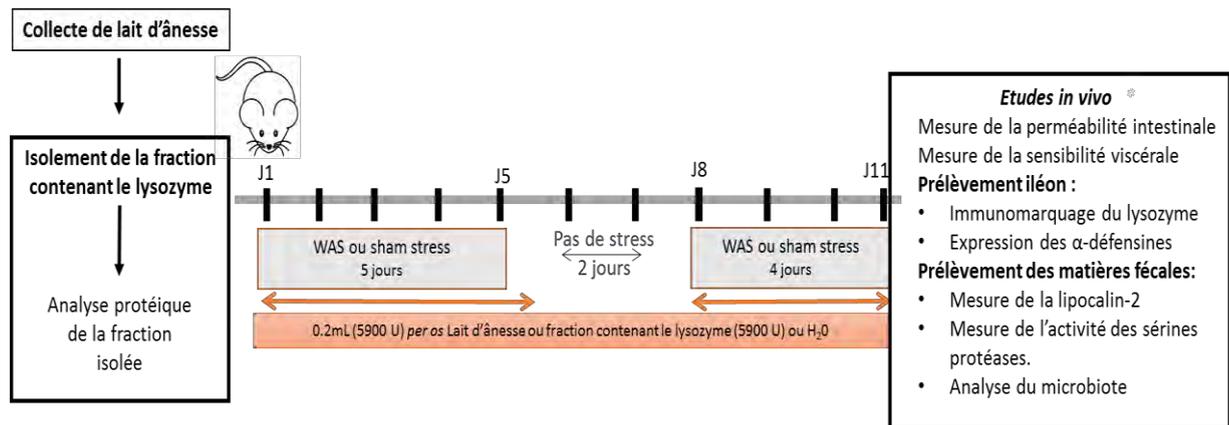


Figure 30 : Design expérimental de la deuxième étude.

Conclusions : Le lait d'ânesse, grâce à son activité enzymatique en lysozyme, atténue les altérations fonctionnelles intestinales induites par un stress chronique. L'ensemble de ces données permettent de proposer le lait d'ânesse comme une alternative thérapeutique dans le syndrome de l'intestin irritable.

Fraction of donkey milk containing lysozyme activity alleviates gut hyperpermeability and visceral hypersensitivity in a mouse model of chronic stress: a bifidogenic mediated effect which can normalizes antimicrobial levels in Paneth cells

Sophie Yvon^{1,2}, Valérie Bézirard¹, Mathilde Levêque¹, Carine Froment³, Julien Marcoux³, Odile Schiltz³, Gwenaëlle Jard², Asma Zened², Djamila Ali Haimoud-Lekhal², Maïwenn Olier¹, Magali Peter², Helene Eutamene^{1,2}.

¹UMR 1331 Toxalim INRA, INP-PURPAN, NGN group, Toulouse, France.

²Département des Sciences Agronomiques et Agroalimentaire, Université de Toulouse INP-PURPAN, Toulouse, France.

³ Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Corresponding author: Helene Eutamene PhD, UMR 1331 Toxalim INRA, INP-ENVT, INP-PURPAN, Université de Toulouse 3 Paul Sabatier, Neuro-Gastroenterology & Nutrition group, 180 chemin de Tournefeuille - BP.93173 F-31027 TOULOUSE cedex 3, France. TEL: +33 (0) 5 61 28 57 55. Email: helene.eutamene@inra.fr

Abbreviations: AMPs: antimicrobial peptides; DM: donkey milk; LYZ fraction: fraction containing lysozyme; PC: Paneth cells; LC: liquid chromatography; MS: mass spectrometry; CID: collision-induced dissociation

Keywords: Donkey milk; Gut mucosa; Lysozyme; Stress, Proteomics

Acknowledgments: The authors thank Valérie Tondereau, Catherine Beaufrand, Cherryl Harkat, Fanny Placide and Marie Locard for their technical assistance. The authors thank “Institut National Âne et Mulet” and “Ecole d’Ingénieurs de Purpan” for their financial supports.

Journal:

ABSTRACT

Scope: Irritable bowel syndrome (IBS) is a functional gastrointestinal disorder characterized by visceral pain correlated with an increase of gut permeability, a low-grade mucosal inflammation, a dysbiosis as well as an increase of luminal protease activity. Stressful life events trigger IBS symptoms. In mice, passive water avoidance stress (WAS) promotes gut hyperpermeability and visceral hypersensitivity. Specific dietary interventions may have beneficial effects in IBS patients. Donkey milk (DM) has important nutritional properties for humans linked to its similar composition to human milk and its high levels of antimicrobial peptides such as lysozyme.

Methods and Results: Mice were submitted during 9 days to a sham stress (control group) or to a WAS and received per os DM or DM fraction containing lysozyme (LYZ fraction, confirmed by nanoLC-MS and MS/MS) or water. Compared to sham stress, WAS significantly increased visceral sensitivity, gut permeability, fecal lipocalin-2 levels and fecal serine proteases activity. Moreover, WAS is associated with a decreased lysozyme expression in Paneth cells (PC). A chronic administration of DM or LYZ fraction exert a gut bifidogenic effect and significantly alleviates gut injuries induced by WAS.

Conclusions: DM given as a supplementary diet as well as LYZ fraction with high enzymatic activity alleviates WAS-induced gut alterations via a bifidogenic effect. These data suggest that dietary interventions with DM containing a significant activity of lysozyme could be a good strategy in the treatment of IBS.

1. Introduction

Irritable bowel syndrome (IBS) is a functional gastrointestinal disorder characterized by visceral pain correlated with an alteration of the gut-microbiota-brain axis and affects on average of 11% of the worldwide population [1]. In IBS patients, disturbances of the intestinal barrier is translated by an increase of gut permeability, a low-grade mucosal inflammation, a dysbiosis as well as an increase of luminal protease activity [2]. Nowadays, there is growing consensus that the ultimate strategy of IBS management is to improve the quality of life and to reduce gut painful episodes [3, 4]. The etiology of IBS remains unclear, but multifactorial factors were highlighted [2]. Among these factors, stressful life events trigger IBS symptoms [5, 6]. In rodents, passive water avoidance stress (WAS) promotes gut hyperpermeability and visceral sensitivity [7]. Gut microbiota interferes with normal intestinal functions at various levels, acting as a cause and/or a target of abnormalities of intestinal motility, sensitivity, neuroimmune signaling and is associated with gut mucosal barrier dysfunctions [8]. Recently, perturbations of the intestinal microbiota (dysbiosis) have being described in fecal material coming from IBS patients [9] with a composition which differs between the different subgroups of IBS patients and the healthy individuals [10, 11]. Among these modifications, a decreased amount of *Bifidobacteria* [12] with an increased amount of sulfate-reducing bacteria in IBS patients vs. healthy subjects were described [13]. In mice, as in Humans, Paneth cells (PC) located at the bottom of intestinal crypts, produce various antimicrobial peptides (AMPs) such as α -defensins or lysozyme [14–16]. These AMPs act as innate immuno-modulators leading to the protection against pathogenic invasion and in turn allow to control gut homeostasis by regulating microbiota profile in the intestine [17]. To our knowledge, no alterations in the production of AMPs in gut IBS patients have never been demonstrated. Nevertheless, in a relevant chronic stress of maternal separation model mimicking IBS physiopathology, a reduction of the expression of the lysozyme in PC in mice was described [18]. Beside, in diarrheic IBS patients, an increase of fecal serine proteases activity is associated with colonic permeability and sensitivity modifications [19–21]. Even if, the source of serine proteases is under debate, a microbiota origin seems to be widely admitted [19, 21].

Therapeutic manipulation of intestinal microbiota can target selective beneficial bacteria species vs detrimental species. These new strategies of microbiome manipulations are on the light and may involve antibiotics, probiotics, prebiotics and specific diets interventions [22]. In this way, among natural food matrices, donkey milk (DM) presents high antimicrobial peptides rate and seems potentially a good candidate for reducing gut damage. DM has important nutritional properties for humans linked to its similar composition to human milk [23, 24]. DM is mainly used for infant nutrition as a natural substitute milk when breast-feeding is contraindicated or to replace bovine milk in diet of patients with cows' milk protein allergy [25–27]. Especially, DM contains high levels of lysozyme and lactoferrin (15% and 5% of the total proteins, respectively) that confer its antibacterial properties [28]. Further, anti-tumoral and anti-proliferative effects on A549 human lung cancer cells depending on lysozyme fraction from DM have also been described [29]. DM administration in rats induces metabolic benefits like a decrease of gut mucosal pro-inflammatory signals (TNF- α , interleukin-1 and lipopolysaccharide levels), an increase of antioxidants (total thiols) levels and of detoxifying enzyme activities (glutathione-S-transferase, NADH quinone oxidoreductase) [30]. Moreover, these beneficial metabolic effects are related to the modulation of gut microbiota in rats [30]. A consumption of DM in a murine model of ileitis exerts anti-inflammatory properties by normalizing levels of endogenous AMPs in PC and also contribute to reduce the dysbiosis related to the inflammation [31].

Therefore, the objectives of this study were to 1) evaluate in a mouse model of WAS, the impact of DM dietary interventions administered at a constant lysozyme activity on gut damages functions (gut permeability and visceral sensitivity) as well as on gut microbiota profile and inflammatory status; 2) to split DM in different fractions to obtain a fraction of whey proteins containing high activity of lysozyme; 3) to check if similar beneficial effects as obtained with raw DM could be observed using LYZ fraction oral treatments.

2. Material & Methods

2.1 Donkey milk

Fresh donkey milks were collected at “La ferme du Hitton” (Biran, France). Immediately after milking, samples were kept in an icebox (<4°C) and stored at -20°C until lysozyme activity measurements. The enzymatic activity was assessed using an Enzcheck Lysozyme Assay Kit (Molecular Probes E-22013, Thermo Fisher Scientific).

2.2 Lysozyme Fraction

2.2.1 Preparation

Fresh milk was centrifuged at 3000 x g for 30min at 15°C to obtain skimmed milk. Whole casein of DM was removed from skimmed milk by adjusting the pH to 4.6 (the iso-electric point of casein), and after centrifugation at 3000 x g for 10 min, we obtained a supernatant of whey proteins. The whey fraction was successively passed through 30 kDa and 10 kDa cut-off ultrafiltration membranes to isolate the lysozyme (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, Merck Millipore, USA). The fraction between 10 and 30 kDa will be called LYZ fraction.

2.2.2 Intact protein nanoLC-MS analysis

To determine the protein species present in the LYZ fraction, an intact protein nanoLC-MS analysis was firstly performed on an Ultimate 3000 RSLCnano LC system (Thermo Scientific Dionex) coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany). 5 µL of the LYZ fraction at 400 nM (i.e. 2 pmoles) were loaded on a 300µm ID x 5mm reverse-phase C4 precolumn (ThermoFisher, Dionex) at 20 µL/min in 2% acetonitrile and 0.05% TFA. After 3 min of desalting, proteins were online separated on a 75 µm ID x 15 cm C4 column (in-house packed with C4 Reprosil) equilibrated in 95% of buffer A (0.2% formic acid), with a gradient of 5% to 40% of buffer B (80% acetonitrile, 0.2% formic acid) for 5 min and then from 40% to 99% solvent B for 33 min at a flow rate of 300 nL/min. The LTQ-Orbitrap Velos was operated in single MS mode with the XCalibur™ software (version 2.0 SR2, Thermo Fisher Scientific). MS scans were acquired in the 500–2,000 m/z mass range with the resolution set to a value of 60,000 at m/z 400. The Xcalibur raw file was processed using RoWinPro [32], a rolling-

window spectral deconvolution software, for proteoform footprint generation of the LC-MS run. The software retrieves and averages scans with a window size of 10 scans and analyzes them with the Znova deconvolution algorithm. Output files contain a list of detected species (retention time in minutes, mass in Daltons, intensity in arbitrary units) and were plotted using an in-house developed shiny app in order to visualize the result as a protein footprint map (shiny script available [here: https://github.com/mlocardpaulet/2DMappingIntactProMS_SimpleMap](https://github.com/mlocardpaulet/2DMappingIntactProMS_SimpleMap))

2.2.3 In-gel tryptic digestion, nanoLC-MS/MS analysis and database searches.

The LYZ fraction at 2 µg/µl was resuspended in 1X Laemmli sample buffer containing 25 mM DTT for reduction during 30 min at 56 ° C, then alkylated in 75 mM iodoacetamide for 30 min in the dark at room temperature. 40 µg of the reduced/alkylated LYZ fraction were loaded on a 1D SDS- polyacrylamide gel and the electrophoretic migration was stopped as soon as the protein sample entered the gel. The gel was briefly stained using Quick Coomassie Stain (Generon). A single slice containing the whole sample was excised and subjected to in-gel tryptic digestion using modified porcine trypsin (Promega, France) at 20 ng/µl as previously described [33]. The dried peptide extracts obtained were dissolved in 21 µl of 0.05% trifluoroacetic acid in 2% acetonitrile and analyzed by online nanoLC using an Ultimate 3000 RSLCnano LC system (Thermo Scientific Dionex) coupled to an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) for data-dependent CID fragmentation experiments. 5µl of the peptide extract were loaded on a 300µm ID x 5mm PepMap C18 precolumn (ThermoFisher, Dionex) at 20 µl/min in 2% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid. After 5 minutes of desalting, peptides were online separated on a 75 µm ID x 50 cm C18 column (in-house packed with Reprosil C18-AQ Pur 3 µm resin, Dr. Maisch ; Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) equilibrated in 95% of buffer A (0.2% formic acid), with a gradient of 5 to 25% of buffer B (80% acetonitrile, 0.2% formic acid) for 80min then 25% to 50% for 30 min at a flow rate of 300 nL/min. The LTQ Orbitrap Velos was operated in data-dependent acquisition mode with the XCalibur software (version 2.0 SR2, Thermo Fisher Scientific). The survey scan MS was performed in the Orbitrap on the 350–1,800 m/z mass range with the resolution set to a value of 60,000. The 20 most intense ions per survey scan were selected with an isolation width of 2 m/z for subsequent data-dependent CID fragmentation and the resulting fragments were analyzed in

the linear trap (LTQ). The normalized collision energy was set to 30%. To prevent repetitive selection of the same peptide, the dynamic exclusion duration was set to 60 s with a 10 ppm tolerance around the selected precursor and its isotopes. Monoisotopic precursor selection was turned on. For internal calibration the ion at 445.120025 m/z was used as lock mass. The Xcalibur raw file was processed with Proteome Discoverer software (version 2.1.1.21, Thermo Fischer Scientific) for database search with the Mascot search engine (version 2.6.1, Matrix Science, London, UK) combined with the exponentially modified protein abundance index (emPAI) [34]. emPAI is a simple measurement of protein abundance that is based on the number of found peptides and used for protein abundance estimation. The following parameters were set for creation of the peak list: parent ions in the mass range 300-5000 and no grouping of MS/MS scans. Peak list was searched against the *Equus asinus* taxonomy (353 sequences) of the UniProt protein database implemented with the sequences of isoforms/variants described in the literature [35–39]. Cysteine carbamidomethylation was set as a fixed modification and methionine oxidation, and protein N-terminal acetylation as variable modifications. Up to three missed trypsin/P cleavages were allowed. Mass tolerances in MS and MS/MS were set to 10 ppm and 0.8 Da, respectively. Peptide spectral matches (PSM) were validated by the target-decoy approach using a reverse database and the false discovery rate (FDR) set to 1%. With Proteome Discoverer, peptide identifications were grouped into proteins according to the law of parsimony and filtered to 1% FDR. Mascot-derived emPAI values were converted to weight fraction percentages by normalizing against the molecular weight of the protein (Mr) and the sum of all emPAI values for all proteins ($\sum(\text{emPAI})$) for obtain the Protein content (weight %) = $\text{emPAI} \times \text{Mr} / \sum(\text{emPAI} \times \text{Mr}) \times 100$.

2.3 Animals

Eight weeks-old male C57BL/6 (weighting 23 ± 0.5 g) (Janvier, Le Genest St Isle, France) were used in this study. Mice were maintained in the pathogen-free animal facility at a constant temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) on a 12/12-hour light/dark cycle. Mice had free access to water and to standard rodent food (Harlan, Global diet 2018 containing crude protein 18.6%, crude fat 6.2%, crude ash 5.3% and crude fiber 3.5%).

2.4 Experimental protocol:

Mice received oral administration of donkey milk (200 μL /day/mice) representing a daily activity of lysozyme i.e 5900 UI, or LYZ fraction with similar activity of lysozyme in an adjusted volume or vehicle (0.9% NaCl (w/v)) for 11 days. Animals were submitted between 8:00 and 12:00 am either to a sham stress or a WAS session for 1 h/day during 9 non consecutive days. Groups (6 groups, n=8/group) were designed as control (vehicle/sham stress), WAS (vehicle/stress), DM (donkey milk/sham stress), DM+WAS (donkey milk/stress), LYZ fraction (lysozyme fraction/sham stress) and LYZ fraction +WAS (lysozyme fraction/stress) groups. For the WAS session, mice were placed on a Plexiglas[®] platform (3 x 3 cm²) fixed in the center of a plastic container (40 x 60 x 30 cm³), filled with cold water or kept empty (sham stress). In order to minimize any environmental stress, animals were handled for one week prior to the experiments. After the last sham or WAS session, mice were sacrificed by decapitation and the gastrointestinal tract was aseptically removed to collect ileal sections and feces. Animal care and work protocols were approved by the local ethical committee, according to the EU directive 2010/63/EU (Agreements #Toxcom0143HE N°2016021814258245_APAFiS#4972).

2.5 Gut permeability

Isothiocyanate of fluorescein (FITC), is a small (389 Da) fluorescent molecule classically used to measure the total gut permeability [40]. The emitted fluorescence levels present in the plasma after an oral administration of free FITC is a good reflect of the gut permeability status [41]. Mice received on oral solution (250 μL) of free FITC (Sigma-Aldrich F7250, France). 3 h after FITC administration, blood sample was collected at the facial submandibular vein and centrifuged at 10000 g during 10 min. The emitted fluorescence levels present in the plasma was assessed using a TECAN fluorimeter (485 excitation/528 emission) and the obtained values were normalized by the body weight of each mice.

2.6 Visceral sensitivity measurement

A visceral painful stimulus was performed via a colorectal distension, which evokes an abdominal response as a sign of visceral sensitivity, recorded by electromyography (EMG). Under anesthesia (Xylazin and Ketamin), administered subcutaneously (sc), animals were chronically fitted with two nickel-chrome electrodes implanted in the abdominal external oblique muscle and a third in the abdominal skin. The electrodes were drawn to the back of the neck and protected by a plastic tube. Four to 6 days post-surgery, mice were placed in a plastic tunnel 1 h prior to the experiments. Distension catheters (Fogarty catheter for arterial embolectomy, 4F; Edwards Lifesciences, Nijmegen, The Netherlands) were inserted into the colon (1.5 cm from the rectum). The colorectal distension (CRD) was performed in conscious mice with progressively increasing volumes in 0.02 mL steps from 0 to 0.08 mL each step lasting 10 s with 5 min non distension periods in-between. During the distension periods, the abdominal muscle electrical activity was recorded and analyzed with a Powerlab Chart 5 program from AD instruments. Basal EMG activity was subtracted from the EMG activity registered during the periods of distension.

2.7 Quantification of Fecal Lipocalin-2 by ELISA

For quantification of Lipocalin-2 (LCN-2) by ELISA, frozen fecal samples were reconstituted in PBS and vortexed for 20 min to get a homogenous fecal suspension as described previously [42]. Then the samples were grinded using FastPrep and centrifuged for 10 min at 12.000 rpm and 4°C. Clear supernatants were collected and stored at -20°C until analysis. LCN-2 levels were measured using the Duoset murine LCN-2 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, USA).

2.8 Expression of antimicrobial peptides

2.8.1 Immunohistochemistry: Lysozyme immunostaining

Ileal samples were fixed in 4% formalin, dehydrated through graded ethanol and embedded in paraffin. Sections (5µm) were rehydrated and dipped in a bath of citrate buffer 10 mM, pH 6 at 95°C for 30 minutes, to regenerate antigens. After saturation of the non-specific binding site, sections were incubated with rabbit anti-mouse lysozyme antibody (1/100, overnight, +4°C) (Abcam, Paris, France) followed by a Alexa fluor 488-

conjugated donkey anti-rabbit IgG (0.75µg/ml, 1H, Room temperature) (Jackson, Suffolk, UK). After washing, sections were incubated with Alexa fluor 594-conjugated Wheat Germ Agglutinin (WGA) (10µg/ml, 45 min) (Invitrogen, Life Technology, Cergy Pontoise, France). The slides were rinsed with PBS, covered with mounting medium containing DAPI (P36931, Invitrogen) and examined under a Nikon 90i fluorescence microscope. Lysozyme fluorescence intensity in Paneth cells was quantified employing the software Nis-Elements Ar (Nikon, Champigny sur Marne, France) and results were expressed in fluorescence intensity per µm². Analyses were done on five crypts per animal and on eight animals from each group.

2.8.2 mRNA expression by Real-time Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR): α-defensins mRNA expression

Total mRNA was extracted from ileum segment with RNeasy mini kit. 500 ng were used to perform reverse transcription during 60 min at 37°C. The real-time PCR was performed using 25 ng of cDNA in a final volume of 20 µL containing SYBR Green TaqMan Universal PCR Mix. Fluorescence was recorded and analyzed. Analysis of the 18S ribosomal RNA was performed with the TaqMan assay kit control to normalize gene expression overall α-defensins. Specific primers were obtained from Eurogentec (Angers, France): forward, 5'-GGT-GAT-CAG-CAT-ACC-CCA-GCA-TCA-GT-3'; reverse, 5'-AAG-AGA-AAA-CTA-CTG-AGG-AGC-AGC-3' to amplify the α-defensins. To normalize our values, the reference gene 18S as: forward, 5'-GACCAW-ACA-CGG-GAA-ACC-3'; reverse, 5'-CAA-AGAATC-GCT-CCA-CCA-AC-3' has been chosen.

2.9 Measurement of fecal serine protease activity

25 mg of fecal sample was thawed, dissolved and homogenized in 500 µL of NaCl 0.9% , centrifuged (8000 g., 10 mins, +4 °C) and filtered (0.8 µm, Nalgene). To measure total fecal serine protease activity, supernatants of fecal homogenates (25 µl) were incubated with 1 mL of reaction buffer (0.15 M NaCl and 20 mM Tris-HCl, pH 8.3) and 1 mL of 0.5% (w/v) azocasein (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) at 40° C. The reaction was stopped after 20 min with 1 ml 10% (v/v) trichloroacetic acid (TCA, Sigma). Following centrifugation absorption of the clear supernatant was measured at 366 nm. Enzymatic activities of the supernatants were normalized to protein content. To determine whether protease activity was dependent

upon serine-proteases, measurements were done after pre-incubation for 30 min with selective serine protease inhibitors, AEBSF and a mixture of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and aprotinin (Sigma). Protease activity was expressed as units per milligram of protein, standardized against activity elicited by 1 U of standard trypsin.

2.10 Fecal microbial community analysis:

Genomic DNA from fecal homogenates was extracted using the ZR Fecal DNA Miniprep™ (Zymo Research) and DNA quantity was determined using TECAN Fluorometer (Qubit® dsDNA HS Assay Kit, molecular probes). The microbial 16S rRNA gene was amplified during the first PCR step with adapter fusion primers targeting the V3 to V4 regions (corresponding to a 460-bp region of *Escherichia coli* 16S rRNA gene, GenBank number J01695 with bacterial forward 343F (TACGGRAGGCAGCAG, [43]) and reverse 784R (TACCAGGGTATCTAATCCT, [44] primers). Pooled amplicon libraries were sequenced employing an Illumina MiSeq (2 x 250 bp) at the GeT-PlaGe platform in Toulouse (France).

Sequence reads were quality controlled and first treated with the FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution [45]). Briefly, after merging the 250 bp reads, dataset was denoised and software was further used for several quality filtering level of DNA sequences before and after clustering (Swarm [46]). Chimera (Vsearch), singletons and OTU representing low proportion of reads (0,00005, [47]) or found in less than 3 samples were removed. Taxonomic assignment at the lowest phylogenetic level (BLAST algorithm against the SILVA 128 database) and prevalence based filtering step allowed to obtain of 525 OTUs (after correcting multi-affiliations and some misleading affiliations) among the 1 374 665 remaining reads. Between 6106 and 14 403 valid sequences per sample were counted.

Richness and diversity indexes of bacterial community as well as clustering and ordinations were computed using Phyloseq package (v 1.19.1) in RStudio software [48–50]. Microbiota differences in structure between groups were assessed using Adonis (permuted p-value was obtained by performing 9999 permutations).

Microbiota relative abundances were log transformed and statistical significance of differences between experimental groups was performed using two-way ANOVA analysis with Holm-Sidak multiple-comparison post-test (Prism 6, Graph Pad Software).

2.11 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. For statistical analysis, GraphPad Prism 4 (GraphPad, San Diego, CA) was used. Multiple comparisons within groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

RESULTS:

1. Identification of proteins contained in the lysozyme fraction

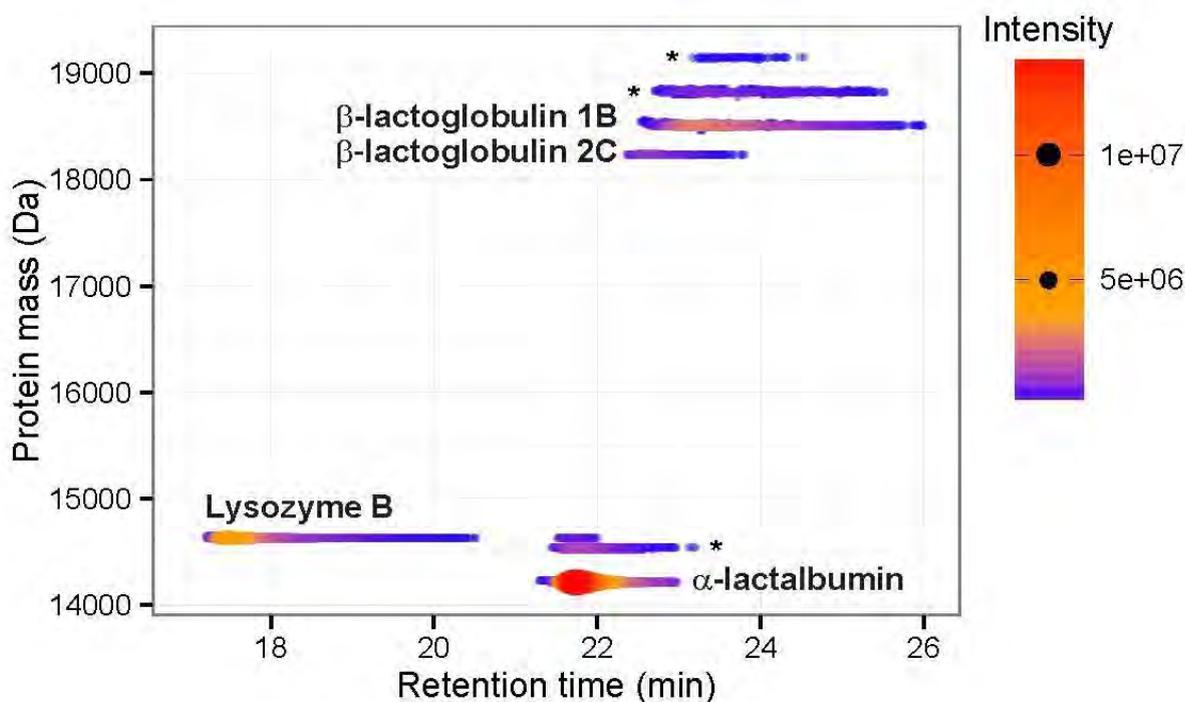


Figure 1: Map derived from spectral deconvolution analysis of the LYZ fraction nanoLC-MS experiment and protein assignment. Colors and dot sizes depict relative arbitrary intensities obtained from deconvolution. The protein species denoted with an asterisk (*) correspond to unassigned masses (from top to bottom: 19149.3 Da, 18821.8 Da and 14540.8 Da).

Table 1: Assigned proteins in the LYZ fraction by intact protein nanoLC-MS analysis.

Protein Name	Calculated Mass (Da) ^a	Experimental Mass (Da) ^a	m (Da)	Ref.
-lactalbumin	14214.12	14213.2	-0.92	UniProt P28546
Lysozyme B	14631.36	14630.0	-1.36	Herrouin <i>et al.</i>
-lactoglobulin 2C	18236.36	18236.2	-0.16	Herrouin <i>et al.</i>
-lactoglobulin 1B	18510.03	18509.6	-0.43	Herrouin <i>et al.</i>

^aThe calculated and experimental masses correspond to non-reduced forms.

In order to identify the proteins and their variants and/or modified forms which are present in the purified fraction containing donkey milk lysozyme (LYZ fraction), we first performed an intact protein LC-MS analysis. After deconvolution of the raw data, we observed different Molecular Weights (MWs) corresponding to seven protein species (Figure 1). By literature search based on the experimentally determined MWs, some of these proteins could be tentatively identified as Lysozyme B (14630.0 Da), α -lactalbumin (14213.2 Da), β -lactoglobulin 1B (18509.6 Da) and 2C (18236.2) (Table 1). The three others species detected with MWs of 14540.8 Da, 18821.8 Da and 19149.3 Da could not be assigned but according to their retention times and MWs, most probably originate from unexpected post-translational modifications or chemical modification due to sample preparation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Although this method is not quantitative, the intensity of the signal corresponding to Lysozyme B was one of the most intense, suggesting that it is a predominant component of this fraction.

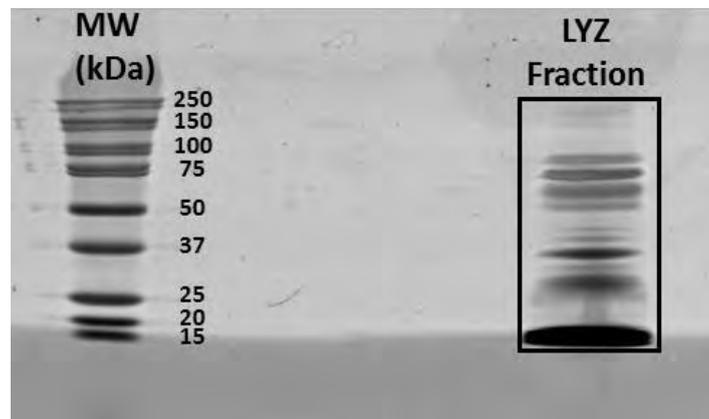


Figure 2: Coomassie blue-stained gel of total LYZ fraction. Rectangle delimitates the piece of gel containing the whole LYZ fraction and excised for bottom-up analysis by nanoLC-MS/MS. MW, molecular weight.

Table 2: Identified and empAI quantified proteins in the LYZ fraction by bottom-up proteomics.

^aMW corresponds to the calculated molecular weight of the non-reduced forms.

Protein Name	Coverage (%)	Score Mascot	# Peptides	MW [Da] ^a	empAI	Protein content (weight %)	Modifications	Ref.
- lactoglobulin-1B	86.4	44134	19	18510.03	39809.7	66.7	Acetyl [N-Term]; 4x Oxidation [M]	Herrouin et al.
Lysozyme B	81.4	11005	14	14631.36	19306.0	25.5	3xOxidation [M]	Herrouin et al.
Serum albumin	81.5	10838	65	68502.57	524.9	3.3		UniProt Q5XLE4
- lactoglobulin-2C	92.6	4437	11	18236.36	1583.9	2.6	4xOxidation [M]	Herrouin et al.
- lactoglobulin-1	67.3	27961	15	18524.02	999	1.7	Acetyl [N-Term]; 3xOxidation [M]	UniProt P13613
-lactalbumin	96.7	5720	13	14214.12	198.5	0.3	1xOxidation [M]	UniProt P28546

To confirm these results with a complementary approach, the fraction was loaded on a SDS-PAGE gel and a single band (Figure 2) was excised and digested with trypsin. The resulting peptides were extracted and analyzed by nanoLC-MS/MS. A database search with the *Equus Assinus* taxonomy (implemented with protein variants described in the literature) identified 12 proteins (see supplemental data 1). An empAI quantification allowed us to shortlist 6 proteins with a protein content (weight %) superior to 0.1% including those already identified in the previous approach as β -lactoglobulin 1B, Lysozyme B, β -lactoglobulin 2C, and α -lactalbumin, (Table 2). According to this empAI calculation, Lysozyme B appears as the second most abundant protein of this LYZ fraction, after β -lactoglobulin 1B. Interestingly the bottom-up approach identified two additional proteins, Serum albumin (68502.57 Da) and β -lactoglobulin 1 (18524.02 Da), with a minor protein content (weight %) respectively of 3.3% and 1.7%. The unassigned masses observed in the intact protein LC-MS analysis could not be explained by this approach, confirming the hypothesis that they probably correspond to modified α -lactalbumin and β -lactoglobulin.

2. Impact of DM and LYZ fraction treatments on WAS induced (A) gut hyperpermeability and (B) visceral hypersensitivity

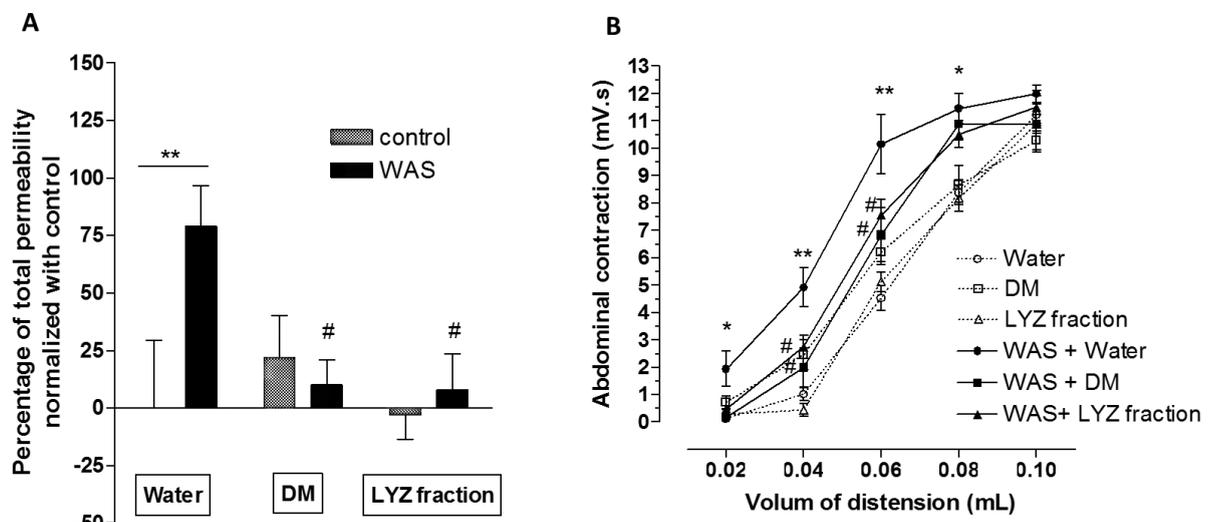


Figure 2: Impact of oral administration of DM and lysozyme fraction on (A) gut permeability and (B) visceral sensitivity in response to a colorectal distension. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared to control water values. #: $p < 0.05$ compared to WAS water values.

In basal conditions, administration of water, DM and LYZ fraction did not significantly change the total intestinal permeability to free-FITC (Figure 2A). WAS significantly increased total intestinal permeability to free-FITC. Oral administration of DM and LYZ fraction both reduced the hyperpermeability to free-FITC in stress conditions. Beside, in basal conditions, water, DM and LYZ fraction did not modulate basal visceral sensitivity in response to colorectal distension (Figure 2B). WAS increased visceral sensitivity to colorectal distension at low and high volumes compared to control mice. This result reflected both an allodynic and a hypersensitivity effect of WAS. No differences were observed for the highest volume (0.1mL). In stressed animals, consumption of DM and LYZ fraction both reduced significantly the visceral hypersensitivity in response to colorectal distension at 0.04mL and 0.06mL.

3. Impact of DM and LYZ fraction treatments on gut micro-inflammatory response induced by WAS.

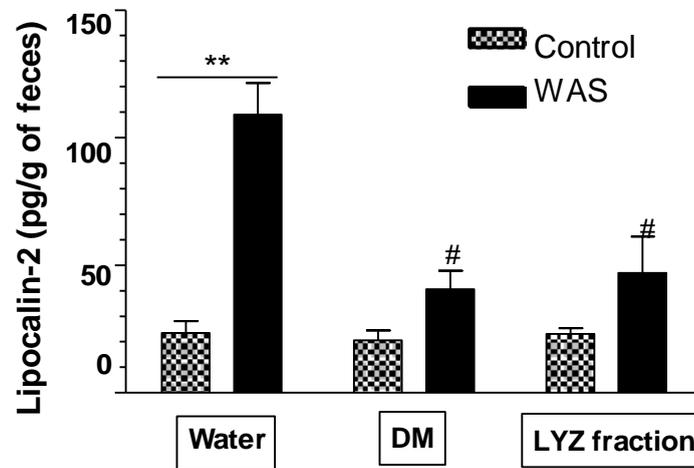


Figure 3: Impact of DM and LYZ fraction on fecal Lipocalin-2 levels in basal and stress conditions.

** : $p < 0.01$ compared to control water values. # : $p < 0.05$ compared to WAS water values.

In basal conditions, administration of water, DM and LYZ fraction did not modify the levels of fecal lipocalin-2 (23.48 ± 4.52 vs 20.57 ± 3.87 vs 23.02 ± 2.27 pg/g of feces) (Figure 3). WAS significantly increased the concentration of fecal lipocalin-2 (109.07 ± 12.40 vs 23.48 ± 4.52 pg/g feces) reflecting a low grade inflammation. WAS-induced increase of fecal lipocalin-2 was significantly reduced when mice were treated with DM or with LYZ fraction (40.50 ± 7.46 and 47.08 ± 14.16 pg/g feces).

4. Impact of DM and LYZ fraction treatments on antimicrobial peptides expression in Paneth cells in basal and WAS conditions.

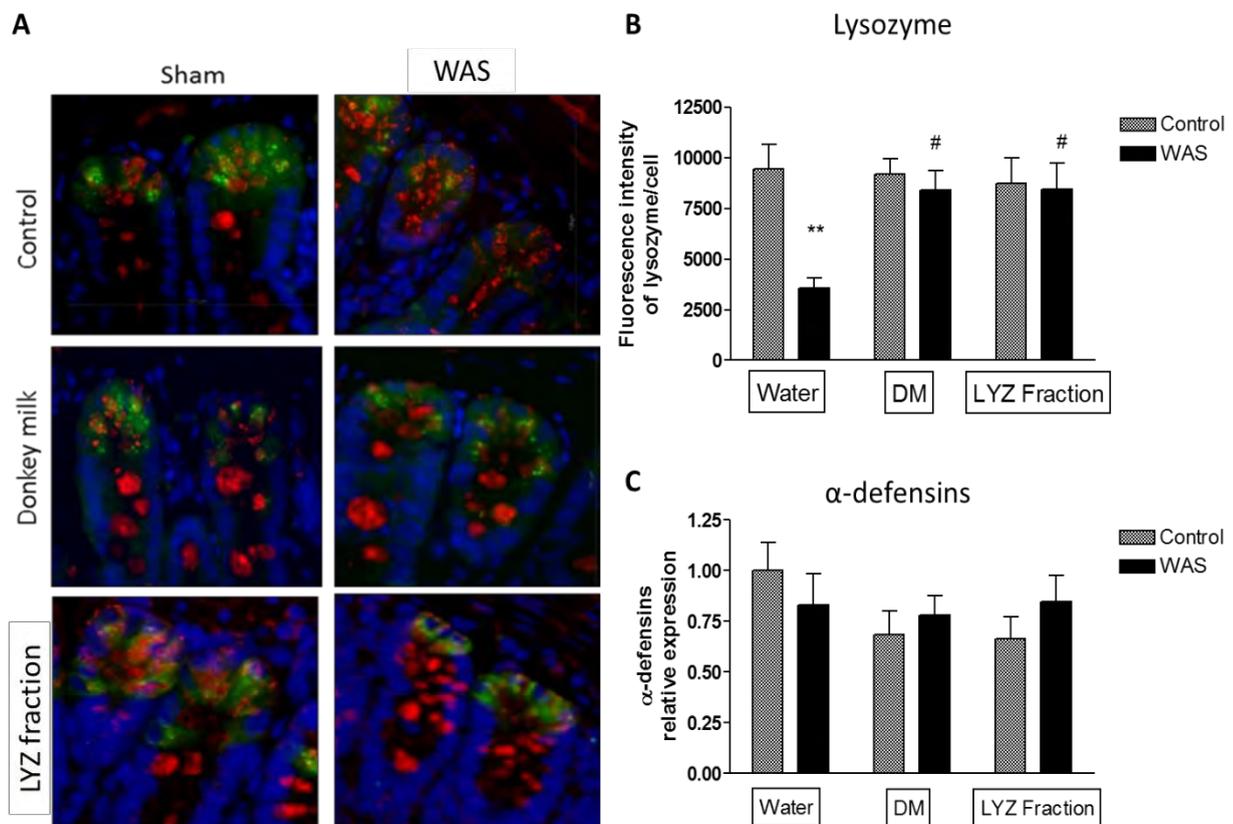


Figure 4: Impact of DM and LYZ fraction on antimicrobial peptides expression in PC in basal and WAS conditions: lysozyme (A) expression in green and (B) intensity of fluorescence; (C) α-defensins expression. **: p<0.01 compared to control water values. #: p<0.05 compared to WAS water values.

No modification of the number of PC was observed in ileal tissue sections (data not shown). In basal conditions, water, DM and LYZ Fraction did not change ileal expression of lysozyme (9456 ± 1219 , 9195 ± 776 and 8752 ± 1249 fluorescence intensity/cell) (Figure 3A-B) and α-defensins (1.000 ± 0.141 , 0.683 ± 0.117 , 0.661 ± 0.110) (Figure 3C). In stress conditions, WAS did not affect the expression of α-defensins compared to control ($0,831 \pm 0,154$ vs 1.000 ± 0.141) but decreased the expression of lysozyme in Paneth cells (3566 ± 487 vs 9456 ± 1219 fluorescence intensity/cell). Finally, DM or LYZ fraction treatments normalized the levels of lysozyme(8416 ± 975 , 8463 ± 1267 fluorescence intensity/cell) contained in PC.

5. Impact of DM and LYZ fraction treatments on WAS-induced high serine proteases levels

In basal conditions, administration of water, DM and LYZ Fraction did not affect the total fecal serine protease activity in mice (17.12 ± 5.03 , 19.66 ± 6.15 , 14.91 ± 7.32 U/mg of proteins) (Figure 4). WAS significantly increased the total fecal serine protease activity compared to control (140.54 ± 1.89 vs 17.12 ± 5.03). This WAS-induced enhanced activity was reduced in stressed mice treated with DM or LYZ fraction (57.24 ± 11.62 and 37.80 ± 7.58 U/mg of proteins).

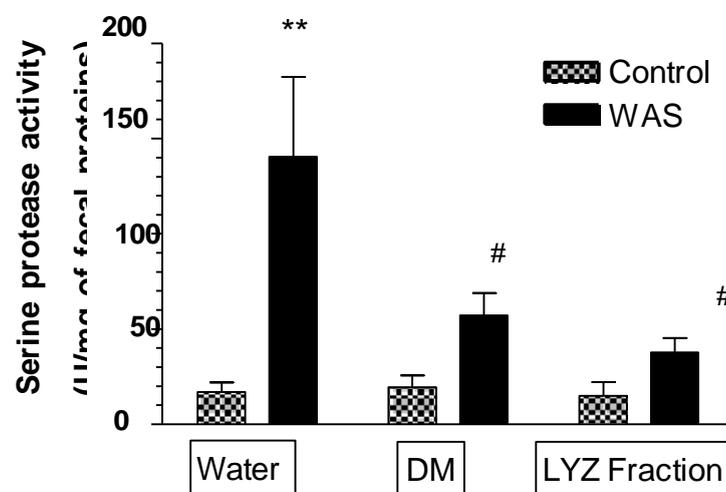


Figure 5: Impact of DM and LYZ fraction treatments on WAS-induced high serine proteases levels.

** : $p < 0.01$ compared to control water values. # : $p < 0.05$ compared to WAS water values.

6. Impact of stress, donkey milk and lysozyme fraction on community structure and composition of fecal microbiota

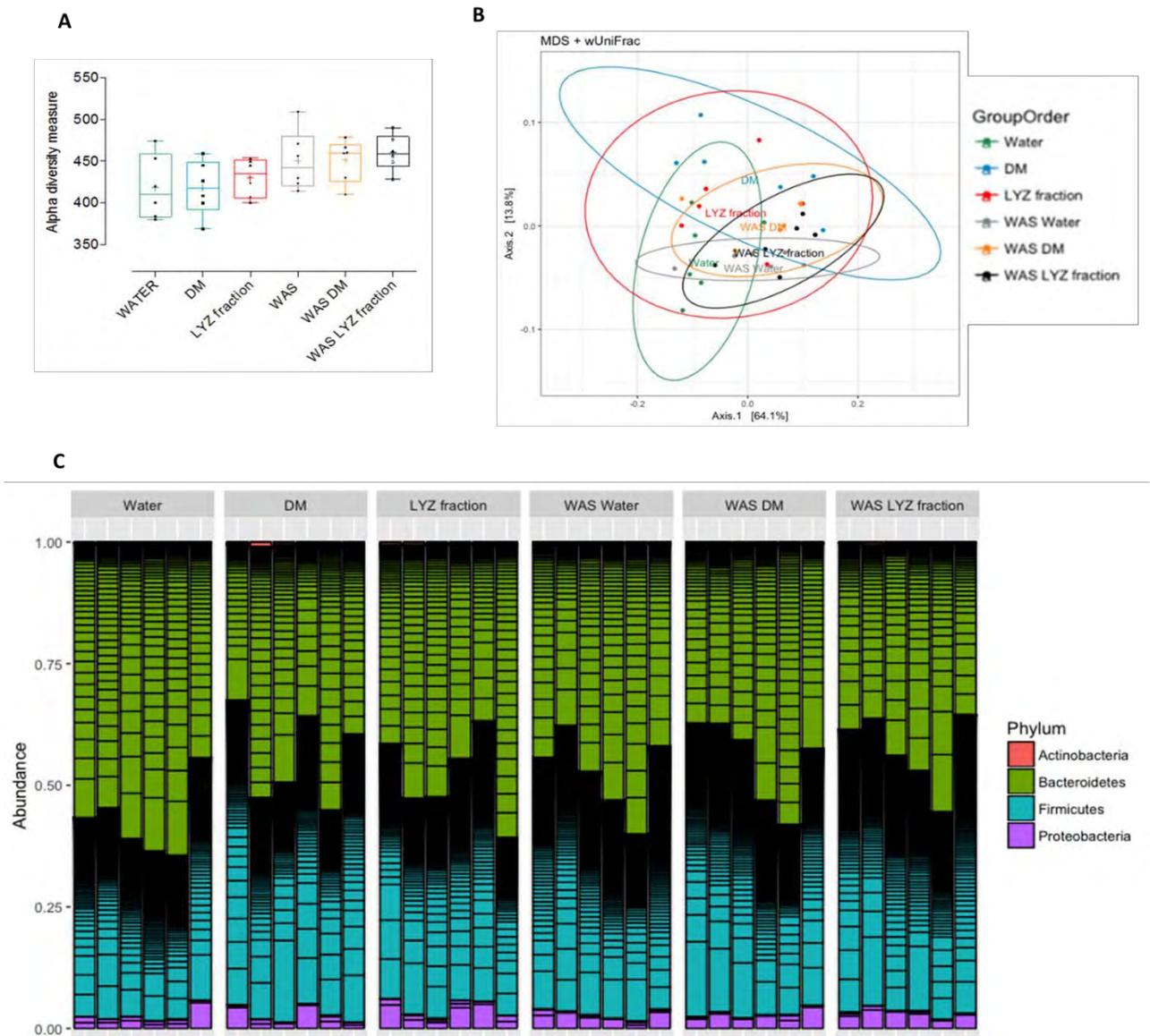


Figure 6: Effect of stress, DM and LYZ fraction on the community distribution and diversity of the fecal microbiota. (A) Within-sample richness measured by Chao-1 indice according to treatment of mice. **(B)** Between-sample Weighted Unifrac Multidimensional scaling (MDS) plot representing structural changes between treatments. **(C)** Composition of microbiota per mice at the phylum level as determined through 16S rRNA gene Illumina Miseq sequencing.

Whatever the treatment, richness within fecal samples measured by alpha diversity based on the Chao-1 estimator did not change (Figure 6A). Beta diversity represents the similarity or difference in organismal composition between samples. Here, Weighted Unifrac analysis, which takes into account abundances of operational taxonomic units and reflects differences in the most dominant operational taxonomic units, did not show any specific clustering pattern (Figure 6B).

As expected, the most abundant phyla detected in the feces of the mice were *Firmicutes* (49 %) and *Bacteroidetes* (47.6 %) followed by *Proteobacteria* (3.3 %), whereas minor phylum was Actinobacteria (0.15 %). The phylum of *Verrucomicrobia* was not detected.

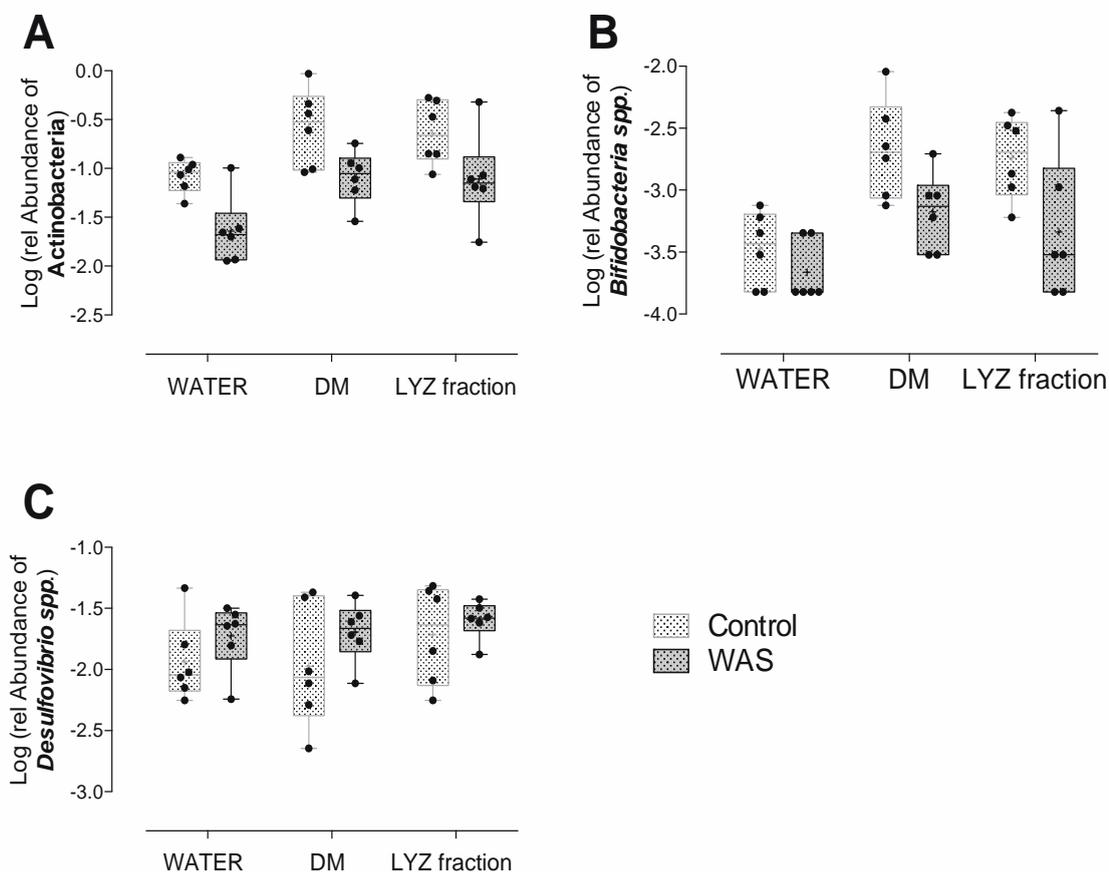


Figure 7: Boxplot representing Actinobacteria (A), *Bifidobacteria spp.* (B) and *Desulfovibrio spp.* (C) relative abundances in response to stress, DM and LYZ fraction.

At the phylum level, only abundance of Actinobacteria was affected by treatments. WAS significantly decreased their relative abundance (Figure 7A, Stress effect using two-way ANOVA analysis: $F(1,30)=20,69$, $p<0.0001$) whereas DM as well as LYZ fraction in contrast significantly increased abundance of Actinobacteria in both conditions (Figure 7A, Oral treatment effect using two-way ANOVA: $F(2,30)=8.81$, $p=0,001$). Application of DM as well as LYZ fraction in WAS-treated mice also allowed to normalized Actinobacteria levels encountered in physiological conditions with water. As expected, similar results were obtained by focusing on *Bifidobacterium spp.* relative abundances according to treatment, since *Bifidobacterium spp.* genus is predominant among Actinobacteria (Figure 7B, Stress effect $F(2,30)=1011$, $p=0,0004$; Oral treatment effect $F(1,30)=11.82$, $p=0,0017$). *Desulfovibrio spp.* relative abundance, that was also described to be altered in IBS-patients, was however neither altered by stress nor by DM and LYZ fraction (Figure 7C, all $p>0.05$).

DISCUSSION

This study shows that chronic stress alters the intestinal barrier, resulting in an increase of total gut permeability to free-FITC and leads to a low-grade inflammation reflected by the increase of fecal lipocalin-2. A visceral hypersensitivity in response of colorectal distension is also observed in WAS animals. In this model we attest that 9 non consecutive days of WAS promote to an intestinal micro-inflammation. Indeed, fecal lipocalin-2 levels assessed herein were tightly but significantly increased in stressed mice compared to control (50 ng/g vs 10 ng/g). In contrast, a strong gut inflammatory response induced by chemical agents like indomethacin or DSS 4% result in a higher increase of lipocalin-2 reaching 4000 ng /g and 10000 ng /g in fecal material respectively [31, 42]. Clinical studies describe also an intestinal low grade inflammation in IBS patients [51–55] associated to an increase of intestinal permeability associated with a visceral and a somatic hypersensitivity [56]. Micro-inflammation, gut permeability, and visceral pain following chronic WAS stress are significantly reduced when the animals received an oral treatment of donkey milk or the LYZ fraction. LYZ fraction tested in our study contains lysozyme B and 5 major proteins as β -lactoglobulin 1B, β -lactoglobulin 2C, and α -lactalbumin. Even if lysozyme is one of the most important component of the LYZ fraction, we cannot exclude a synergistic activity of all these proteins in the beneficial effects of the LYZ fraction.

Donkey milk was orally administered in a curative manner for 11 consecutive days with a daily dose of 5900 UI of LZA in 0.2 mL corresponding to 50 mL/day for human [57]. In a previous study, we have shown a non-correlation results between LZA activities and lysozyme concentrations in various donkey milk (Yvon *et al*, 2017, *submitted in Molecular Nutrition & Food Research*). Therefore, to control this key parameter, all our experiments were performed using a constant LZA administration.

An increase of serine proteases in fecal material coming from WAS animals is observed in our study. Serine proteases such as trypsin and trypsinase are known to activate PAR-2 receptors. In human and mice, PAR-2 receptors are strongly expressed in the gastrointestinal tract and contribute to the development of visceral hypersensitivity in IBS patients [55, 58–60]. Studies demonstrated that PAR-2

activation causes visceral hypersensitivity [60, 61] as well as an increase of the gut barrier permeability [19]. In addition, in WAS animals, chronic administration of DM, and LYZ fraction reduce the fecal serine proteases activity.

WAS also reduces the ileal expression of lysozyme contained in Paneth cells without modification of their number. However, lysozyme is not the only antimicrobial compound produced by Paneth cells. Indeed, Paneth cells produce and secrete other antimicrobial proteins or peptides (AMP) such as phospholipase A2, Reg3 lectins and α -defensins. However, mRNA expression encoding global α -defensins are not impacted in our model of WAS. Since, post-transcriptional modifications can appear influencing different characteristics of the mRNA, such as its stability, its ability to be translated, it would be interesting to measure the mature protein. The role of antimicrobial compounds derived from Paneth cells is not restricted to the small intestine where they are produced and secreted, but they also act in the lumen of the colon and have been detected in faeces [62–64]. Paneth cells are sensitive to stress [65]. In a recent study, Riba et al., showed in a maternal separation stress model in mice mimicking IBS physiopathology, a loss of Paneth cell function associated by a reduction of their endogenous expression of lysozyme [18]. In this study, mice also develop visceral hypersensitivity and dysbiosis characterized by a gut proliferation of *Escherichia coli*. Beside, although global structure of the fecal bacterial communities obtained via 16S rRNA sequencing is not significantly impacted in our study, a decrease in *Bifidobacteria spp.* is observed in response to WAS. This decreased of *Bifidobacteria* population is normalized to similar levels to those found in control animals treated by both donkey milk and LYZ fraction. Interestingly, for the first time we demonstrate, in physiological condition that DM as well as LYZ fraction have bifidogenic effect. An increase in the population of *Bifidobacteria* is associated with an indirect stimulation of the synthesis of short chain fatty acids (SCFA) like butyrate, one of the fuel nutrients of the colonocytes, and propionate which exert a beneficial effect on carbohydrate and lipid metabolisms [66, 67].

In conclusion these results illustrate that DM given as a supplementary diet as well as LYZ fraction with high enzymatic activity alleviates WAS-induced gut alterations via a bifidogenic effect. Therefore, we suggest that dietary interventions with DM containing a significant activity of lysozyme could be a good strategy in the treatment of IBS.

REFERENCES

- [1] Canavan, C., West, J., Card, T., The epidemiology of irritable bowel syndrome. *Clin. Epidemiol.* 2014, 6, 71–80.
- [2] Camilleri, M., Lasch, K., Zhou, W., Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012, 303, G775-785.
- [3] Khan, S., Chang, L., Diagnosis and management of IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010, 7, 565–581.
- [4] Hayes, P.A., Fraher, M.H., Quigley, E.M., Irritable bowel syndrome: the role of food in pathogenesis and management. *Gastroenterol Hepatol NY* 2014, 10, 164–174.
- [5] Gaber, O.H., The Relationship Between Irritable Bowel Syndrome , Depression , Anxiety, and Stress among a Sample of Irritable Bowel Patients - Predictive Study. *J. Sociol. Res.* 2016, 7, 44–64.
- [6] Greenwood-Van Meerveld, B., Moloney, R.D., Johnson, A.C., Vicario, M., Mechanisms of Stress-Induced Visceral Pain: Implications in Irritable Bowel Syndrome. *J. Neuroendocrinol.* 2016, 28, n/a-n/a.
- [7] Bradesi, S., Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 2005, 289, G42–G53.
- [8] Distrutti, E., Monaldi, L., Ricci, P., Fiorucci, S., Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies. *World J. Gastroenterol.* 2016, 22, 2219–2241.
- [9] Dlugosz, A., Winckler, B., Lundin, E., Zakikhany, K., et al., No difference in small bowel microbiota between patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *Sci. Rep.* 2015, 5, 8508.
- [10] Balsari, A., Ceccarelli, A., Dubini, F., Fesce, E., et al., The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome. *Microbiologica* 1982, 5, 185–194.
- [11] Sundin, J., Rangel, I., Fuentes, S., Heikamp-de Jong, I., et al., Altered faecal and mucosal microbial composition in post-infectious irritable bowel syndrome patients correlates with mucosal lymphocyte phenotypes and psychological distress. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2015, 41, 342–351.
- [12] Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., Hale, L.P., Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 2005, 11, 1131–1140.
- [13] Crouzet, L., Gaultier, E., Del’Homme, C., Cartier, C., et al., The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 2013, 25, e272-282.
- [14] Menendez, A., Willing, B.P., Montero, M., Wlodarska, M., et al., Bacterial Stimulation of the TLR-MyD88 Pathway Modulates the Homeostatic Expression of Ileal Paneth Cell α -Defensins. *J. Innate Immun.* 2013, 5, 39–49.
- [15] Salzman, N.H., Bevins, C.L., Dysbiosis--a consequence of Paneth cell dysfunction. *Semin. Immunol.* 2013, 25, 334–341.
- [16] Salzman, N.H., Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: Détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* 2010, 1, 401–406.
- [17] Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S.O., Terán, L.M., Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.* 2010, 135, 1–11.
- [18] Riba, A., Olier, M., Lacroix-Lamande, S., Lencina, C., et al., Microbiota Dysbiosis Induced by Defect of Paneth Cells Triggers Visceral Hypersensitivity in Mice. *Gastroenterology* 2017, 152, S40.
- [19] Gecse, K., Róka, R., Ferrier, L., Leveque, M., et al., Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 2008, 57, 591–599.

- [20] Tooth, D., Garsed, K., Singh, G., Marciani, L., et al., Characterisation of faecal protease activity in irritable bowel syndrome with diarrhoea: origin and effect of gut transit. *Gut* 2014, *63*, 753–760.
- [21] Róka, R., Demaude, J., Cenac, N., Ferrier, L., et al., Colonic luminal proteases activate colonocyte proteinase-activated receptor-2 and regulate paracellular permeability in mice. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 2007, *19*, 57–65.
- [22] Shanahan, F., Quigley, E.M.M., Manipulation of the Microbiota for Treatment of IBS and IBD—Challenges and Controversies. *Gastroenterology* 2014, *146*, 1554–1563.
- [23] Guo, H.Y., Pang, K., Zhang, X.Y., Zhao, L., et al., Composition, Physicochemical Properties, Nitrogen Fraction Distribution, and Amino Acid Profile of Donkey Milk. *J. Dairy Sci.* 2007, *90*, 1635–1643.
- [24] Uniacke-Lowe, T., Huppertz, T., Fox, P.F., Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. *Int. Dairy J.* 2010, *20*, 609–629.
- [25] Muraro, M.A., Giampietro, P.G., Galli, E., Soy formulas and nonbovine milk. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 2002, *89*, 97–101.
- [26] Carroccio, A., Cavataio, F., Montalto, G., D’Amico, D., et al., Intolerance to hydrolysed cow’s milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 2000, *30*, 1597–1603.
- [27] Tidona, F., Sekse, C., Criscione, A., Jacobsen, M., et al., Antimicrobial effect of donkeys’ milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *Int. Dairy J.* 2011, *21*, 158–165.
- [28] Zhang, X.-Y., Zhao, L., Jiang, L., Dong, M.-L., et al., The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control* 2008, *19*, 1191–1195.
- [29] Mao, X., Gu, J., Sun, Y., Xu, S., et al., Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. *Int. Dairy J.* 2009, *19*, 703–708.
- [30] Trinchese, G., Cavaliere, G., Canani, R.B., Matamoros, S., et al., Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *J. Nutr. Biochem.* 2015, *0*.
- [31] Yvon, S., Olier, M., Leveque, M., Jard, G., et al., Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth’s cells in a model of ileitis in mice. *Eur. J. Nutr.* 2016.
- [32] Gersch, M., Hackl, M.W., Dubiella, C., Dobrinevski, A., et al., A Mass Spectrometry Platform for a Streamlined Investigation of Proteasome Integrity, Posttranslational Modifications, and Inhibitor Binding. *Chem. Biol.* 2015, *22*, 404–411.
- [33] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* 1996, *68*, 850–858.
- [34] Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., et al., Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. *Mol. Cell. Proteomics* 2005, *4*, 1265–1272.
- [35] Giufreda, M.G., CANTISANI, A., NAPOUTANO, L., CONTI, A., et al., The Amino-Acid Sequence of Two Isoforms of α -Lactalbumin from Donkey (*Equus asinus*) Milk is Identical. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1992, *373*, 931–936.
- [36] Cunsolo, V., Muccilli, V., Fasoli, E., Saletti, R., et al., Poppea’s bath liquor: The secret proteome of she-donkey’s milk. *J. Proteomics* 2011, *74*, 2083–2099.
- [37] Herrouin, M., Mollé, D., Fauquant, J., Ballestra, F., et al., New genetic variants identified in donkey’s milk whey proteins. *J. Protein Chem.* 2000, *19*, 105–116.
- [38] Cunsolo, V., Saletti, R., Muccilli, V., Foti, S., Characterization of the protein profile of donkey’s milk whey fraction. *J. Mass Spectrom.* 2007, *42*, 1162–1174.
- [39] Cunsolo, V., Costa, A., Saletti, R., Muccilli, V., et al., Detection and sequence determination of a new variant β -lactoglobulin II from donkey. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, *21*, 1438–1446.
- [40] P. Nejdfor, B.R.W., M. Ekelund, B. Jeppsson, Mucosal in Vitro Permeability in the Intestinal Tract of the Pig, the Rat, and Man: Species- and Region-Related Differences. *Scand. J. Gastroenterol.* 2000, *35*, 501–5

- [41] Edelblum, K.L., Sharon, G., Singh, G., Odenwald, M.A., et al., The Microbiome Activates CD4 T-cell-mediated Immunity to Compensate for Increased Intestinal Permeability. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2017, 4, 285–297.
- [42] Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M.A., Young, A.N., et al., Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One* 2012, 7, e44328.
- [43] Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D., et al., Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, e120–e120.
- [44] Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., et al., Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* 2008, 3.
- [45] Escudie, F., Auer, L., Bernard, M., Cauquil, L., et al., FROGS: Find Rapidly OTU with Galaxy Solution, in: *The Environmental Genomic Conference*, Montpellier 2015.
- [46] Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., et al., Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2014, 2, e593.
- [47] Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., et al., Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 2013, 10, 57–9.
- [48] Mcmurdie, P.J., Holmes, S., Phyloseq: a Bioconductor Package for Handling an Analysis of High-Throughput Phylogenetic Sequence Data. *Pac Symp Biocomput* 2012, 235–246.
- [49] McMurdie, P.J., Holmes, S., Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 2013, 8.
- [50] R Development Core Team, R., R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found. Stat. Comput.* 2011, 1, 409.
- [51] Barbara, G., Giorgio, R.D., Stanghellini, V., Cremon, C., et al., A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut* 2002, 51, i41–i44.
- [52] O’Sullivan, M., Clayton, N., Breslin, N.P., Harman, I., et al., Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 2000, 12, 449–457.
- [53] Spiller, R., Jenkins, D., Thornley, J., Hebden, J., et al., Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000, 47, 804.
- [54] Spiller, R., Major, G., IBS and IBD — separate entities or on a spectrum? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016, 13, 613–621.
- [55] Collins, S.M., Piche, T., Rampal, P., The putative role of inflammation in the irritable bowel syndrome. *Gut* 2001, 49, 743–745.
- [56] Zhou, Q., Zhang, B., Nicholas Verne, G., Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *PAIN* 2009, 146, 41–46.
- [57] Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2008, 22, 659–661.
- [58] Bueno, L., Fioramonti, J., Visceral perception: inflammatory and non-inflammatory mediators. *Gut* 2002, 51, i19–i23.
- [59] Vergnolle, N., Clinical relevance of proteinase activated receptors (PARs) in the gut. *Gut* 2005, 54, 867–874.
- [60] Vergnolle, N., Proteinase-activated receptors (PARs) in infection and inflammation in the gut. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008, 40, 1219–1227.
- [61] Yoshida, N., Yoshikawa, T., Basic and translational research on proteinase-activated receptors: implication of proteinase/proteinase-activated receptor in gastrointestinal inflammation. *J. Pharmacol. Sci.* 2008, 108, 415–421.
- [62] Mastroianni, J.R., Ouellette, A.J., α -Defensins in Enteric Innate Immunity. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 27848–27856.
- [63] Mastroianni, J.R., Costales, J.K., Zaksheske, J., Selsted, M.E., et al., Alternative luminal activation mechanisms for paneth cell α -defensins. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 11205–11212.
- [64] Nakamura, K., Sakuragi, N., Ayabe, T., A monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked

- immunosorbent assay for detection of secreted α -defensin. *Anal. Biochem.* 2013, *443*, 124–131.
- [65] Estienne, M., Claustre, J., Clain-Gardechaux, G., Paquet, A., et al., Maternal deprivation alters epithelial secretory cell lineages in rat duodenum: role of CRF-related peptides. *Gut* 2010, *59*, 744–751.
- [66] Hurst, N.R., Kendig, D.M., Murthy, K.S., Grider, J.R., The short chain fatty acids, butyrate and propionate, have differential effects on the motility of the guinea pig colon. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 2014, *26*, 1586–1596.
- [67] Miller, T.L., Wolin, M.J., Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, *62*, 1589–1592.
- [68] Magoč, T., Salzberg, S.L., FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2011, *27*, 2957–63.
- [69] Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., et al., BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009, *10*, 421.

SUPPLEMENTARY DATA 1

Protein FDR Confidence Mascot	Accession	Description	Score Mascot	Coverage Mascot (%)	# Peptides Mascot	# PSMs Mascot	# Protein Unique Peptides	# Unique Peptides	# AAs [kDa]	MW [kDa]	calc. pI	Area	emPAI	Protein content (mol %)	Protein content (weight %)	Modifications
High	P13613.B	Beta-lactoglobulin-1B (Herrouin 2000, variant 1B) OS=Equus asinus	44134	86.42	19	1699	5	5	162	18.5	4.94	3.21E+10	39809.72	63.8	66.7	Acetyl [N-Term]; 4xOxidation [M7; M24; M107; M133]
High	P11375.B	Lysozyme B (Herrouin 2000, variant B) OS=Equus asinus	11005	81.40	14	394	1	14	129	14.6	7.87	1.55E+10	19305.98	30.9	25.5	Oxidation [M17; M31; M79]
High	Q5XLE4	Serum albumin OS=Equus asinus GN=ALB PE=1 SV=1	10838	81.55	65	482	65	65	607	68.5	6.28	5.28E+09	524.933	0.8	3.3	
High	P19647.C	Beta-lactoglobulin-2C (Herrouin 2000, variant 2C) OS=Equus asinus	4437	92.64	11	179	0	11	163	18.2	4.81	5.75E+09	1583.893	2.5	2.6	4xOxidation [M7; M24; M103; M134]
High	P13613.1	Beta-lactoglobulin-1 OS=Equus asinus GN=LGB1 PE=1 SV=1	27961	67.28	15	1138	1	1	162	18.5	4.88	1.39E+05	999	1.6	1.7	Acetyl [N-Term]; 3xOxidation [M7; M107; M133]
High	P28546.1	Alpha-lactalbumin OS=Equus asinus GN=LALBA PE=1 SV=1	5720	96.75	13	388	13	13	123	14.2	5.27	1.53E+10	198.526	0.3	0.3	Oxidation [M90]
High	B7VGF9	Alpha-S2-casein OS=Equus asinus GN=CSN1S2 PE=1 SV=1	122	11.86	2	10	2	2	236	27.7	6.23	2.66E+06	1.581	0.0	0.0	Oxidation [M216]
High	COHJR4	Lactadherin (Fragment) OS=Equus asinus GN=MFGE8 PE=1 SV=1	32	100.00	1	1	1	1	24	2.6	4.88	7.80E+06	9	0.0	0.0	
High	P86272	Alpha-S1-casein OS=Equus asinus GN=CSN1S1 PE=1 SV=1	128	12.87	2	2	2	2	202	24.4	6.35	7.54E+06	0.778	0.0	0.0	
High	Q861S3	Beta-2-microglobulin OS=Equus asinus GN=B2M PE=3 SV=1	81	16.95	2	4	2	2	118	13.5	6.92	1.02E+07	1.371	0.0	0.0	
High	M9P777	PR domain containing 9 (Fragment) OS=Equus asinus x caballus GN=Prdm9 PE=4 SV=1	26	1.90	2	6	2	2	421	49	9.19	2.31E+07	0.145	0.0	0.0	
High	A7LBS8	Interferon gamma OS=Equus asinus somalicus PE=2 SV=1	48	3.61	1	3	0	1	166	19.2	9.38	2.72E+06	0.179	0.0	0.0	

SUPPLEMENTARY DATA 2

16S rRNA amplification and amplicon sequencing

The V3-V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was amplified by PCR. The forward PCR primer 5'**CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC** TAC GGR AGG CAG CAG3' was a 43-nucleotide fusion primer consisting of the 28-nt illumina adapter (designed by bold font) and the 14-nt broad range bacterial primer 343F. The reverse PCR primer 5' **GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC** TTA CCA GGG TAT CTA ATC CT3' was a 47-nucleotide fusion primer consisting of the 28-nt illumina adapter (designed by bold font) and the 19-nt broad range bacterial primer 784R. The PCR mix contained MTP Taq DNA polymerase (SIGMA, 0,05 U/ μ l), 200 μ M of each DNTP (SIGMA, premix), and 0,5 μ M of each primer. After initial denaturation at 94°C for 60 sec in CFX-96 Thermal Cycler (Bio-Rad), 30 cycles were run with 60 sec denaturation at 94°C, 60 sec annealing at 65°C and 60 sec at 72°C. Round ended with 10 min extension at 72°C. Amplification quality (length, quantity and specificity) was verified using the Agilent 2200 TapeStation system (High sensitivity D1000 ScreenTape Assay) and AATI Fragment Analyser at the GeT (Genomic and Transcriptomic, TRIX and PlaGe) platforms in Toulouse. Because MiSeq enables paired 250-bp reads, the ends of each read are overlapped and can be stitched together to generate extremely high-quality, full-length reads of the entire V3 and V4 region in a single run. Single multiplexing was performed using home made 6 bp index, which were added to R784 during a second PCR with 12 cycles using forward primer (AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC) and reverse primer (CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT). The resulting PCR products were purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge according to the manufacturer instructions. The quality of the run was checked internally using PhiX, and then each pair-end sequences were assigned to its sample with the help of the previously integrated index. Each pair-end sequences were assembled using Flash software [68] using at least a 10 bp-overlap between the forward and reverse sequences, allowing 10% of mismatch. The lack of contamination was checked with a negative control during the

forward PCR (water as template). The quality of the stitching procedure was controlled using 4 bacterial samples that are run routinely in the sequencing facility in parallel to the current samples.

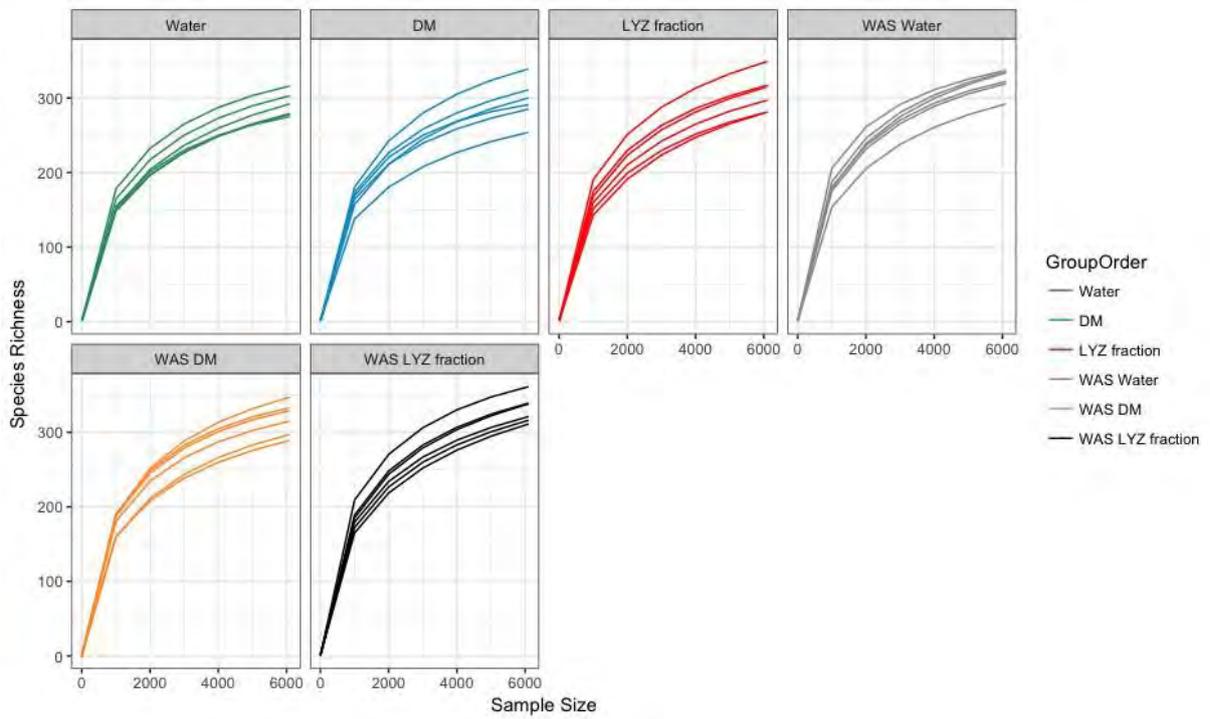
Microbiome 16S data analysis

High quality filtered reads (1 374 665 reads) were further processed using FROGS pipeline to obtain OTUs and their respective taxonomic assignment thanks to Galaxy instance (<http://sigenae-worbench.toulouse.inra.fr>): Initial FROGS pre-process step allowed to select overlapped reads with expected length without N, yielding to 576 767 pass-filter reads (an average of 11 803 reads per sample). Swarm clustering method was applied by using a first run for denoising with a distance of 1 and then a second run for clustering with an aggregation maximal distance of 3 on the seeds of first Swarm [46], yielding to 114 671 clusters (an average of 3558 per sample). Putative chimera were removed using vsearch combined to cross-validation (GitHub repository. Doi 10.5281/zenodo.15524), yielding to 67 888 clusters (an average of 1950 per sample).

Cluster abundances were filtered at 0,005% [47] and/or had to be present at least in 3 samples, yielding to 525 clusters (an average of 371 clusters per sample) corresponding to 418 558 final valid reads.

100% of clusters were affiliated to OTU by using a silva128-16S reference database and a taxonomic multi-affiliation procedure (Blast+ [69] with equal multi-hits). Since rarefaction has shown to result in high rates of false positive tests for differential abundance, counts were not rarefied [69]. OTU prevalence, abundance per phylum and rarefaction curves were plotted for each sample on FROGS, by using Phyloseq package (v 1.19.1, Supplementary data 3) after a supplementary recommended normalisation (leading finally to 525 analysed OTUs). Within sample community alpha diversity was assessed by Chao-1 diversity. Divergence in community composition between samples was quantitatively assessed by calculating weighted Unifrac (abundance and phylogenetic relation) distance matrice. Unconstrained ordination was visualized using multidimensional scaling (MDS) and compared using Adonis test (9999 permutations).

SUPPLEMENTARY DATA 3



Supplementary data fig 3: Alpha diversity rarefaction curves

RESULTAT III

Préserver l'activité enzymatique du lysozyme du lait d'ânesse grâce à un traitement thermique optimisé permet de réduire l'hyperperméabilité et l'état micro-inflammatoire de l'intestin provoqués par un stress chronique chez la souris.

Sophie Yvon, Lauriane Schwebel, Christel Couderc, Mireille Gaucher, Loubnah Belahcen, Hélène Tormo, Magali Peter, Djamila Ali Haimoud - Lekhal, Hélène Eutamene * et Gwenaëlle Jard *.

* Ces auteurs ont participé à part égale pour ce travail.

Soumis dans « *Molecular Nutrition and Food Research* »

Contexte et objectifs : La nutrition joue un rôle crucial dans la « santé intestinale » humaine grâce à l'amélioration de la fonctionnalité de la barrière intestinale. Le lait d'ânesse représente une source intéressante de peptides antimicrobiens naturels comme le lysozyme. Récemment, nous avons montré les propriétés anti-inflammatoires du lait d'ânesse administré à activité constante de lysozyme dans un modèle murin d'iléite. L'expansion récente de la consommation de lait d'ânesse met en évidence le besoin de proposer un lait conforme aux normes microbiologiques. Cette étude vise à définir un traitement thermique permettant de préserver l'activité du lysozyme dans le lait d'ânesse et à vérifier ses effets bénéfiques sur deux paramètres clés perturbés lors d'un stress chronique : la perméabilité intestinale et l'état micro-inflammatoire.

Méthodes et Résultats : La qualité microbiologique, la teneur en lysozyme et l'activité ont tout d'abord été caractérisées dans 15 échantillons de lait. Sur un lait sélectionné, différents essais de traitement thermique ont été réalisés pour définir une combinaison temps / température pertinente. Un traitement à 2 min / 72 °C a permis de conserver l'activité du lysozyme et d'augmenter la durée de conservation du lait d'ânesse. Ce lait traité thermiquement administré par voie orale chez des souris C57BL/6 contrecarre les altérations induites par le stress chronique illustrés par l'hyperperméabilité de la barrière intestinale et l'état micro-inflammatoire intestinal (Figure 31).

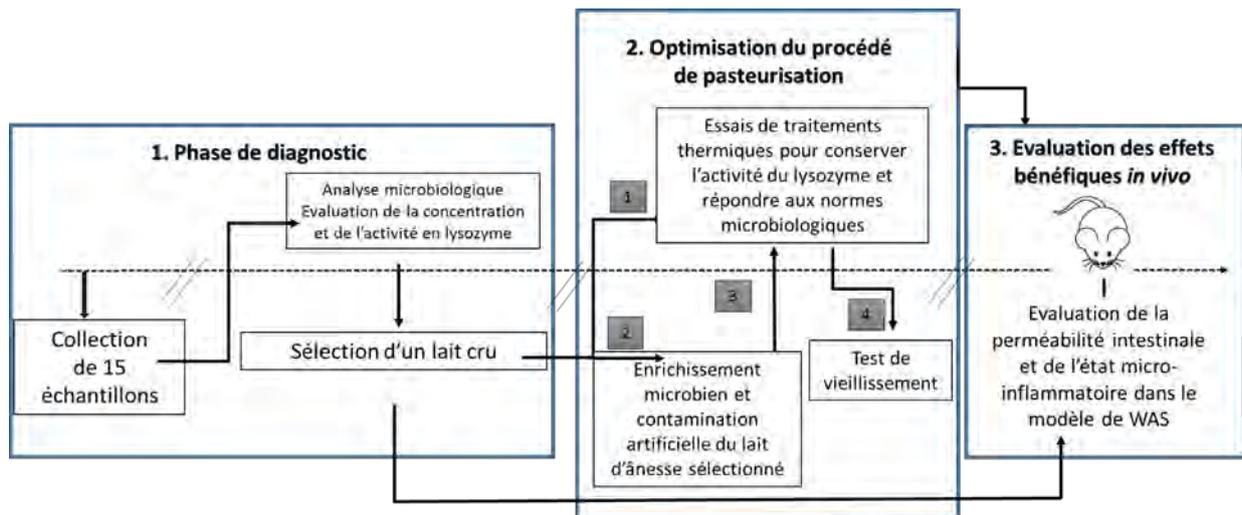
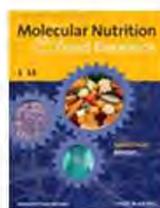


Figure 31 : Design expérimental de la troisième étude.

Conclusions : Pour la première fois, nous démontrons qu'une consommation de lait d'ânesse pasteurisé suivant un couple temps / température précis pour permettre de conserver une activité enzymatique du lysozyme constante et élevée, améliore les dommages de la barrière intestinale liés à un stress psychologique chronique chez la souris.

Molecular Nutrition and Food Research



Saving enzymatic lysozyme activity upon an optimized heat-treatment of donkey milk preserves gut mucosa damages in stressed mouse.

Journal:	<i>Molecular Nutrition and Food Research</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Yvon, Sophie; UMR 1331 Toxalim INRA, Neuro-Gastroenterology & Nutrition group; Ecole d'ingénieurs de Purpan, Sciences Agronomiques et Agroalimentaire Schwebel, Lauriane; Ecole d'ingénieurs de Purpan, Sciences Agronomiques et Agroalimentaire Couderc, Christel; Ecole d'ingénieurs de Purpan, Sciences Agronomiques et Agroalimentaire Gaucher, Mireille; Ecole d'ingénieurs de Purpan, Sciences Agronomiques et Agroalimentaire Belahcen, Loubnah; Ecole d'ingénieurs de Purpan, Sciences Agronomiques et Agroalimentaire Tormo, Helene; Ecole d'ingénieurs de Purpan, Sciences Agronomiques et Agroalimentaire Peter, Magali; Ecole d'ingénieurs de Purpan, Sciences Agronomiques et Agroalimentaire Ali Haimoud-Lekhal, Djamilia; Ecole d'ingénieurs de Purpan, Sciences Agronomiques et Agroalimentaire Eutamene, Helene; UMR 1331 Toxalim INRA, Neuro-Gastroenterology & Nutrition group; Ecole d'ingénieurs de Purpan, Sciences Agronomiques et Agroalimentaire Jard, Gwenaëlle; Ecole d'ingénieurs de Purpan, Sciences Agronomiques et Agroalimentaire
Keywords:	Pasteurization, lysozyme activity, Stress, Gut damage, Donkey milk

1
2
3 **Saving enzymatic lysozyme activity upon an optimized heat-treatment of donkey milk preserves**
4 **gut mucosa damages in stressed mouse.**
5
6
7
8

9 **Order of Authors:** Sophie Yvon, Lauriane Schwebel, Christel Couderc, Mireille Gaucher, Loubnah
10 Belahcen, Helene Tormo, Magali Peter, Djamila Ali Haimoud – Lekhal, Hélène Eutamene* &
11 Gwenaëlle Jard*.
12

13 * These authors contributed equally to this work.

14 **Corresponding author:** Hélène Eutamene, PhD, UMR 1331 Toxalim INRA, INP-ENVT, INP-PURPAN, Université
15 de Toulouse 3 Paul Sabatier, Neuro-Gastroenterology & Nutrition group, 180 chemin de Tournefeuille -31027
16 TOULOUSE, France. TEL: +33 (0)5 82 06 64 04. Email: helene.eutamene@inra.fr
17
18
19
20
21

22 **Acknowledgements:**

23 The authors thanks Henri Tonglet for his technical assistance. The authors also thanks "Institut
24 National Âne et Mulet" (INAM) and "Ecole d'Ingénieurs de Purpan" for their financial support.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Nutrition plays a crucial role in human gut health through the improvement of gut barrier functionality. Donkey milk (DM) represents an interesting source of natural antimicrobial factors like lysozyme. Recently, anti-inflammatory properties of DM administered with constant lysozyme activity (LZA) were described in a mouse model of ileitis. Recent expansion of DM consumption highlights the urge to propose a healthy microbiological standards compliant milk. This study aims to define a heat-treatment of DM with high LZA and to evaluate its beneficial effects on gut barrier impairment model due to a chronic stress in mouse.

Microbiological quality, lysozyme content and activity were firstly characterized in 15 DM. Different heat-treatment assays were assessed to define a relevant time/temperature combination. A 2 min/72°C treatment allowed to preserve the LZA and to increase the shelf-life of DM. This heat-treated milk orally administered in C57BL/6 mice counteracted chronic water avoidance stress intestinal damages illustrated by gut hyper-permeability and micro-inflammation.

For the first time, we demonstrate that a drinking intervention of an optimized heated donkey milk saving enzymatic lysozyme activity, improves the leaky intestinal barrier damages linked to psychological stress in mouse.

Key words: donkey milk, pasteurization, lysozyme activity, stress, gut damage.

Abbreviations: DM (Donkey milk); LZA (lysozyme activity); IBD (inflammatory bowel disease); IBS (irritable bowel syndrome);

INTRODUCTION

Donkey milk (DM) has the most comparable nutritional composition to human milk and represents a significant source of natural protective antimicrobial factors [1–3]. Recently, DM-related researches demonstrating its ability to improve human health had been increasing [4, 5]. For example, DM can be used as a hypoallergenic substitute in patient presenting cow's milk protein allergy or multiple food intolerances [6]. Due to high levels in polyunsaturated fatty acids and other beneficial nutrients, DM can also be useful in the prevention of atherosclerosis [7] and in the positive stimulation of the immune system of the infants and the elderly [8]. Interestingly, all these healthy relevant effects seems to be correlated to the biochemical composition of DM.

Donkey and human milk contain similar lactose, total proteins and whey protein levels. The whey proteins (lysozyme, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, lactoferrin ...) represent 35-50% of the nitrogen fraction with 2 g/L of lactoferrin and 1-4 g/L of lysozyme [9]. On A549 human lung cancer cells, fraction of DM containing lysozyme exerts significant anti-proliferative and anti-tumoral activities *in vitro* [10]. Recently, we showed that a daily DM consumption with constant lysozyme activity induces anti-inflammatory properties in a mouse model of ileitis [11]. This effect is tightly dependent on lysozyme activity and associated with a normalization of antimicrobial peptides (lysozyme and α -defensin) levels contained in Paneth's cells as well as a reduction of the dysbiosis associated to ileitis [11]. These data suggest that specific intervention requiring a significant lysozyme activity contained in donkey milk is a key condition to obtain a beneficial effect of DM on gastrointestinal mucosa [11].

Today it is widely agreed that nutrition plays a crucial part in human gut health namely through its impact on gut microbiota and barrier functionality [12, 13]. Under physiological conditions, the intestinal epithelium acts as a dynamic barrier, which regulates the uptake of nutrients and water while excluding undesirable factors such as antigens, toxins, LPS and commensals or pathogens agents. The impairment of the intestinal mucosal barrier, assessed by an increase of the epithelial permeability is a common feature of inflammatory bowel disease (IBD) and irritable bowel syndrome (IBS) and appears as a prerequisite for visceral pain perception [14]. Moreover, a low grade intestinal mucosal inflammation is

1
2
3 described in IBS patients and associated to the increase of gut permeability and visceral pain
4 [15]. In humans, stressful life events exacerbate gastrointestinal disorders including IBD, IBS
5 and other functional gastrointestinal diseases. The stressful situations and various stressors
6 like psychosocial events may worsen the course of IBD as well as IBS symptoms. Stress can
7 evoke both increased gut permeability and gut mucosal micro-inflammation [16, 17]. In
8 mice, it has been observed that stress induces a disruption of colonic epithelial barrier and
9 promotes gut micro-inflammation [18, 19].

10
11
12
13
14
15
16 In raw donkey milk the presence of natural antimicrobial components like lysozyme,
17 immunoglobulins, lactoferrin and lactoperoxidase confers to DM low levels of total bacteria
18 (2.40-5.87 log₁₀ cfu/mL) [4, 20–25] and pathogens as well as a long natural shelf life [24].
19 Among the list of unexpected bacteria usually present in milk like *Salmonella* spp,
20 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp and
21 *Staphylococcus* spp, all of them have never been reported in DM except *B. cereus* and
22 *Staphylococcus* spp [20, 25]. Besides, some contaminated pathogenic strains for human as
23 *Streptococcus* and *Enterococcus* (*E. faecium* and *E. faecalis*) have been detected in raw
24 donkey milk [26, 27]. *E. faecalis* is responsible for 80-90% of *Enterococcus* infections [28]. *E.*
25 *faecalis* is a very adaptable strain to different substrates and resists against Holder
26 pasteurization (62°C/30min) [29] and to antimicrobial lysozyme activity [30]. In France, as in
27 other countries, the recent expansion of donkey breeding and the wider consumption of
28 donkey milk usually retailed in farms for direct consumption highlighted the urge for farmer
29 to propose a safe and biologically effective DM to consumer.

30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41 Heat treatments applied with appropriate time/temperature combinations are traditionally
42 used in the manufacture of milk and on milk products as key treatments to obtain a safe and
43 suitable end product. Pasteurization is defined as a heat-based microbiocidal step aimed at
44 reducing the load of total and harmful microorganisms in milk [31]. For safety neonate infant
45 consumption, a heat treatment of 30 min at 62.5°C is currently applied to human breast milk
46 [32–35]. However, this time/temperature combination applied during this heated treatment
47 causes a drastic loss (44%) of lysozyme activity [35].

48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 In this context, based on previous published data illustrating a beneficial effect of DM linked
to its activity of lysozyme in a model of ileitis in mouse; this study aims to (i) establish an
overview of both lysozyme levels and lysozyme activity in microbiological characterized

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

French DMs; (ii) to develop a simple and low cost heat-treatment process offering a microbiological standards compliant milk and preserving its lysozyme activity; (iii) to check the ability of this heated milk vs raw DM to counteract the gut hyper-permeability and micro-inflammation induced by a chronic stress in mouse.

For Peer Review

MATERIAL & METHODS

1) Experimental Design

As illustrated bellow (figure 1), the experimental protocol was divided in 3 phases. First, a study was conducted in order to define the microbiological load and both the levels and the activity of lysozyme contained in 15 DM samples previously collected in 15 distinct French farms. The second phase, divided in 4 steps, consisted in optimizing a heat treatment process on one selected milk obtained from "la ferme du Hitton" farm (Biran, France) chosen for their breeding and well-being animal qualities. In the first step, several heat treatments were carried out in order to define a time/temperature combination which allowed both to reduce the number of total micro-organisms and to preserve the activity of lysozyme present in milk. In the second step, linked to the low level of microorganisms counted in the previous selected DM, an enrichment of endogenous bacteria (bacteria enriched milk) and an artificial contamination by *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* contaminated milk), a thermotolerant strain were performed in order to select among the interesting heat treatment found in step 1 the heat-treatment process offering a safety milk compliant with microbiological standards (step 3). The last step consisted in performing an aging test in order to characterize the shelf life of the heat treated DM. Finally, in the third phase of the study, the beneficial effects of this pasteurized DM were checked in an *in vivo* model of a chronic stress in mouse which promotes gut hyper-permeability and a micro-inflammation response.

2) Donkey milk samples collection

Donkey milk samples were provided from 15 different farms spread over the French territory. After milking, the samples were collected in sterile flasks, immediately frozen, transported to the laboratory under frozen conditions and stored at -18°C before analyses.

3) Microbiological analysis

3.A Microbiological load

Total mesophilic bacteria, lactic acid bacteria (LAB) and thermo-tolerant coliforms were counted to evaluate the health quality of the different raw DM coming from the 15 French farms. For counting, 1 mL of undiluted samples and of each 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dilutions were used. All these analyses were performed in triplicate. The media and the incubation conditions are described in Table 1. Tests of pathogens i.e *Listeria monocytogenes*,

1
2
3 *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* and coagulase positive staphylococcus were conducted in all
4 the samples by SOCSA (L'Union, France). The results were expressed in \log_{10} cfu/mL.
5
6

7 **3.B Microbial enrichment and artificial contamination of selected DM**

8
9 Linked to the low level of microorganisms counted in the "la ferme du Hitton" selected DM,
10 an enrichment of endogenous bacteria and an artificial contamination by *Enterococcus*
11 *faecalis* strain were performed. Briefly, a bacterial smear from donkey milk growth on PCA
12 medium was enriched in a brain-heart medium incubated overnight at 37°C, and several
13 aliquots were stored at -20°C with cryoprotectant. Then, DM was enriched to reach 6.3 \log_{10}
14 cfu/mL of total bacteria in milk. The artificial contamination was done by adding 7.3 \log_{10}
15 cfu/mL *Enterococcus faecalis* strain (El-Purpan collection, Toulouse, France) in DM. Using the
16 different media described in table 1, total bacteria and *Enterococcus faecalis* bacteria were
17 counted before and after the heat treatments tested that do not altered the enzymatic
18 lysozyme activity.
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **3.C Aging test on the pasteurized selected DM**

28
29 An aging test of pasteurized DM (2 min/72°C) was performed in Lanagram laboratories
30 (Mazamet, France). The health and safety criteria were determined in 100 g of DM samples
31 obtained after 1, 7, 10, 15 and 20 days post-heat treatment. More precisely, CFU from total
32 microorganisms (NF EN ISO 4833-1), Enterobacteria (NF V 08-054), B-glucuronidase positive
33 *Escherichia coli* (NF ISO 16649-2), coagulase positive Staphylococci (NF EN ISO 6888-2), and
34 the presence/absence of *Salmonella spp.* (AES 10/11-07/11) and *Listeria monocytogenes*
35 (BKR 23/2-11/02) were monitored.
36
37
38
39
40
41

42 **4) Lysozyme levels and activity**

43 **4.A Concentration of lysozyme**

44
45 The levels of lysozyme were determined by RP-HPLC approach adapted from Herrouin et al.
46 [36] and Vincenzetti et al. [37]. 20 mL of each milk sample were skimmed by centrifugation
47 at 3000g for 30 min at 32°C. Whole caseins were precipitated from the skimmed milk by
48 adjusting the pH to 4.25 with HCl. After centrifugation, the supernatant samples
49 corresponding to the whey proteins were dialyzed against distilled water at 4°C overnight
50 using an Interchim membrane and then freeze-dried and stored at -18°C until analysis. For
51 RP-HPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, France), samples were diluted in
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Buffer A (0.1 M bis-tris, pH 8.0 containing 8M urea, 1.3% trisodium citrate, 0.3% DTT) and
4 1.13 -1.25 μ L of samples were loaded into a 300 Å C8 Zorbax 300SB RP-HPLC column (5 μ m,
5 4.6 mm, 150 mm). The column was equilibrated with Buffer B (TFA 0.1%; H₂O 95%;
6 acetonitrile 5%). Elution was achieved by Buffer B and Buffer C (TFA 0.085%; H₂O 5%;
7 acetonitrile 95%) according to the following gradient: 0-5 min : 100% B; 5-10 min : 80%
8 B/20% C; 10-30 min: 60% B/40% C; 30-35 min 100% B. The flowrate was 1 mL/min. The
9 proteins eluted from RP-HPLC column were monitored at 280 nm by an UV detector
10 (Ultimate 3000 RS diode array detector) included in the HPLC system. The amount of
11 lysozyme was determined by using a calibration curve obtained with a standard chicken egg
12 white lysozyme prepared in Buffer A and expressed in mg/mL.

21 4.B Activity of lysozyme (LZA)

22 Activity of lysozyme (LZA) was assessed using an Enzcheck Lysozyme Assay Kit (Molecular
23 Probes E-22013). The LZA levels reflected by the fluorescence intensity was measured by a
24 spectrofluorometer (TECAN SAS, France) and quantified via a calibration curve obtained with
25 a standard chicken egg white lysozyme. LZA was expressed in U/mL.

31 5) Thermal treatments

32 To optimize the heat treatment, 10 distinct fresh raw milk samples obtained from "La ferme
33 du Hitton" (Biran, France) farm were used. After milking, the samples were collected in
34 sterile flasks, immediately transported to the laboratory at 4°C and heated in water bath at
35 several time/temperature combinations (table 2). Then, samples were rapidly cooled by
36 immersion into cold water. Before and after each heat treatments, the LZA was measured.
37 The total bacteria and the thermo-tolerant bacteria *Enterococcus faecalis* were counted
38 after each heat treatments.

46 6) In vivo experiments

47 6.A Animals

48 Eight weeks-old male C57BL/6 mice (23 \pm 0.5 g) (Janvier, Le Genest St Isle, France) were
49 used. Mice were maintained in pathogen-free animal facilities at a constant temperature (21
50 \pm 2°C) and a 12/12-hour light/dark cycle. Mice have free access to water and to standard
51 rodent pellets (Harlan, pellets containing crude protein 18.6%, crude fat 6.2%, crude ash
52 5.3% and crude fiber 3.5%). In order to minimize any environmental stress, animals were
53 handled for one week prior all the experiments. Animal care and work protocols were
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 approved by the local ethical committee, according to the EU directive 2010/63/EU
4 (Agreements #TOXCOM_0143HE and APAFIS #4972-2016021814258245).
5

6 7 **6.B Water avoidance stress (WAS)**

8
9 Briefly, for WAS procedure, mice were placed during 1 h per day for 9 days on a 3x3 cm
10 platform fixed in the center of a 40x40 cm size pool filled with cold water [38]. Each WAS
11 sessions were performed between 8:00 and 10:00 am. Control mice were submitted to a
12 similar procedure using an empty pool (sham stress).
13
14
15

16 17 **6.C Lipocalin-2 levels**

18 For quantification of lipocalin-2 (LCN2), biomarker for intestinal inflammation, mice fecal
19 materials were collected, mixed in PBS for 20 min to obtain a homogenous fecal suspension
20 [39]. Then the samples were grinded using FastPrep and centrifugated for 10 min at 12.000
21 rpm at 4°C. Clear supernatants were collected and LCN-2 levels were measured using the
22 DuoSet murine LCN-2 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, USA).
23
24
25
26

27 28 **6.D Gut permeability**

29 Isothiocyanate of fluorescein (FITC), is a small (389 Da) fluorescent molecule classically used
30 to measure the total gut permeability [40]. The emitted fluorescence levels present in the
31 plasma after an oral administration of free FITC is a good reflect of the gut permeability
32 status [41]. Mice received on oral solution (250 μ L) of free FITC (Sigma-Aldrich F7250,
33 France). 3 h after FITC administration, blood sample was collected at the facial
34 submandibular vein and centrifuged at 10000 g during 10 min. The emitted fluorescence
35 levels present in the plasma was assessed using a TECAN fluorimeter (485 excitation/528
36 emission) and the obtained values were normalized by the body weight of each mice.
37
38
39
40
41
42
43
44

45 46 **6.E Experimental protocol**

47 Male C57BL/6 mice were divided in 6 distinct groups (n=10 per group): 3 control groups and
48 3 WAS groups. Animals received orally PBS solution or raw DM or pasteurized DM (2
49 min/72°C) (0.2 mL/day, corresponding to 5900 U of LZA) respectively, and body weight of
50 each mouse was daily followed. At the end of the WAS or the sham stress procedure, fecal
51 materials were collected to evaluate the gut inflammatory response translated by the fecal
52 lipocalin-2 (LCN2) levels and the total gut permeability was assessed as described before.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

7. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. For statistical analysis, GraphPad prism 4 (GraphPad, San Diego, CA) was used. For all the experimental studies, multiple comparisons between treatments or animal groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$. To evaluate the correlation between the LZA and the levels of lysozyme, a linear regression was performed to obtain the regression coefficient (R^2).

For Peer Review

RESULTS AND DISCUSSION

1) Characterization of the French raw donkey milk: microbiological quality, lysozyme content and activity

Samples of French raw DM showed low total mesophilic microbial counts ($3.82 \pm 1.56 \log_{10}$ cfu/mL). These values are close to the average range (2.40-5.87 \log_{10} cfu/mL) reported in the literature [4, 20–25, 36]. Moreover, in the 15 DM samples tested, no pathogens were detected above the limit laid down by the European authorities and the French regulations (EC 853/2004 ; Regulations of the 13th of July 2012): absence of *Salmonella spp.*, absence of *Listeria monocytogenes*, less than 1 cfu/mL of *Escherichia coli* and less than 10 cfu/mL for coagulase positive *Staphylococci*. The number of thermo-tolerant coliforms were $2.00 \pm 1.50 \log_{10}$ cfu/mL and the mean number of LAB were $2.17 \pm 1.44 \log_{10}$ cfu/mL, also in agreement with those previously described in literature [2, 24, 37-39]. Therefore, all these data attest that French DM are comparable to Italian, Chinese or Balkan DMs with a good sanitary quality (low microbial load and absence of pathogenic microorganism) and illustrate a good management and hygiene practices in French farms and encourage French farmers to produce milk for human consumption.

Antimicrobial peptides like lysozyme and lactoferrin may be responsible for the low bacterial load, and can exert a positive effect on raw milk storage [24]. The average of lysozyme levels and lysozyme enzymatic activity in the 15 farms samples tested were 2.74 ± 0.88 mg/mL and 17900 ± 1636 U/mL respectively. Although the lysozyme levels mainly depend on the lactation stage and the production season, these concentrations are closed to those described in Italian DM [37, 44]. The month of lactation affects the concentration of lysozyme in DM which results in a high concentration of lysozyme during the first 4 months of lactation and in a reduction thereafter [44]. Similarly, as in human milk, the whey protein concentrations are significantly high at the beginning of the lactation and also decreased with time [44, 45]. Concerning the LZA, linked to the different published methods of analysis used, the results obtained herein cannot be easily compared with those described in the literature. To our knowledge, only few studies have previously used the EnzCheck® assay and illustrate similar LZA levels (15000 U/mL) as those obtained in our study [46]. Interestingly, the LZA levels measured herein are closed to those observed in human breast milk (18000 U/mL) [35].

1
2
3 Besides, no correlation between the enzymatic activity and the levels of lysozyme
4 have been observed in our study (figure 2) suggesting that lysozyme might be present in
5 large quantity with low enzymatic activity in DM. Due to their role in the development of
6 infants, the amount of bioactive proteins in mammals milk is considered important [45, 47].
7
8 In newborns, the major function of lysozyme is to strengthen their immature immune
9 system [48]. The biological properties of lysozyme are supported by two distinct mechanisms
10 of action on bacteria structures, one of the mechanisms involves the enzymatic activity and
11 the second consists of a non-enzymatic mode of action via cationic properties and results in
12 a perturbation of the bacterial cytoplasmic membrane [49]. In a recent work, we have shown
13 gut anti-inflammatory properties of a daily DM consumption in a model of ileitis in mouse
14 [11]. We observed that this dietary intervention required a significant enzymatic lysozyme
15 activity in DM as a key condition to obtain a beneficial effect on gastrointestinal mucosa
16 [11]. Thermal treatments can reduce the nutritional quality of milk, affecting both the
17 molecular structure and the enzymatic activity of milk proteins, such as lysozyme. Based on
18 these observations, we consider the lysozyme enzymatic activity as a biological active
19 marker in DM and focus all our experiments to develop a heat treatment aimed at
20 safeguarding the antimicrobial enzymatic activity of lysozyme. To define and to optimize this
21 heat treatment, we selected one DM coming from a farm where the well breeding and well-
22 being quality of life were combined.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 **2) Effect of thermal treatments on microbiological quality and enzymatic lysozyme** 38 **activity** 39

40
41 Although lysozyme is a temperature-resistant enzyme, heat treatments can significantly
42 reduce its biological activity by 21% to 74% [35, 50–52]. Herein, the LZA measured
43 significantly decreased ($p < 0.05$) according to the time and temperature combinations
44 applied (Figure 3A). The most drastic decrease were observed for 8 min/72°C and 10
45 min/80°C treatments with a reduction of $27.15 \pm 5.32\%$ and $60.79 \pm 11.65\%$ of LZA
46 respectively compared with LZA measured in raw DM (figure 3A). Heat treatment of DM at
47 72°C applied for 4 min induced a reduction of $13.77 \pm 2.70\%$ of LZA compared to raw DM.
48 Pasteurization of DM at 72°C applied for 30 s, 2 or 3 min had no significant impact ($p < 0.05$)
49 on LZA compared with LZA measured in raw DM (figure 3A). Previous studies showed that
50 pasteurization, in the same range of time-temperature treatment, had few impact when
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 compared with raw donkey milk on the content of other interesting compounds of DM like
4 immunoglobulin (IgA, IgG) [4] and vitamin [53].
5
6

7
8 In the raw DM tested the total bacterial load was $3.90 \log_{10}$ cfu/mL. Thermal
9 treatments safeguarding the LZA i.e 30 sec /72°C; 2 min /72°C or 3 min/72°C highly
10 decreased the TBC with a reduction of $2 \log_{10}$ cfu/mL representing less than 100 cfu/mL in
11 heated DM (Figure 3B). Since our selected DM contained a low load of total bacterial and no
12 pathogen strain, to mimic worsen conditions of breeding and milking, two types of DM were
13 produced: a DM enriched with endogenous bacteria (grey bars on Figure 3B) and an
14 artificially DM contaminated with the thermotolerant *E. faecalis* (black bars on Figure 3B).
15 The 30s/72°C treatment reduced the TBC of more than $4 \log_{10}$ cfu/mL (from $6.85 \log_{10}$
16 cfu/mL to $2.53 \log_{10}$ cfu/mL) in the bacteria enriched DM but had a little impact (reduction of
17 less than $2 \log_{10}$ cfu/mL of *E. faecalis*) on the artificially contaminated milk (from $7.56 \log_{10}$
18 cfu/mL to $6.11 \log_{10}$ cfu/mL after treatment). The 2 min/72°C treatment permitted a $2 \log_{10}$
19 cfu/mL reduction of TBC in enriched DM and a $4.2 \log_{10}$ cfu/mL reduction of *E. faecalis* in
20 artificially contaminated DM. Considering the low bacterial load in DM (Table 3), the
21 treatment for 2 min at 72°C was selected since it permitted both to reduce total and
22 thermotolerant *E. faecalis* and preserving LZA in DM.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

3) Aging tests for a safety and freshness guaranties of selected heat treated DM.

According to the safety and hygienic criteria defined by the regulation of food microbiology n°1441/2007 and 852/2004, samples of DM previously submitted to a heat treatment i.e 2 min /72°C were analyzed at different time points. At 20 days post-heat treatment, the total mesophilic bacteria were <10 000 cfu/mL. After 7, 10, 13, 15 and 20 days post-heat treatment no *Listeria monocytogenes* and no *Salmonella* were detected in DM. For suspected Enterobacteria, *Escherichia coli* positive β -glucuronidase and coagulase positive Staphylococci less than 10 cfu/mL were counted; reflecting applicable criteria for DM intended for human consumption. Indeed an adequate heat treatment of milk must (i) make milk and milk products safe for human consumption by reducing the number of viable bacteria that may be harmful to health and (ii) improve the shelf life of milk by reducing the numbers of spoilage bacteria [54]. In our study, the heat treatment applied (2 min /72°C) allows to extend the previous shelf life period described, 3 days at 4°C for raw DM [24], to 20 days at 4°C for heat treated (2 min/72°C) DM. Further, in order to increase even greater the shelf life of milk, a freeze after pasteurization process can be performed. Indeed, pasteurization and freezing after pasteurization are usual procedures carried out for human milk banks. Human breast milk frozen after pasteurization does not present any significant changes of the protein fraction [55]. Pasteurization before freezing also permits to denature enzymes involved in bitter flavor and rancidity of milk during storage [56] and so to improve the taste and flavor of DM.

4) Evaluation of beneficial effects of raw DM vs heat treated DM.

In physiological conditions, oral administration of DM and heated-DM (2 min/72°C), 0.2 mL/day containing similar LZA (5900 U) did not change basal total gut permeability in mouse compared with control animals (4.19 ± 0.68 and 4.04 ± 0.45 vs 2.70 ± 0.28 ng/mL/g, respectively) (Figure 4A). In the same way, both treatments (DM and heated-DM) had no impact on the fecal inflammatory marker lipocalin-2 levels compared to control mice (23.57 ± 6.48 and 13.80 ± 3.09 vs 15.75 ± 2.91 ng/g of feces, respectively) (Figure 3B). In contrast, chronic psychological stress (WAS) sessions induced a significant increase ($p < 0.001$) of total gut permeability to free FITC molecule (10.85 ± 1.06 ng/mL). This increased gut permeability is associated with a significant increase ($p < 0.05$) of lipocalin-2 levels (84.48 ± 36.51 ng/g of feces) assessed in WAS mice. All these gut alterations i.e gut permeability increase and gut

1
2
3 micro-inflammation were significantly counteracted ($p < 0.01$) by both an oral treatment of
4 DM and heated-DM.
5

6
7 Increased intestinal epithelial permeability has been incriminated as a prerequisite in the
8 pathophysiology of irritable bowel syndrome (IBS) [57] and has been also found in animal
9 models of chronic stress [58, 59]. IBS is also associated with mucosal immune stimulation,
10 considered as a micro-inflammatory state associated with increased density of immunocytes,
11 and mast cells into the gut mucosa [60]. Altered mucosal barrier permeability facilitates the
12 entry of toxins and bacteria and is considered to be responsible for the mucosal micro-
13 inflammation [61]. Furthermore, in IBS, increased gut permeability is positively correlated
14 with visceral pain [14] and in rodents the stress-induced gut hyper-permeability was also
15 responsible for visceral hypersensitivity [62]. In this context, intestinal permeability
16 alteration constitute today a clear target in pathophysiological treatment for IBS.
17

18
19 In conclusion, based on the beneficial effect of our defined heat treated DM on WAS-
20 induced intestinal damages and the observations previously published in stress preclinical
21 models and in IBS patients; we propose DM as a drinking intervention against leaky intestinal
22 barrier function due to psychological stressful life events. However, other studies are needed
23 to assess the efficacy and the safety of DM in the management of IBS symptoms and firstly,
24 we suggest to test the correcting effect of DM on a model of stress induced visceral
25 hypersensitivity.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES:

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- [1] Tidona, F., Sekse, C., Criscione, A., Jacobsen, M., et al., Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *Int. Dairy J.* 2011, *21*, 158–165.
 - [2] Šarić, L.Č., Šarić, B.M., Mandić, A.I., Torbica, A.M., et al., Antibacterial properties of Domestic Balkan donkeys' milk. *Int. Dairy J.* 2012, *25*, 142–146.
 - [3] Nazzaro, F., Isolation of Components with Antimicrobial Property from the Donkey Milk: A Preliminary Study. 2010-05-07~2010-07-15~2010-09-02~! *Open Food Sci. J.* 2010, *4*, 43–47.
 - [4] Aspri, M., Economou, N., Papademas, P., Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. *Food Rev. Int.* 2017, *33*, 316–333.
 - [5] Brumini, D., Criscione, A., Bordonaro, S., Vegarud, G.E., et al., Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. *Dairy Sci. Technol.* 2015.
 - [6] Carroccio, A., Cavataio, F., Montalto, G., D'Amico, D., et al., Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 2000, *30*, 1597–1603.
 - [7] Tafaro, A., Magrone, T., Jirillo, F., Martemucci, G., et al., Immunological properties of donkey's milk: its potential use in the prevention of atherosclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 2007, *13*, 3711–3717.
 - [8] Jirillo, F., Jirillo, E., Magrone, T., Donkey's and goat's milk consumption and benefits to human health with special reference to the inflammatory status. *Curr. Pharm. Des.* 2010, *16*, 859–863.
 - [9] Guo, H.Y., Pang, K., Zhang, X.Y., Zhao, L., et al., Composition, Physiochemical Properties, Nitrogen Fraction Distribution, and Amino Acid Profile of Donkey Milk. *J. Dairy Sci.* 2007, *90*, 1635–1643.
 - [10] Mao, X., Gu, J., Sun, Y., Xu, S., et al., Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. *Int. Dairy J.* 2009, *19*, 703–708.
 - [11] Yvon, S., Olier, M., Leveque, M., Jard, G., et al., Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. *Eur. J. Nutr.* 2016.
 - [12] Gottlieb, M.G.V., Closs, V.E., Junges, V.M., Schwanke, C.H.A., Impact Of Human Aging And Modern Lifestyle On Microbiota. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017, *0*, 00–00.
 - [13] Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., et al., Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017, *44*, 94–102.
 - [14] Zhou, Q., Zhang, B., Nicholas Verne, G., Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *PAIN* 2009, *146*, 41–46.
 - [15] Vivinus-Nébot, M., Frin-Mathy, G., Bziouche, H., Dainese, R., et al., Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut* 2013, gutjnl-2012-304066.
 - [16] Lerebours, E., Gower-Rousseau, C., Merle, V., Brazier, F., et al., Stressful Life Events as a Risk Factor for Inflammatory Bowel Disease Onset: A Population-Based Case–Control Study. *Am. J. Gastroenterol.* 2007, *102*, 122–131.
 - [17] Moloney, R.D., Johnson, A.C., O'Mahony, S.M., Dinan, T.G., et al., Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome. *CNS Neurosci. Ther.* 2016, *22*, 102–117.
 - [18] Demaude, J., Levêque, M., Chaumaz, G., Eutamène, H., et al., Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: Involvement of pancreatic trypsin. *Life Sci.* 2009, *84*, 847–852.
 - [19] Ferrier, L., Bérard, F., Debrauwer, L., Chabo, C., et al., Impairment of the Intestinal Barrier by Ethanol Involves Enteric Microflora and Mast Cell Activation in Rodents. *Am. J. Pathol.* 2006, *168*, 1148–1154.

- 1
2
3 [20] Cavallarin, L., Giribaldi, M., Soto-Del Rio, M. de los D., Valle, E., et al., A survey on the milk
4 chemical and microbiological quality in dairy donkey farms located in NorthWestern Italy. *Food*
5 *Control* 2015, *50*, 230–235.
- 6 [21] Malissiova, E., Arsenos, G., Papademas, P., Fletouris, D., et al., Assessment of donkey milk
7 chemical, microbiological and sensory attributes in Greece and Cyprus. *Int. J. Dairy Technol.*
8 2016, *69*, 143–146.
- 9 [22] Pilla, R., Dapr , V., Zecconi, A., Piccinini, R., Hygienic and health characteristics of donkey milk
10 during a follow-up study. *J. Dairy Res.* 2010, *77*, 392–397.
- 11 [23] Salimei, E., Fantuz, F., Coppola, R., Chiofalo, B., et al., Composition and characteristics of ass's
12 milk. *Anim. Res.* 2004, *53*, 67–78.
- 13 [24] Zhang, X.-Y., Zhao, L., Jiang, L., Dong, M.-L., et al., The antimicrobial activity of donkey milk and
14 its microflora changes during storage. *Food Control* 2008, *19*, 1191–1195.
- 15 [25] Sarno, E., Santoro, A.M.L., Di Palo, R., Costanzo, N., Microbiological quality of raw donkey milk
16 from Campania Region. *Ital. J. Anim. Sci.* 2012, *11*, e49.
- 17 [26] Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltsas, D., Hill, C., et al., Raw donkey milk as a source of *Enterococcus*
18 diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*
19 2016.
- 20 [27] Verraes, C., Claeys, W., Cardoen, S., Daube, G., et al., A review of the microbiological hazards of
21 raw milk from animal species other than cows. *Int. DAIRY J.* 2014, *39*, 121–130.
- 22 [28] Kayser, F.H., Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food*
23 *Microbiol.* 2003, *88*, 255–262.
- 24 [29] Kearns, A.M., Freeman, R., Lightfoot, N.F., Nosocomial enterococci: resistance to heat and
25 sodium hypochlorite. *J. Hosp. Infect.* 1995, *30*, 193–199.
- 26 [30] Hébert, L., Courtin, P., Torelli, R., Sanguinetti, M., et al., *Enterococcus faecalis* Constitutes an
27 Unusual Bacterial Model in Lysozyme Resistance. *Infect. Immun.* 2007, *75*, 5390–5398.
- 28 [31] Quigley, L., McCarthy, R., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., et al., The microbial content of raw and
29 pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *J. Dairy Sci.* 2013, *96*, 4928–
30 4937.
- 31 [32] Ewaschuk, J.B., Unger, S., Harvey, S., O'Connor, D.L., et al., Effect of pasteurization on immune
32 components of milk: implications for feeding preterm infants. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2011,
33 *36*, 175–182.
- 34 [33] van der Voorn, B., de Waard, M., Dijkstra, L.R., Heijboer, A.C., et al., Stability of Cortisol and
35 Cortisone in Human Breast Milk During Holder Pasteurization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*
36 2017.
- 37 [34] Narayanan, I., Murthy, N.S., Prakash, K., Gujral, V.V., Randomised controlled trial of effect of
38 raw and holder pasteurised human milk and of formula supplements on incidence of neonatal
39 infection. *The Lancet* 1984, *324*, 1111–1113.
- 40 [35] Sousa, S.G., Delgadillo, I., Saraiva, J.A., Effect of thermal pasteurisation and high-pressure
41 processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human
42 colostrum. *Food Chem.* 2014, *151*, 79–85.
- 43 [36] Herrouin, M., Moll , D., Fauquant, J., Ballestra, F., et al., New genetic variants identified in
44 donkey's milk whey proteins. *J. Protein Chem.* 2000, *19*, 105–116.
- 45 [37] Vincenzetti, S., Polidori, P., Mariani, P., Cammertoni, N., et al., Donkey's milk protein fractions
46 characterization. *Food Chem.* 2008, *106*, 640–649.
- 47 [38] Bradesi, S., Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained
48 visceral hyperalgesia. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 2005, *289*, G42–G53.
- 49 [39] Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M.A., Young, A.N., et al., Fecal lipocalin 2, a sensitive and
50 broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One* 2012, *7*, e44328.
- 51 [40] P. Nejdfor, B.R.W., M. Ekelund, B. Jeppsson, Mucosal in Vitro Permeability in the Intestinal
52 Tract of the Pig, the Rat, and Man: Species- and Region-Related Differences. *Scand. J.*
53 *Gastroenterol.* 2000, *35*, 501–507.
- 54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- [41] Edelblum, K.L., Sharon, G., Singh, G., Odenwald, M.A., et al., The Microbiome Activates CD4 T-cell-mediated Immunity to Compensate for Increased Intestinal Permeability. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2017, *4*, 285–297.
 - [42] Chiavari, C., Coloretti, F., Nanni, M., Sorrentino, E., et al., Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. *Le Lait* 2005, *85*, 481–490.
 - [43] Carminati, D., Tidona, F., Fornasari, M.E., Rossetti, L., et al., Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. *Let. Appl. Microbiol.* 2014, *59*, 299–305.
 - [44] D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Jirillo, E., Leo, V.D., Major whey proteins in donkey's milk: effect of season and lactation stage. Implications for potential dietary interventions in human diseases. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2011, *33*, 259–265.
 - [45] Lönnerdal, B., Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, *77*, 1537S–1543S.
 - [46] Addo, C.N.A., Ferragut, V., Evaluating the Ultra-High Pressure Homogenization (UHPH) and Pasteurization effects on the quality and shelf life of donkey milk. *Int. J. Food Stud.* 2015, *4*.
 - [47] Butte, N.F., Garza, C., Smith, E.O., Nichols, B.L., Human milk intake and growth in exclusively breast-fed infants. *J. Pediatr.* 1984, *104*, 187–195.
 - [48] Cieslak, J., Wodas, L., Borowska, A., Sadoch, J., et al., Variability of lysozyme and lactoferrin bioactive protein concentrations in equine milk in relation to LYZ and LTF gene polymorphisms and expression. *J. Sci. Food Agric.* 2017, *97*, 2174–2181.
 - [49] Masschalck, B., Houdt, R.V., Haver, E.G.R.V., Michiels, C.W., Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Lysozyme, Denatured Lysozyme, and Lysozyme-Derived Peptides under High Hydrostatic Pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, *67*, 339–344.
 - [50] Czank, C., Simmer, K., Hartmann, P.E., Simultaneous pasteurization and homogenization of human milk by combining heat and ultrasound: effect on milk quality. *J. Dairy Res.* 2010, *77*, 183–189.
 - [51] Koenig, Á., Diniz, E.M. de A., Barbosa, S.F.C., Vaz, F.A.C., Immunologic Factors in Human Milk: The Effects of Gestational Age and Pasteurization. *J. Hum. Lact.* 2005, *21*, 439–443.
 - [52] Wills, M.E., Han, V.E.M., Harris, D.A., Baum, J.D., Short-time low-temperature pasteurisation of human milk. *Early Hum. Dev.* 1982, *7*, 71–80.
 - [53] MacDONALD, L.E., Brett, J., Kelton, D., Majowicz, S.E., et al., A systematic review and meta-analysis of the effects of pasteurization on milk vitamins, and evidence for raw milk consumption and other health-related outcomes. *J. Food Prot.* 2011, *74*, 1814–1832.
 - [54] Angulo, F.J., Lejeune, J.T., Rajala-Schultz, P.J., Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat. *Clin. Infect. Dis.* 2009, *48*, 93–100.
 - [55] García-Lara, N.R., Vieco, D.E., De la Cruz-Bértolo, J., Lora-Pablos, D., et al., Effect of Holder Pasteurization and Frozen Storage on Macronutrients and Energy Content of Breast Milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2013, *57*, 377–382.
 - [56] Lemieux, L., Simard, R.E., Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Le Lait* 1991, *71*, 599–636.
 - [57] Spiller, R., Jenkins, D., Thornley, J., Hebden, J., et al., Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000, *47*, 804.
 - [58] Barreau, F., Cartier, C., Ferrier, L., Fioramonti, J., et al., Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats. *Gastroenterology* 2004, *127*, 524–534.
 - [59] Söderholm, J.D., Yang, P.-C., Ceponis, P., Vohra, A., et al., Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 2002, *123*, 1099–1108.
 - [60] Guilarte, M., Santos, J., de Torres, I., Alonso, C., et al., Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut* 2007, *56*, 203–209.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- [61] Hyland, N.P., Quigley, E.M., Brint, E., Microbiota-host interactions in irritable bowel syndrome: Epithelial barrier, immune regulation and brain-gut interactions. *World J. Gastroenterol. WJG* 2014, *20*, 8859.
- [62] Ait-Belgnaoui, A., Bradesi, S., Fioramonti, J., Theodorou, V., et al., Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* 2005, *113*, 141–147.

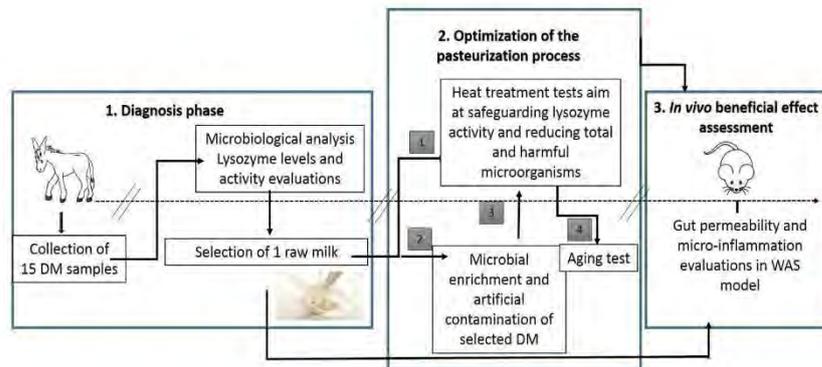
For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

Graphical Abstract

Microbiological quality, lysozyme content and activity were firstly characterized in 15 DM. Different heat-treatment assays were assessed to define a relevant time/temperature combination. A 2 min/72°C treatment allowed to preserve the LZA and to increase the shelf-life of DM. This heat-treated milk orally administered in C57BL/6 mice counteracted chronic water avoidance stress intestinal damages illustrated by gut hyper-permeability and micro-inflammation.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25



Graphical Abstract - Image

336x139mm (150 x 150 DPI)

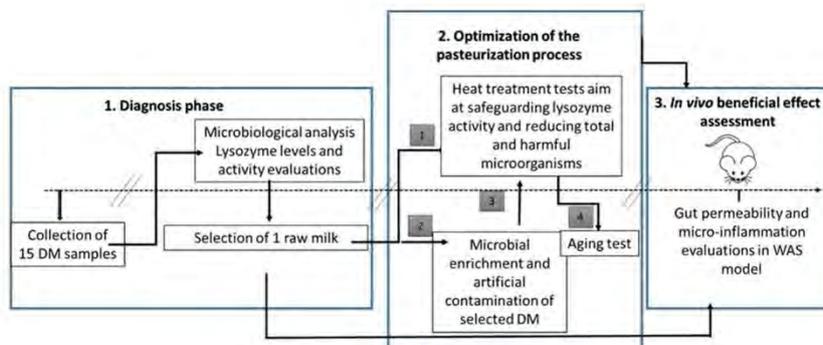


Figure 1: experimental design.

164x68mm (150 x 150 DPI)

Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1: Experimental conditions of microbiological analysis.

Groups of microorganisms	Media	Incubation conditions	Inoculation method
Total bacterial count (TBC)	Plate Count Agar (PCA) + 0.1% of skin milk powder (Biokar)	30°C, 72 h	Inclusion (1 mL)
Thermotolerant coliforms	Violet Red Bile Lactose (Biokar)	44°C, 48 h	Inclusion (1 mL)
Lactic Acid Bacteria (LAB)	Elliker modified by Chamba (1981) pourpre de bromocrésol (Acros Organics) + thallium acetate (Sigma)	30°C, 72 h	Surface (100 µL)
Total staphylococci	Blood agar (Colombia)	37°C, 48 h	Surface (100 µL)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Brain-heart infusion Agar 15% (Biokar)	37°C, 48 h	Surface (100µL)

Table 2: Heat treatment conditions.

	temperature	time
1	72°C	30 sec
2	72°C	2 min
3	72°C	3 min
4	72°C	4 min
5	72°C	8 min
6	80°C	10 min

Table 3: Microbiological characteristics and lysozyme content and activity of French raw donkey milk.

	Bacterial count (log ₁₀ cfu/mL)
Total mesophilic bacteria	3.82 ± 1.56
Lactic Acid Bacteria	2.17 ± 1.44
Thermo-tolerant coliforms	2.00 ± 1.50
Staphylococci (coagulase positive)	< 10 cfu/mL
<i>Escherichia coli</i>	< 1 cfu/mL
<i>Salmonella spp.</i>	0 in 10g
<i>Listeria monocytogenes</i>	0 in 10g
	Lysozyme
Level (mg/mL)	2.74 ± 0.88
Activity (U/mL)	17900 ± 1636

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

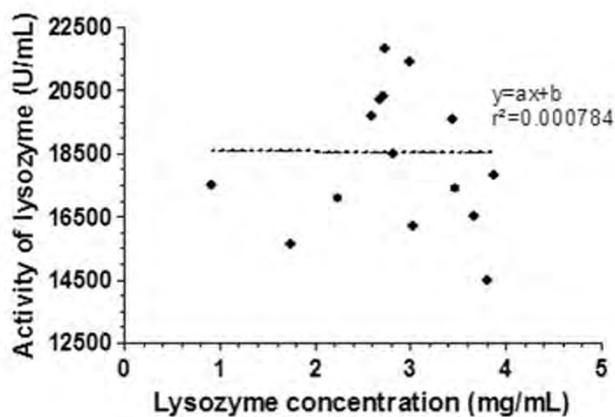


Figure 2: No correlation between enzymatic activity (U/mL) and concentration of lysozyme (mg/mL). Linear regression: $r^2=0.000784$ indicating that the equation of the regression line determines 0.0784% of the distribution of points.

110x74mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

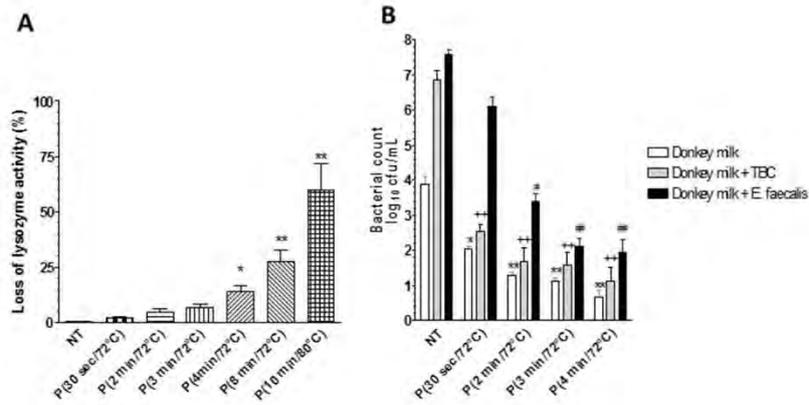


Figure 3: Incidence of thermal treatments on (A) enzymatic lysozyme activity and on (B) total bacterial count in enriched donkey milk. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared to bacteria enriched raw milk. ++: $p < 0.01$ compared to raw donkey milk + TBC. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ compared to *E. faecalis* contaminated raw milk.

188x96mm (96 x 96 DPI)

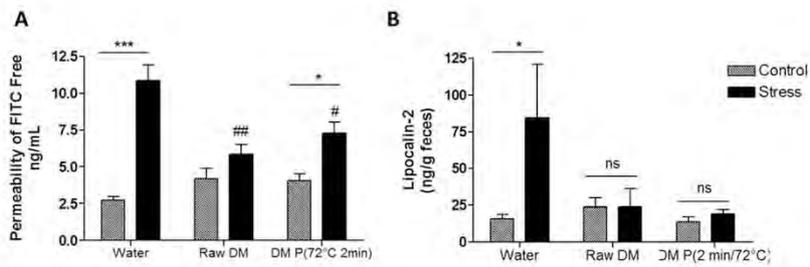


Figure 4: Effect of a consumption of raw donkey milk and pasteurized donkey milk on gut permeability of FITC (A) and on fecal lipocalin-2 levels (B) in a model of chronic stress in mouse. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ compared to stress. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ compared to water + stress.

180x61mm (150 x 150 DPI)

Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION
GÉNÉRALE,
CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En raison d'un impératif socio-économique exprimé par l'Institut National Âne et Mulet de structurer et développer une filière autour de la production de lait d'ânesse destinée à l'alimentation humaine, il est nécessaire aujourd'hui de démontrer scientifiquement les propriétés santé de ce lait pour une meilleure valorisation (INAM, 2014). Ainsi, ce travail de thèse s'inscrit dans un projet collaboratif tripartite. Il s'appuie sur l'expertise scientifique d'une part de l'équipe « Neuro-gastroentérologie et Nutrition » de l'UMR 1331 INRA Toxalim qui étudie la modulation de la barrière intestinale par des facteurs endogènes (neuromédiateurs, hormones ...) et endoluminaux (xénobiotiques, probiotiques ...); et d'autre part de l'équipe « Agroalimentaire et Nutrition » de l'école ingénieurs de Purpan, qui vise à élaborer des procédés de fabrication de produits alimentaires à haute valeur ajoutée.

Handicapantes, chroniques et taboues, les maladies digestives constituent un problème de santé publique majeur, d'autant qu'elles connaissent une incidence et une prévalence en constante augmentation, notamment chez les jeunes adultes dans nos pays industrialisés (Ananthakrishnan, 2015; Canavan et al., 2014). Différents types de pathologies digestives sont aujourd'hui décrites comme les « Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin » (MICI), qui regroupent les maladies de type organique liées à l'inflammation de l'intestin comme la maladie de Crohn (MC) et la Rectocolite Hémorragique, et non organique comme le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII), colopathie fonctionnelle pour laquelle une inflammation de bas-grade de l'intestin est décrite.

La MC se caractérise par l'alternance de phases de poussées et de rémission de durée et de fréquence variables. Elle est multifactorielle et sa physiopathologie est influencée par une susceptibilité génétique, des conditions environnementales telles que l'alimentation et le stress, un dysfonctionnement immunitaire et un microbiote intestinal altéré (Ananthakrishnan, 2015; Anumakonda et al., 2007; Sartor and Muehlbauer, 2007). Le SII est une pathologie chronique, à forte prévalence, dont le symptôme majeur est la douleur viscérale (Khan and Chang, 2010). Parmi les mécanismes physiopathologiques périphériques, décrits dans la MC et du SII, figurent une augmentation de la perméabilité intestinale, des modifications qualitatives et quantitatives du microbiote ainsi qu'une inflammation de grade plus ou moins important de l'intestin (Minderhoud et al., 2004; Spiller and Major, 2016). Le stress est fortement impliqué dans l'exacerbation des symptômes du SII et la rechute de la MC (Anumakonda et al., 2007; Bitton et al., 2008; Gaber, 2016; Greenwood-Van Meerveld et al., 2016; Laine et al., 2016). L'étude des mécanismes impliqués dans la rupture de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale ont été permis à l'aide

de différents modèles chez le rongeur : modèles inflammatoires mimant la symptomatologie de la MC (Hibi et al., 2002) ou modèles de stress mimant la symptomatologie du SII (Fioramonti and Gebhart, 2007).

- Choix et modalités de l'administration de lait d'ânesse

Nous avons choisi le lait d'ânesse en raison des données publiées sur cette matrice alimentaire, montrant sa forte teneur en peptides antimicrobiens (Guo et al., 2007), sa capacité à renforcer le système immunitaire (Jirillo et al., 2010) et ses potentielles propriétés anti-inflammatoires décrites par Jirillo et ses collaborateurs (Jirillo and Magrone, 2014). Dans ces travaux de thèse, nous avons démontré les effets bénéfiques du lait d'ânesse sur le tractus gastro-intestinal à l'aide de deux types de modèles : un modèle inflammatoire lié à l'administration d'indométacine et un modèle de stress chronique (WAS). Dans le modèle inflammatoire, le lait d'ânesse a été administré par voie orale, de manière curative pendant 7 jours consécutifs à la dose de 0,2 mL deux fois par jour (matin et soir). Ce traitement équivaut à l'ingestion d'un verre de lait de 100 mL chez l'Homme (Reagan-Shaw et al., 2008). La dose journalière représentait 11800 unités d'activité de lysozyme dans 0,4 mL de lait d'ânesse. Le choix de travailler en administrant une activité constante de lysozyme et non pas une concentration constante a été basée sur nos résultats montrant qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'activité et la concentration de lysozyme dans le lait d'ânesse. De plus, pendant la phase de mise au point du modèle indométacine, un traitement préventif-curatif avait été initié mais provoquait une exacerbation de l'état inflammatoire de nos animaux après induction de l'iléite par l'administration d'indométacine. Au contraire, un traitement curatif ne présentait pas la même issue pour les animaux laissant suggérer que l'apport en lysozyme à travers le lait d'ânesse était pertinent en conditions stimulées. Aussi, force de ces observations, dans le modèle de stress chronique, le lait d'ânesse a été également administré par voie orale de manière curative pendant 11 jours consécutifs à la dose quotidienne réduite à 0,2 mL (5900 UI d'activité du lysozyme) représentant une dose équivalente humaine de 50 mL/jour pour un adulte (Reagan-Shaw et al., 2008).

- Effet du lait d'ânesse en condition physiologique

Le lait d'ânesse est le lait qui, vis à vis de sa composition biochimique, ressemble le plus au lait maternel humain et connaît un intérêt nutritionnel pour l'Homme grandissant. Lié à ses propriétés physico-chimiques et à sa valeur nutritionnelle, le lait d'ânesse a récemment été suggéré comme un facteur alimentaire sain pour les nourrissons, les adultes et les personnes âgées (Guo et al., 2007; Jirillo et al., 2010; Salimei and Fantuz, 2012; Tafaro et al., 2007). Cette matrice alimentaire possédant une faible valeur lipidique totale, mais des taux d'acides gras polyinsaturés (AGPI) importants (Gastaldi et al., 2010), contient des niveaux élevés de facteurs de croissance (Brumini et al., 2015). Il contient

également une souche bactérienne d'intérêt : *Lactobacillus plantarum* qui peut être considéré comme une souche probiotique (Murua et al., 2013). De plus, son activité antibactérienne a été étudiée de manière approfondie (Fratini et al., 2016; Šarić et al., 2012; Zhang et al., 2008). Elle peut inhiber le développement de microorganismes pathogènes et limiter la détérioration du lait. Parmi les composants actifs, le lysozyme, principalement présent dans la fraction des protéines solubles du lait d'ânesse, est responsable de nombreux effets bénéfiques décrits. Il contribue notamment à la réduction de la prolifération d'une lignée cellulaire tumorale issue d'un adénocarcinome pulmonaire *in vitro* (Mao et al., 2009).

Dans nos travaux de thèse, nous avons mis en avant qu'une administration orale de 7 jours de lait d'ânesse (0,4 mL – 11800 UI d'activité de lysozyme), à l'état basal, augmente de manière significative les niveaux de lysozymes contenus dans les cellules de Paneth chez la souris. En conditions physiologiques, les peptides antimicrobiens produits par les cellules de Paneth sont libérés dans la lumière intestinale où ils jouent un rôle central dans la régulation du microbiote intestinal (Muniz et al., 2012). Toutefois, les mesures de l'activité du lysozyme ne témoignent pas d'un relargage du lysozyme dans la lumière intestinale (figure 4 de l'article (Yvon et al., 2016)). Ainsi, en conditions physiologiques, le traitement oral au lait d'ânesse stimule l'immunité intestinale innée, illustrée par une augmentation du stockage du lysozyme contenu dans les cellules de Paneth, non relargué dans la lumière intestinale en conditions physiologiques.

De plus, des données non détaillées dans la thèse plaident en faveur d'une stimulation systémique et locale par une administration de 0,4 mL (11800 UI) pendant 7 jours de lait d'ânesse. Ces données sont illustrées par une splénomégalie (Figure 29 A) et par une augmentation de la taille des plaques de Peyer (Figure 32 B). Chez l'Homme, l'administration de 200 mL/jour pendant un mois de lait d'ânesse chez des sujets âgés sains stimule la réponse immunitaire, illustrée par des modifications des niveaux d'IL-10, de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-8 dans le sang (Amati et al., 2010). Dans ce contexte il serait intéressant d'explorer la stimulation du système immunitaire systémique au niveau de la rate, et local au niveau des plaques de Peyer et des nœuds mésentériques lymphatiques. Le profil lymphocytaire pourrait être analysé par cytométrie en flux afin de définir le type de population en lymphocytes stimulé par le lait d'ânesse. De même, il serait intéressant d'analyser le profil des cytokines induit suite à une administration de lait d'ânesse en dosant les taux de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α ; IL-1 β ; IL-4 ; IL-6 ; IL-17A ; IL-12 ; IL-13 ; IL-22 ; IL-23) et anti-inflammatoires (TGF- β ; IL-10 ...) au niveau de la muqueuse intestinale.

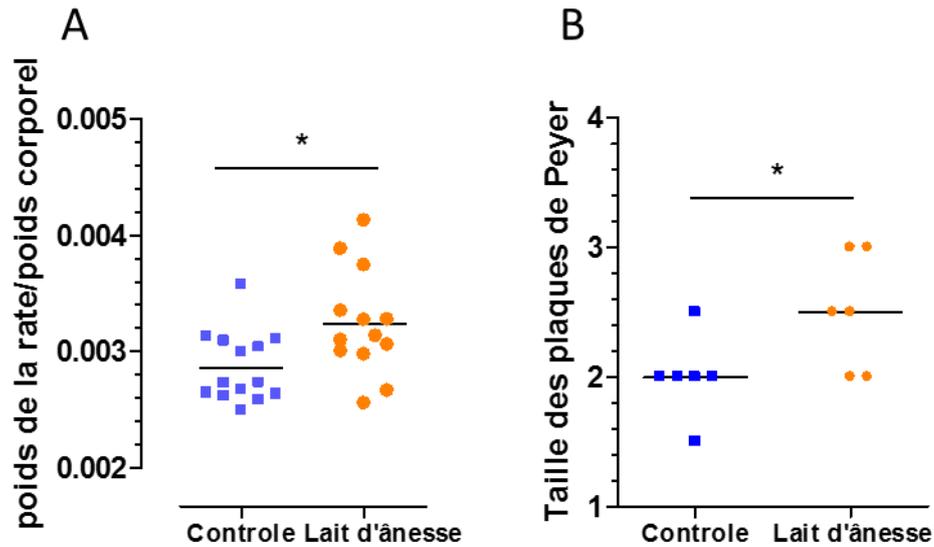


Figure 32 : Stimulation du système immunitaire (A) systémique au niveau de la rate et (B) local au niveau des plaques de Peyer par le lait d'ânesse en conditions physiologiques.

Dans notre étude, la méthode GULDA (qPCR) ne permet pas d'observer des différences significatives du profil microbien fécal chez la souris suite à l'administration chronique de lait d'ânesse à la dose de 0,4 mL/jour pendant 7 jours en conditions physiologiques. Cependant, la technique de séquençage du microbiote fécal met en évidence qu'une administration chronique de 11 jours de lait d'ânesse à la dose de 0,2 mL/jour entraîne une augmentation des *Bifidobactéries* chez la souris. De même, Trinchese et ses collaborateurs ont mis en avant des modulations du microbiote fécal analysé par pyroséquençage chez des rats traités au lait d'ânesse pendant 4 semaines qui se traduit par une diminution du phylum *Verrumicrobia* et une augmentation des genres *Lactococcus* et *Streptococcus* par rapport aux rats contrôles (Trinchese et al., 2015). Il semblerait donc que la durée de traitement soit importante pour observer des modifications quantifiables. Dans cette étude, le lien entre les changements dans la composition du microbiote fécal et les paramètres métaboliques de l'hôte après traitement au lait d'ânesse ont été mis en évidence grâce un coefficient de corrélation de Spearman et montrent que les genres *Streptococcus* et *Lactococcus* sont corrélés négativement avec les marqueurs inflammatoires circulants (LPS et TNF- α) (Trinchese et al., 2015). Parmi les métabolites produits par le microbiote intestinal, ces auteurs montrent une augmentation significative des AGCC (butyrate et propionate) chez les rats traités au lait d'ânesse et suggèrent l'implication de ces derniers dans les effets bénéfiques observés chez ces animaux (Trinchese et al., 2015).

L'ensemble de ces résultats obtenus en conditions physiologiques suggèrent qu'une matrice riche en lysozyme (le lait d'ânesse) est susceptible d'impacter positivement les défenses immunitaires de l'hôte en favorisant la charge des cellules de Paneth en peptides antimicrobiens et en modulant le microbiote intestinal en augmentant la population en *Bifidobactéries*.

- Effet du lait d'ânesse en condition inflammatoire : modèle d'iléite

Lors de nos travaux, nous avons opté pour un modèle d'iléite modérée basé sur l'administration orale d'un agent anti-inflammatoire non-stéroïdien (AINS) : l'indométacine. Ce composé chimique est décrit pour causer des dommages variables à l'intestin grêle selon la dose, le temps d'exposition et la voie d'administration (Craven et al., 2012). Chez la souris, l'administration par voie orale d'une dose de 1 mg/jour/souris pendant 5 jours d'indométacine induit une inflammation iléale via une altération du microbiote intestinal mimant la réponse inflammatoire observée chez les patients souffrant de la MC (Craven et al., 2012). Chez les rats axéniques, les AINS ne provoquent aucun dommage au niveau de l'intestin grêle (Robert and Asano, 1977) ainsi que chez les animaux traités par des antibiotiques (Konaka et al., 1999). Chez l'Homme, ces observations sont également corroborées. En effet, les microorganismes luminaux sont décrits pour interagir avec les AINS et favoriser une augmentation de la perméabilité intestinale (Bjarnason et al., 1984; Fujimori et al., 2010). L'ingestion d'AINS est connue pour provoquer une rechute chez les patients atteints de MICI (Takeuchi et al., 2006). Au cours de nos travaux préliminaires, nous n'avons pas réussi à reproduire le modèle d'iléite induit par l'administration d'indométacine décrit par Craven et ses collaborateurs (1 mg/jour/souris) (Craven et al., 2012). En effet, nous nous sommes confrontés à une forte mortalité des animaux, nous incitant à revisiter le protocole expérimental en réduisant la dose administrée. Ainsi, dans notre étude, chez les souris mâles C57BL/6 adultes, l'administration orale d'indométacine (0,25 mg/souris pendant 5 jours) provoque une iléite modérée chez la souris. Cet état inflammatoire est caractérisé par une baisse du poids corporel, une réduction de la longueur de l'intestin grêle, une augmentation de la lipocaline-2 fécale (marqueur inflammatoire) et des scores lésionnels macroscopiques et microscopiques accompagné d'une dysbiose.

Dans notre modèle d'iléite, la dysbiose a été caractérisée au niveau fécal par la méthode GULDA et se traduit par une réduction des *Firmicutes Clostridium coccoïdes* et une augmentation significative de *Enterococcus spp* et *Akkermansia muciniphila*. Une diminution des *Firmicutes* ainsi qu'une augmentation significative des *Enterococci* sont également décrites dans les selles provenant de patients atteints de la MC comparé à des sujets sains (Rajca et al., 2014; Sokol et al., 2006; Willing et al., 2010). Concernant le rôle d'*Akkermansia muciniphila*, les données dans la littérature sont controversées. Sa présence aurait un rôle protecteur dans des modèles métaboliques d'obésité et de diabète de type 2 en réduisant le développement de la masse grasseuse, la résistance à l'insuline et la dyslipidémie chez la souris (Plovier et al., 2017). Au contraire, un effet délétère de ce microorganisme dans des modèles inflammatoires a été observé. En effet, Ganesh et ses collaborateurs montrent qu'*Akkermansia muciniphila* commensale exacerbe l'inflammation intestinale induite par *Salmonella typhimurium* se traduisant par une augmentation des scores inflammatoires histologiques ainsi qu'une

augmentation des niveaux d'ARNm de l'IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-17 et IL-6 dans les tissus coliques (Ganesh et al., 2013). Les MICI provoquent souvent une augmentation de la teneur en mucus dans les selles. *Akkermansia muciniphila* exerce des propriétés mucolytiques *in vitro* (Derrien et al., 2010) et est impliquée dans une boucle de rétroaction positive en stimulant le renouvellement du mucus (Belzer and de Vos, 2012). Récemment, une capacité de liaison accrue d'*A. muciniphila* aux mucines provenant de patients atteints d'une RCH a été démontrée par rapport aux mucines saines (Earley et al., 2015). Bien que la structure chimique des mucines n'ait pas été caractérisée dans notre étude, l'ensemble de ces données suggèrent une modulation de la composition du mucus dans notre modèle d'iléite conduisant à une capacité accrue d'*A. muciniphila* à se lier à ce mucus. De plus, il serait intéressant d'étudier l'expression des cellules à mucus dans notre modèle. En effet, dans la MC, les cellules caliciformes et les cellules de Paneth présentent des signes de dysfonctionnement grave, caractérisés par la perte de leurs granules et de leur intégrité cellulaire (Cadwell et al., 2008; Strugala et al., 2008) et peuvent être contrecarrés grâce à une thérapie anti-TNF (Suenart et al., 2002). Une injection de TNF α , cytokine pro-inflammatoire, provoque un dysfonctionnement des cellules de Paneth se traduisant par une réduction drastique des granules stockées (Van Hauwermeiren et al., 2015). Aussi, il aurait été intéressant de mesurer l'expression de cette cytokine au niveau de l'iléon dans notre modèle afin de compléter les données mécanistiques. En effet, dans notre modèle d'iléite, nous avons constaté une réduction significative des peptides antimicrobiens endogènes contenus dans les cellules de Paneth illustrée par une réduction de 55% de l'expression des α -défensines et des lysozymes sans affecter le nombre de cellules de Paneth présent au niveau de la crypte iléale par rapport aux animaux contrôles. Comparée aux sujets sains, une diminution de l'expression des α -défensines 5 et 6 dans les cellules de Paneth iléales de patients MC a été décrite (Simms et al., 2008; Wehkamp et al., 2005, 2007). De plus, chez des souris SPF-TNF Δ ARE, connues pour développer une inflammation de type MC avec une atteinte iléale prédominante, une réduction significative de lysozyme dans les cryptes iléales a été récemment décrite (Schaubeck et al., 2016). Ainsi, l'ensemble de ces données montrent que l'iléite est associée à une réduction de la fonction des cellules de Paneth plutôt que de leur nombre. En accord avec les données de la littérature, nos résultats renforcent la possibilité intéressante que les cellules de Paneth sont des acteurs importants dans la physiopathologie de la MC.

Ici, nous montrons qu'une intervention orale chronique d'une matrice alimentaire naturelle contenant des niveaux élevés de lysozyme, *i.e.* le lait d'ânesse, exerce des propriétés anti-inflammatoires dans ce modèle d'iléite chez la souris. Nos résultats mettent en évidence que cet effet est associé à une normalisation des niveaux de peptides antimicrobiens (lysozyme et α -défensines) contenus dans les cellules de Paneth ainsi qu'à une réduction de la dysbiose associée à l'iléite. En effet,

nous avons montré qu'une intervention chronique de lait d'ânesse normalise en partie les populations de *Firmicutes Clostridium coccoïdes* et *Akkermansia muciniphila* dans les fèces des souris souffrant d'iléite, contrecarrant en partie la dysbiose causée par l'indométacine. L'amélioration des symptômes de l'iléite observée après une intervention orale de lait d'ânesse pourrait être liée à la réduction de la dysbiose elle-même liée à la normalisation de l'expression des α -défensines et des niveaux de lysozymes dans les cellules de Paneth. Ces résultats illustrent que la consommation de lait d'ânesse, riche en lysozyme, restaure la fonctionnalité des cellules de Paneth (Figure 33).

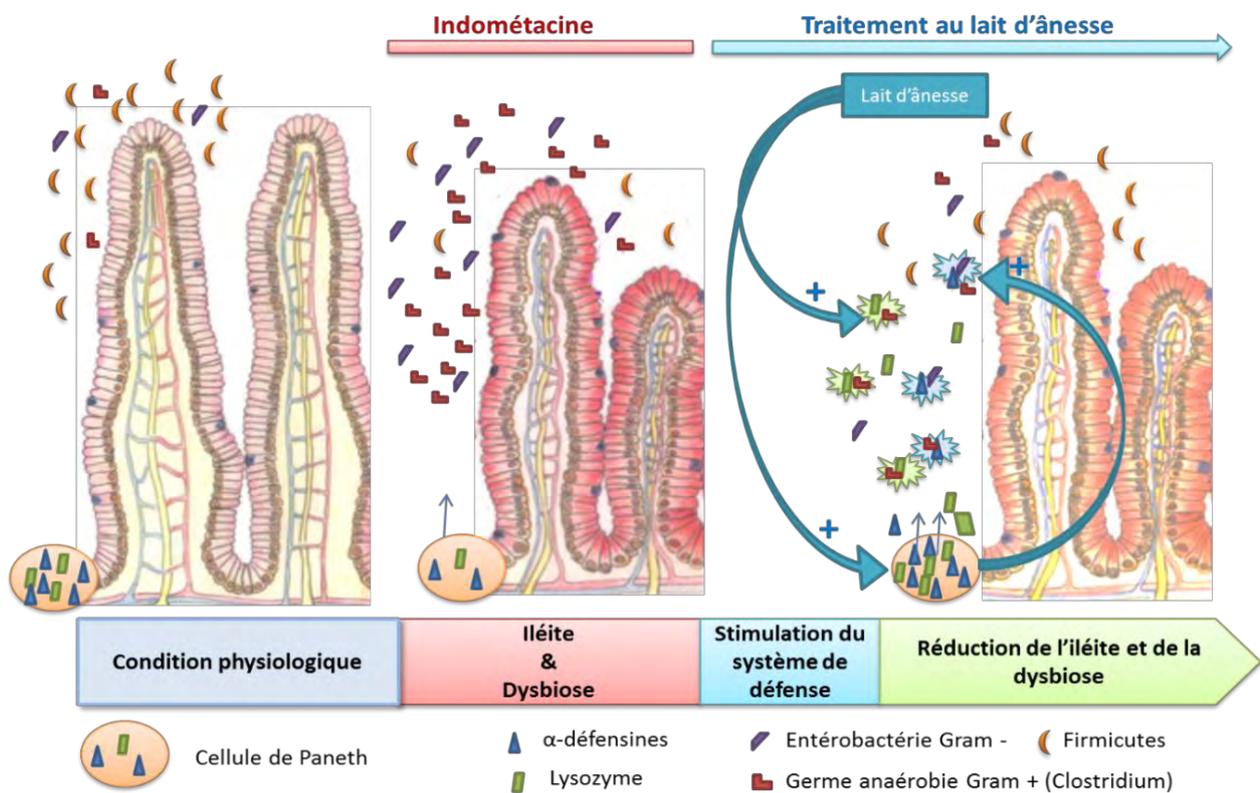


Figure 33 : Le lait d'ânesse stimule la sécrétion en peptides antimicrobiens et réduit l'inflammation iléale.

De plus, dans un modèle transgénique de porc produisant du lysozyme humain dans le lait, le lysozyme humain inhibe la croissance de *E. coli* dans l'intestin grêle du porcelet allaité (Lu et al., 2014). De même, la consommation de lait provenant de chèvres transgéniques contenant du lysozyme humain recombinant peut potentiellement favoriser l'enrichissement du microbiote intestinal et réduire la population de micro-organismes pathogènes (Maga et al., 2012). Enfin, les tissus intestinaux des nourrissons souffrant d'entérocolite nécrosante (NEC) ont moins de cellules intestinales productrices de lysozyme par rapport aux nourrissons en bonne santé (Coutinho et al., 1998) avec une incidence de cette pathologie réduite chez les nourrissons allaités (Lucas and Cole, 1990). Dans ce contexte il serait intéressant d'étudier les impacts d'une consommation de lait d'ânesse, riche en lysozyme, chez ces nourrissons.

- Effet du lait d'ânesse en condition de stress chronique : modèle WAS

Dans cette étude, nous avons opté pour le modèle de stress psychologique chronique d'évitement passif de l'eau (WAS), validé dans la littérature (Bradesi, 2005). La durée des sessions de stress que nous avons appliqué était de 9 jours non consécutifs. Dans la littérature, des périodes de stress chronique de 4, 5 ou 10 jours ont été pratiquées selon les auteurs (Bonaz and Taché, 1994; Bradesi, 2005; Da Silva et al., 2014; Fourie et al., 2017; Rojas-Macías et al., 2010). Une augmentation de la perméabilité intestinale dès le 3^{ème} jour de WAS dans un modèle d'une durée de 5 jours a été décrite (Santos et al., 2001). Une hypersensibilité viscérale est également décrite et persiste pendant un mois après les sessions de WAS (Bradesi, 2005). Ainsi, le stress psychologique chronique chez le rat entraîne une altération robuste et durable de la nociception viscérale (Bradesi, 2005).

Dans notre étude, nous avons retrouvé une hyperperméabilité intestinale ainsi qu'une hypersensibilité viscérale validant ainsi le modèle dans les conditions choisies (9 jours non consécutifs). Dans notre modèle, le stress chronique altère la barrière intestinale traduite par une augmentation de la perméabilité paracellulaire au FITC et conduit à une inflammation de bas grade illustrée par une faible augmentation de lipocalin-2 fécale, contribuant au développement d'une hypersensibilité viscérale chez les souris mâles adultes. En effet, les niveaux de lipocalin-2 atteignent 50 ng/g de feces chez les souris soumises au stress versus 10 ng/g de feces chez les témoins. Ces taux de lipocalin-2 reflètent un état micro-inflammatoire en comparaison à ceux retrouvés lors d'une inflammation plus sévère induite par l'indométacine (4000 ng/g de feces). De même, une expression de la lipocalin-2 supérieure à 10000 ng/g de feces dans un modèle d'inflammation au DSS 4% chez la souris a été décrite (Chassaing et al., 2012). Ces altérations, constatées suite à un stress chronique WAS, sont restaurées lorsque les animaux ont reçu par voie orale du lait d'ânesse et la fraction contenant le lysozyme. Dans notre modèle, la fraction de lait d'ânesse contenant le lysozyme permet également de réduire l'hypersensibilité viscérale et l'augmentation de la perméabilité intestinale.

Dans notre étude, nous observons une augmentation des sérines protéases dans les matières fécales des animaux soumis au stress chronique. Les sérines protéases telles que la trypsine et la tryptase, sont décrites pour activer les récepteurs PAR-2. Chez l'Homme et la souris, le récepteur PAR-2 est fortement exprimé dans le tractus gastro-intestinal et peut contribuer au développement de l'hypersensibilité viscérale observée dans le SII (Bueno and Fioramonti, 2002; Collins et al., 2001; Vergnolle, 2005, 2008). L'activation des PAR-2 provoque une hypersensibilité viscérale (Vergnolle, 2008; Yoshida and Yoshikawa, 2008) ainsi qu'une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale (Gecse et al., 2008). De plus, une administration chronique de lait d'ânesse et de la fraction de lait d'ânesse contenant le lysozyme restaure le niveau d'activité des sérines protéases. Aussi, il

aurait été intéressant d'évaluer la modulation de l'expression des PAR-2 dans notre modèle WAS chez les animaux traités ou non au lait d'ânesse.

Nos travaux montrent également que le WAS réduit l'expression iléale du lysozyme dans les cellules de Paneth des animaux, sans modification du nombre de cellules. Les cellules de Paneth sont sensibles au stress (Estienne et al., 2010). Les cellules de Paneth produisent et sécrètent diverses protéines ou peptides antimicrobiens comme la phospholipase A2, les lectines Reg3 et les α -défensines. Il aurait été intéressant d'évaluer les niveaux d'expression des autres PAMs produits par les cellules de Paneth dans notre modèle de WAS. Une réduction de l'expression des ARNm codant pour les α -défensines a été mise en avant dans notre modèle d'inflammation iléale mais pas dans le modèle WAS. Il serait intéressant de mesurer à l'avenir dans le modèle de stress chronique non pas l'expression des ARNm des α -défensines mais de la protéine mature. Des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm peuvent apparaître, se traduisant par des modifications de sa stabilité ou de sa capacité à être traduit. Toutefois, à ce jour, le manque d'outils moléculaires ne permet pas ce type d'approches.

Récemment, Riba et ses collaborateurs ont montré qu'un stress de séparation maternelle chez la souris imitant les symptômes retrouvés chez les patients souffrants du SII, induisait une perte de fonction des cellules de Paneth se traduisant par une réduction de l'expression du lysozyme (Riba et al., 2017). Dans cette étude, les souris développent également une hypersensibilité viscérale ainsi qu'une dysbiose du microbiote intestinal caractérisée par une prolifération d'*Escherichia coli*. L'ensemble de ces résultats ainsi que les données de la littérature suggèrent que le microbiote intestinal est impliqué dans la pathogénèse du SII. Dans le modèle WAS, une diminution des *Bifidobactéries* a été observée par la méthode de séquençage des ARNr 16S. Cette diminution n'a pas été constatée dans notre étude lorsque l'analyse du microbiote fécal a été réalisée au préalable avec la méthode GULDA (données non montrées). En effet, ces deux méthodes diffèrent par leur sensibilité et leur technique d'approche. La méthode GULDA est une technique d'analyse basée sur la PCR et conçue pour une analyse spontanée d'ARNr 16S de cibles microbiennes choisies au préalable selon les données de la littérature. Les gènes cibles représentent des phyla, des genres, des espèces ou d'autres groupes taxonomiques importants dans les cinq phyla bactériens prédominants de l'intestin, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et *Verrucomicrobia*. Le séquençage est une technique plus sensible et permet d'identifier sans a priori tous les ARNr 16S présents dans l'échantillon.

La diminution de la population en *Bifidobactéries* induite par le stress a été normalisée à des niveaux similaires à ceux retrouvés chez les animaux contrôles à la fois par un traitement au lait

d'ânesse et par un traitement avec la fraction contenant le lysozyme. Le rôle des composés antimicrobiens dérivés des cellules de Paneth ne se limite pas à l'intestin grêle où ils sont produits et sécrétés, mais se prolongent dans la lumière du côlon (Mastroianni and Ouellette, 2009; Mastroianni et al., 2012; Nakamura et al., 2013). Ainsi, l'analyse du profil du microbiote dans les matières fécales est pertinente et permet de comparer les résultats obtenus avec les données de la littérature. Cependant il aurait été intéressant d'analyser le profil microbien dans les parties hautes du tube digestif, notamment au niveau de l'iléon dans nos modèles. Nous montrons qu'une administration chronique de lait d'ânesse induit un effet bifidogène. Une augmentation de la population en *Bifidobactéries* est généralement associée à une stimulation de la synthèse d'acides gras à chaîne courte (AGCC), notamment de butyrate, un des nutriments « carburant » des colonocytes, et de propionate à effet favorable sur les métabolismes glucidique et lipidique (Hurst et al., 2014; Miller and Wolin, 1996). Ces AGCC permettent le maintien de l'intégrité de la muqueuse colique, la stimulation des échanges d'eau et d'électrolytes à travers la paroi, et régulent les interactions bactériennes (Besten et al., 2013). En complément, il aurait été intéressant d'évaluer les taux d'AGCC dans le modèle WAS chez les animaux traités ou non au lait d'ânesse.

Le mécanisme impliqué dans le défaut fonctionnel de la cellule de Paneth observé dans les modèles d'indométacine et de stress chronique reste à définir. Toutefois, comme discuté plus haut, des données suggèrent l'implication du TNF- α (Van Hauwermeiren et al., 2015). Il serait intéressant de mesurer les taux de cette cytokine pro-inflammatoire dans ce modèle de stress chronique chez les animaux traités ou non au lait d'ânesse. En effet, un stress de séparation maternelle augmente chez la souris la concentration iléale de TNF- α qui pourrait être responsable du dysfonctionnement des cellules de Paneth et de la dysbiose observés (Riba et al., 2017). Cependant, la source de la concentration accrue de TNF- α dans ce modèle reste inconnue et justifiera d'autres recherches.

- Pasteurisation du lait d'ânesse afin de conserver l'activité du lysozyme tout en répondant aux normes microbiologiques sanitaires

Le lait d'ânesse est depuis longtemps consommé dans différentes cultures, il est parfois qualifié de boisson de choix pour les nourrissons européens ainsi que pour les personnes âgées chinoises (Ragona et al., 2016).

En France, l'Institut National Âne et Mulet a mis en place un observatoire économique et social de la filière asine (INAM, 2014). Cet institut montre la nécessité aujourd'hui, face à une concurrence Italienne et Chinoise importante, de mieux encadrer et accompagner une activité nationale grandissante autour du lait d'ânesse. La production de lait d'ânesse reste marginale en France avec

seulement une soixantaine d'éleveurs qui valorisent essentiellement leur production par la fabrication de cosmétiques. Cette activité peu organisée s'est développée de façon importante ces dernières années conduisant à un marché concurrentiel dans le monde des cosmétiques. De façon générale, la structuration d'une filière passe par le déploiement de produits diversifiés à haute valeur ajoutée. Un des objectifs de la thèse était d'aider à la structuration de la filière du lait d'ânesse en France en proposant une boisson alimentaire respectant les normes microbiologiques tout en conservant, après les avoir démontrées, les propriétés santé *i.e* l'activité du lysozyme. Comme décrit précédemment, le lait d'ânesse est une matrice complexe contenant plusieurs composants tels que le lysozyme, la lactoferrine, le TGF- β mais également la flore lactique qui peuvent participer de manière synergique aux propriétés anti-inflammatoires du lait d'ânesse. La souche *Lactobacillus plantarum* isolée dans le lait d'ânesse a récemment été décrite pour produire des bactériocines favorisant les effets bactéricides sur différentes souches telles que *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus faecium*, *in vitro* (Murua et al., 2013). Aujourd'hui, le lait cru d'ânesse est promu comme un produit de santé jouant un rôle dans la prévention de l'athérosclérose, les maladies intestinales chroniques, le rhumatisme, les affections de la peau et est proposé comme une alternative appropriée au lait maternel humain chez les nourrissons. Toutefois, lorsque des propriétés santé sont avancées, il est également nécessaire d'offrir la garantie que les composés actifs aux propriétés santé soient présents en quantités suffisantes dans un produit fini, quels que soient le procédé et le conditionnement. Pour ces raisons, il est souvent conseillé de boire du lait cru car le traitement thermique annihilerait ses propriétés santé. La consommation de lait cru d'ânesse entraîne un faible risque sanitaire en raison de sa bonne qualité microbiologique, liée à un faible niveau de germes totaux. Toutefois, les informations fournis par l'AFSCA ne permettent pas de conclure à un risque entièrement négligeable. En effet, ce lait contient des coliformes, des moisissures, des bactéries mésophiles et est susceptible de permettre le développement de bactéries thermotolérantes comme *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, marqueurs de contamination fécale, fortement impliquées dans l'apparition de maladies nosocomiales (Aspri et al., 2016; Sarno et al., 2012; Zhang et al., 2008). Par conséquent, boire du lait cru comporte des risques, car les micro-organismes présents constituent un risque sanitaire pour la santé publique. Un traitement thermique comme la pasteurisation permet de réduire fortement ces risques sanitaires (Avis 11-2013 du Comité scientifique de l'AFSCA).

La boisson réalisée dans le cadre de la thèse s'adresse aux consommateurs recherchant l'effet santé du lait d'ânesse et sa naturalité. D'après le cahier des charges défini par l'INAM ce produit devait être le moins transformé possible afin de préserver l'authenticité du lait d'ânesse, réalisable à moindre coût par les éleveurs eux-mêmes directement à la ferme. L'effet santé du lait d'ânesse se traduit ici dans nos travaux par une activité enzymatique du lysozyme. Le profil des protéines sériques du lait

d'ânesse révèle un pourcentage de 21% de lysozyme (Salimei et al., 2004b). C'est un lait bien plus concentré en lysozyme que tous les autres laits de mammifères avec une concentration de 1 à 4 g/L de lait (Chiavari et al., 2005). Nos travaux montrent que la fraction contenant du lysozyme (activité de 5900 Unités dans 0,2mL) réduit la perméabilité intestinale, la sensibilité viscérale, l'activité des sérines protéases et la sécrétion de lipocaline-2 fécale augmentées lors d'un stress chronique chez la souris. Nous avons également montré qu'un fort traitement thermique du lait d'ânesse dénaturait le lysozyme et provoquait la perte des propriétés anti-inflammatoires de la matrice naturelle. Même si un fort traitement thermique est susceptible de dégrader d'autres composants importants du lait d'ânesse, préserver l'activité enzymatique du lysozyme pour l'élaboration de tout produit au lait d'ânesse semblait incontournable.

Dans ce contexte, nous nous sommes dirigés vers la pasteurisation en bain marie afin de mimer le procédé de chauffage artisanal à moindre coût. La pasteurisation du lait est définie comme le chauffage de chaque particule de lait à une température normalisée pendant une période de temps définie sans permettre la recontamination de ce lait ou du produit laitier pendant le processus (MacDONALD et al., 2011). Ce traitement est utilisé pour deux raisons distinctes: (i) rendre le lait et les produits laitiers sûrs pour la consommation humaine en réduisant le nombre de bactéries viables pouvant nuire à la santé et (ii) pour améliorer la durée de conservation du lait en réduisant le nombre de bactéries responsables de la détérioration du produit (Angulo et al., 2009). Dans notre étude, la pasteurisation permet d'allonger la durée de vie microbiologique du lait d'ânesse de 3 jours à 4 °C (Zhang et al., 2008) à 20 jours à 4 °C. Toutefois, pour augmenter la durée de conservation du lait il est possible de le congeler après pasteurisation. La pasteurisation et la congélation après pasteurisation sont des procédures généralement pratiquées dans les banques de lait humain. De plus, une étude réalisée sur le lait maternel humain montre qu'une congélation du lait après pasteurisation à 62°C-30min n'induit pas de changement significatif sur la composition de la fraction protéique (García-Lara et al., 2013). En effet, dans cette étude seules les concentrations en lipides dans le lait maternel diminuent de manière significative après pasteurisation et congélation (García-Lara et al., 2013).

Une valeur ajoutée peut être représentée par l'aptitude du lait d'ânesse à héberger des bactéries probiotiques, et pourrait être utile dans la prévention et le traitement de la diarrhée associée aux antibiotiques (Coppola et al., 2002; Salminen and Isolauri, 2006; Vincenzetti et al., 2011). Dans l'étude de Chiavari, les souches probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* AT194, CLT 2/2 et *Lactobacillus casei* LC 88 ont été utilisées dans le but de produire une boisson fermentée (Chiavari et al., 2005). Dans cette étude, les souches utilisées montrent une bonne capacité de développement, après une phase d'adaptation et restent vivantes pendant 30 jours dans les boissons. Par ailleurs, d'autres souches comme *L. plantarum* semblent être de bons candidats pour la production d'un nouveau type de lait

fermenté, non seulement pour leur activité probiotique, mais aussi par la stimulation de la croissance de *S. thermophilus* (Turchi et al., 2017). La fermentation par des souches probiotiques permet d'augmenter l'activité anti-oxydante du lait d'ânesse et de diminuer la teneur en lactose, favorisant sa consommation par des personnes intolérantes au lactose (Perna et al., 2015). Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que la fermentation du lait d'ânesse par des souches probiotiques est une bonne perspective pour le développement d'une gamme plus large à base de lait d'ânesse et *in fine* de la filière en France. Toutefois, des études sur le choix stratégique des souches probiotiques est nécessaire. Ces souches devront permettre de conserver les propriétés santé du lait d'ânesse cru préalablement démontrées et de ce fait, la conservation de l'activité en lysozyme.

Dans l'absolu, nous pourrions envisager une collaboration avec un grand groupe industriel pour développer un produit fermenté conservant les effets santé démontrés et permettre de continuer les études précliniques pour accumuler des preuves robustes et scientifiques pour envisager de futures études cliniques. La perspective de réaliser des études cliniques permettrait de proposer des allégations santé associées au lait d'ânesse et à ces produits fermentés. Les allégations de santé sont régies par le règlement (CE) N° 1924/2006 du parlement Européen et du conseil du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires (Reglement (CE) n°1924/2006). L'autorité de Sécurité Alimentaire Européenne (EFSA, European Food Safety Authority) a pour rôle principal de dispenser des avis scientifiques indépendants sur la sécurité des aliments destinés à l'alimentation humaine et animale. Les évaluations des risques réalisées par l'EFSA fournissent aux gestionnaires des risques (la commission européenne, le parlement européen et les états membres), une base scientifique qui les aide à prendre des décisions en matière de politique et de législation au sein de l'Union Européenne afin de garantir la sécurité des aliments pour tous les consommateurs européens. Ainsi, elle émet un avis sur les demandes d'allégations de santé qui seront par la suite autorisées ou non par la commission. L'objectif du règlement n° 1924/2006 est de garantir que toute allégation figurant sur l'étiquette d'un aliment vendu au sein de l'union européenne soit claire et justifiée par des preuves scientifiques (Reglement (CE) n°1924/2006). Ainsi, toutes les allégations de santé font l'objet d'une évaluation par l'ANSES et devront être autorisées par la commission européenne avant d'être utilisées.

Ces objectifs à long terme nécessiteront la production de volume plus important en lait d'ânesse, ce qui introduit la question du devenir de l'ânon et imposera une organisation de la filière en France.

RÉFÉRENCES:

A

- Abidin, I., Yargıçoglu, P., Agar, A., Gümüslü, S., Aydın, S., Oztürk, O., and Sahin, E. (2004). The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int. J. Neurosci.* *114*, 683–699.
- Ait-Belgnaoui, A., Bradesi, S., Fioramonti, J., Theodorou, V., and Bueno, L. (2005). Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* *113*, 141–147.
- Ait-belgnaoui, A., Eutamene, H., Houdeau, E., Bueno, L., Fioramonti, J., and Theodorou, V. (2009). *Lactobacillus farciminis* treatment attenuates stress-induced overexpression of Fos protein in spinal and supraspinal sites after colorectal distension in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* *21*, 567-e19.
- Ait-Belgnaoui, A., Colom, A., Braniste, V., Ramalho, L., Marrot, A., Cartier, C., Houdeau, E., Theodorou, V., and Tompkins, T. (2014). Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* *26*, 510–520.
- Alabiso, M., Giosuè, C., Alicata, M.L., Mazza, F., and Iannolino, G. (2009). The effects of different milking intervals and milking times per day in jennet milk production. *Animal* *3*, 543–547.
- Amati, L., Marzulli, G., Martulli, M., Tafaro, A., Jirillo, F., Pugliese, V., Martemucci, G., D’Alessandro, A.G., and Jirillo, E. (2010). Donkey and goat milk intake and modulation of the human aged immune response. *Curr. Pharm. Des.* *16*, 864–869.
- Anand, P.K., Malireddi, R.K.S., Lukens, J.R., Vogel, P., Bertin, J., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2012). NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. *Nature* *488*, 389–393.
- Ananthakrishnan, A.N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 205–217.
- Angulo, F.J., LeJeune, J.T., and Rajala-Schultz, P.J. (2009). Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat. *Clin. Infect. Dis.* *48*, 93–100.
- Annaházi, A., Ferrier, L., Bézirard, V., Lévêque, M., Eutamène, H., Ait-Belgnaoui, A., Coëffier, M., Ducrotté, P., Róka, R., Inczefi, O., et al. (2013). Luminal cysteine-proteases degrade colonic tight junction structure and are responsible for abdominal pain in constipation-predominant IBS. *Am. J. Gastroenterol.* *108*, 1322–1331.
- Antoniou, E., Margonis, G.A., Angelou, A., Pikouli, A., Argiri, P., Karavokyros, I., Papalois, A., and Pikoulis, E. (2016). The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Ann. Med. Surg.* *11*, 9–15.
- Anumakonda, V., Hayee, B., and Chung-Faye, G. (2007). Remission and relapse of Crohn’s disease following autologous haematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin’s lymphoma. *Gut* *56*, 1325–1325.

de Araújo, A.N., and Giugliano, L.G. (2001). Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC Microbiol.* 1, 25.

Arborelius, L., Owens, M.J., Plotsky, P.M., and Nemeroff, C.B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J. Endocrinol.* 160, 1–12.

Arora, T., and Sharma, R. (2011). Fermentation potential of the gut microbiome: implications for energy homeostasis and weight management. *Nutr. Rev.* 69, 99–106.

Arrieta, M.-C., and Finlay, B.B. (2012). The Commensal Microbiota Drives Immune Homeostasis. *Front. Immunol.* 3.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180.

Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., and Papademas, P. (2016). Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*.

Aspri, M., Economou, N., and Papademas, P. (2017). Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. *Food Rev. Int.* 33, 316–333.

B

Bai, T., Xia, J., Jiang, Y., Cao, H., Zhao, Y., Zhang, L., Wang, H., Song, J., and Hou, X. (2016). Comparison of the Rome IV and Rome III criteria for IBS diagnosis: a cross-sectional survey. *J. Gastroenterol. Hepatol.* n/a-n/a.

Baillet (1888). *Le marchand de lait d'ânesse*-Toulouse.

Balsari, A., Ceccarelli, A., Dubini, F., Fesce, E., and Poli, G. (1982). The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome. *Microbiologica* 5, 185–194.

Balzan, S., de Almeida Quadros, C., de Cleve, R., Zilberstein, B., and Cecconello, I. (2007). Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 464–471.

Barbara, G., and Cremon, C. (2008). Serine proteases: new players in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Gut* 57, 1035–1037.

Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G.S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A.M., Grady, E.F., Bunnett, N.W., et al. (2004). Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 693–702.

Barbara, G., Wang, B., Stanghellini, V., de Giorgio, R., Cremon, C., Di Nardo, G., Trevisani, M., Campi, B., Geppetti, P., Tonini, M., et al. (2007). Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 132, 26–37.

Barcelo, A., Claustre, J., Moro, F., Chayvialle, J.-A., Cuber, J.-C., and Plaisancié, P. (2000). Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 46, 218–224.

- Barreau, F., Cartier, C., Ferrier, L., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2004). Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats. *Gastroenterology* 127, 524–534.
- Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet* 369, 1641–1657.
- Becattini, S., Taur, Y., and Pamer, E.G. (2016). Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol. Med.* 22, 458–478.
- Belzer, C., and de Vos, W.M. (2012). Microbes inside--from diversity to function: the case of Akkermansia. *ISME J.* 6, 1449–1458.
- Benachour, A., Ladjouzi, R., Jeune, A.L., Hébert, L., Thorpe, S., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.-P., Prajsnar, T.K., Foster, S.J., and Mesnage, S. (2012). The Lysozyme-Induced Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase PgdA (EF1843) Is Required for Enterococcus faecalis Virulence. *J. Bacteriol.* 194, 6066–6073.
- Bercik, P., Collins, S.M., and Verdu, E.F. (2012). Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 405–413.
- Berg, D.J., Davidson, N., Kühn, R., Müller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M.W., and Rennick, D. (1996). Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.* 98, 1010–1020.
- Berin, M.C., Darfeuille-Michaud, A., Egan, L.J., Miyamoto, Y., and Kagnoff, M.F. (2002). Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF- κ B and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. *Cell. Microbiol.* 4, 635–648.
- Berrill, J.W., Green, J.T., Hood, K., and Campbell, A.K. (2013). Symptoms of irritable bowel syndrome in patients with inflammatory bowel disease: examining the role of sub-clinical inflammation and the impact on clinical assessment of disease activity. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 38, 44–51.
- Besten, G. den, Eunen, K. van, Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 356–368.
- Biesiekierski, J.R., Newnham, E.D., Irving, P.M., Barrett, J.S., Haines, M., Doecke, J.D., Shepherd, S.J., Muir, J.G., and Gibson, P.R. (2011). Gluten Causes Gastrointestinal Symptoms in Subjects Without Celiac Disease: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 508–514.
- Bitton, A., Dobkin, P.L., Edwardes, M.D., Sewitch, M.J., Meddings, J.B., Rawal, S., Cohen, A., Vermeire, S., Dufresne, L., Franchimont, D., et al. (2008). Predicting relapse in Crohn's disease: a biopsychosocial model. *Gut* 57, 1386–1392.
- Bizon, J.L., Helm, K.A., Han, J.S., Chun, H.J., Pucilowska, J., Lund, P.K., and Gallagher, M. (2001). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1739–1751.

- Bjarnason, I., Williams, P., So, A., Zanelli, G.D., Levi, A.J., Gumpel, J.M., Peters, T.J., and Ansell, B. (1984). Intestinal permeability and inflammation in rheumatoid arthritis: effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet Lond. Engl.* *2*, 1171–1174.
- Blackshaw, L.A., Brookes, S.J.H., Grundy, D., and Schemann, M. (2007). Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil.* *19*, 1–19.
- Blake, C.C.F., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C., and Sarma, V.R. (1965). Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 [[angst]] Resolution. *Nature* *206*, 757–761.
- Bonaz, B., and Taché, Y. (1994). Water-avoidance stress-induced c-fos expression in the rat brain and stimulation of fecal output: role of corticotropin-releasing factor. *Brain Res.* *641*, 21–28.
- Bonaz, B.L., and Bernstein, C.N. (2013). Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *144*, 36–49.
- Bradesi, S. (2005). Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *289*, G42–G53.
- Bradesi, S., Eutamene, H., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2002). Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats. *Neurogastroenterol. Motil.* *14*, 75–82.
- Bradesi, S., Schwetz, I., Ennes, H.S., Lamy, C.M.R., Ohning, G., Fanselow, M., Pothoulakis, C., McRoberts, J.A., and Mayer, E.A. (2005). Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *289*, G42–53.
- Brandwein, S.L., McCabe, R.P., Cong, Y., Waites, K.B., Ridwan, B.U., Dean, P.A., Ohkusa, T., Birkenmeier, E.H., Sundberg, J.P., and Elson, C.O. (1997). Spontaneously colitic C3H/HeJ mice demonstrate selective antibody reactivity to antigens of the enteric bacterial flora. *J. Immunol.* *159*, 44–52.
- Brenchley, J.M., and Douek, D.C. (2012). Microbial translocation across the GI tract. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 149–173.
- Brock, J.H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *80*, 1–6.
- Bruwer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C.A., Madara, J.L., Hopkins, A.M., and Nusrat, A. (2003). Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. *J. Immunol.* *171*, 6164–6172.
- Brumini, D., Furlund, C.B., Comi, I., Devold, T.G., Marletta, D., Vegarud, G.E., and Jonassen, C.M. (2013). Antiviral activity of donkey milk protein fractions on echovirus type 5. *Int. Dairy J.* *28*, 109–111.
- Brumini, D., Criscione, A., Bordonaro, S., Vegarud, G.E., and Marletta, D. (2015). Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. *Dairy Sci. Technol.*
- Bruno, J., Nicolas, A., Pesenti, S., Schwarz, J., Simon, J.-L., Léonil, J., and Plaisancié, P. (2017). Variants of β -casofensin, a bioactive milk peptide, differently modulate the intestinal barrier: In vivo and ex vivo studies in rats. *J. Dairy Sci.* *100*, 3360–3372.
- Bu, G., Luo, Y., Chen, F., Liu, K., and Zhu, T. (2013). Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Sci. Technol.* *93*, 211–223.

Bucki, R., Leszczyńska, K., Namiot, A., and Sokołowski, W. (2010). Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 58, 15–25.

Bueno, L., and Fioramonti, J. (2002). Visceral perception: inflammatory and non-inflammatory mediators. *Gut* 51, i19–i23.

Buffon (1788). *Histoire naturelle, générale et particulière*, par Leclerc de Buffon.

Buzoni-Gatel, D., Debbabi, H., Mennechet, F.J.D., Martin, V., Lepage, A.C., Schwartzman, J.D., and Kasper, L.H. (2001). Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF- β -producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120, 914–924.

C

Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., et al. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456, 259–263.

Cadwell, K., Patel, K.K., Komatsu, M., Virgin, IV, H.W., and Stappenbeck, T.S. (2009). A common role for Atg16L1, Atg5, and Atg7 in small intestinal Paneth cells and Crohn disease. *Autophagy* 5, 250–252.

Caffarelli, C., Baldi, F., Bendandi, B., Calzone, L., Marani, M., and Pasquinelli, P. (2010). Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. *Ital. J. Pediatr.* 36, 5.

Camilleri, M. (2013). Genetics of human gastrointestinal sensation. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, 458–466.

Canavan, C., West, J., and Card, T. (2014). The epidemiology of irritable bowel syndrome. *Clin. Epidemiol.* 6, 71–80.

Cario, E. (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 54, 1182–1193.

Carminati, D., and Tidona, F. (2017). Nutritional Value and Potential Health Benefits of Donkey Milk.

Carminati, D., Tidona, F., Fornasari, M.E., Rossetti, L., Meucci, A., and Giraffa, G. (2014). Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 299–305.

Cavallarin, L., Giribaldi, M., Soto-Del Rio, M. de los D., Valle, E., Barbarino, G., Gennero, M.S., and Civera, T. (2015). A survey on the milk chemical and microbiological quality in dairy donkey farms located in NorthWestern Italy. *Food Control* 50, 230–235.

Ceapa, C., Wopereis, H., Rezaiki, L., Kleerebezem, M., Knol, J., and Oozeer, R. (2013). Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27, 139–155.

Cenac, N., Andrews, C.N., Holzhausen, M., Chapman, K., Cottrell, G., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Barbara, G., Beck, P., Bunnett, N.W., et al. (2007). Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Invest.* 117, 636–647.

Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 735–744.

- Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M.A., Young, A.N., Gewirtz, A.T., and Vijay-Kumar, M. (2012). Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One* 7, e44328.
- Chassard, C., Dapoigny, M., Scott, K.P., Crouzet, L., Del'homme, C., Marquet, P., Martin, J.C., Pickering, G., Ardid, D., Eschalier, A., et al. (2012). Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35, 828–838.
- Cheng, J., Palva, A.M., Vos, W.M. de, and Satokari, R. (2011). Contribution of the Intestinal Microbiota to Human Health: From Birth to 100 Years of Age. In *Between Pathogenicity and Commensalism*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 323–346.
- Chey, W.D. (2016). Food: The Main Course to Wellness and Illness in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 111, 366–371.
- Chianese, L., Calabrese, M.G., Ferranti, P., Mauriello, R., Garro, G., De Simone, C., Quarto, M., Addeo, F., Cosenza, G., and Ramunno, L. (2010). Proteomic characterization of donkey milk “caseome.” *J. Chromatogr. A* 1217, 4834–4840.
- Chiavari, C., Coloretti, F., Nanni, M., Sorrentino, E., and Grazia, L. (2005). Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. *Le Lait* 85, 481–490.
- Chiofalo, B., Dugo, P., Bonaccorsi, I.L., and Mondello, L. (2011). Comparison of major lipid components in human and donkey milk: new perspectives for a hypoallergenic diet in humans. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 33, 633–644.
- Chiofalo B. (2001). Ass's milk : exploitation of an alimentary resource.
- Chipman, D.M., and Sharon, N. (1969). Mechanism of Lysozyme Action. *Science* 165, 454–465.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., and Steele, J.L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 217–246.
- Claeys, W.L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., et al. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* 31, 251–262.
- Claeys, W.L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., and Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 42, 188–201.
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R.D., Shanahan, F., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol. Psychiatry* 18, 666.
- Colecchia, A., Vestito, A., La, A.R., Pasqui, F., Nikiforaki, A., and Festi, D. (2006). Effect of a symbiotic preparation on the clinical manifestations of irritable bowel syndrome, constipation-variant. Results of an open, uncontrolled multicenter study. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 52, 349–358.
- Collins, S.M., Piche, T., and Rampal, P. (2001). The putative role of inflammation in the irritable bowel syndrome. *Gut* 49, 743–745.
- Cone, R.A. (2009). Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 75–85.

- Contractor, N.V., Bassiri, H., Reya, T., Park, A.Y., Baumgart, D.C., Wasik, M.A., Emerson, S.G., and Carding, S.R. (1998). Lymphoid Hyperplasia, Autoimmunity, and Compromised Intestinal Intraepithelial Lymphocyte Development in Colitis-Free Gnotobiotic IL-2-Deficient Mice. *J. Immunol.* *160*, 385–394.
- Coppola, R., Salimei, E., Succi, M., Sorrentino, E., Nanni, M., Ranieri, P., Belliblanes, R., and Grazia, L. (2002). Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Ann. Microbiol.* *52*, 55–60.
- Costa, M., Brookes, S.J.H., and Hennig, G.W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* *47*, iv15-iv19.
- Coutinho, H.B., Da Mota, H.C., Coutinho, V.B., Robalinho, T.I., Furtado, A.F., Walker, E., King, G., Mahida, Y.R., Sewell, H.F., and Wakelin, D. (1998). Absence of lysozyme (muramidase) in the intestinal Paneth cells of newborn infants with necrotising enterocolitis. *J. Clin. Pathol.* *51*, 512–514.
- Craven, M., Egan, C.E., Dowd, S.E., McDonough, S.P., Dogan, B., Denkers, E.Y., Bowman, D., Scherl, E.J., and Simpson, K.W. (2012). Inflammation Drives Dysbiosis and Bacterial Invasion in Murine Models of Ileal Crohn's Disease. *PLoS ONE* *7*, e41594.
- Cremon, C., Pallotti, F., Bacchilega, M., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., and Barbara, G. (2008). Antiflagellin antibodies suggest infective participation in irritable bowel syndrome pathogenesis. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *2*, 735–740.
- Crohn, B.B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G.D. (1932). REGIONAL ILEITIS: A PATHOLOGIC AND CLINICAL ENTITY. *J. Am. Med. Assoc.* *99*, 1323–1329.
- Crouzet, L., Gaultier, E., Del'Homme, C., Cartier, C., Delmas, E., Dapoigny, M., Fioramonti, J., and Bernalier-Donadille, A. (2013). The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *25*, e272-282.
- Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 701–712.
- Cunsolo, V., Saletti, R., Muccilli, V., and Foti, S. (2007). Characterization of the protein profile of donkey's milk whey fraction. *J. Mass Spectrom.* *42*, 1162–1174.
- Cunsolo, V., Muccilli, V., Fasoli, E., Saletti, R., Righetti, P.G., and Foti, S. (2011). Poppea's bath liquor: The secret proteome of she-donkey's milk. *J. Proteomics* *74*, 2083–2099.
- Cuomo, R., Andreozzi, P., Zito, F.P., Passananti, V., Carlo, G.D., and Sarnelli, G. (2014). Irritable bowel syndrome and food interaction. *World J. Gastroenterol. WJG* *20*, 8837.

D

- Da Silva, S., Robbe-Masselot, C., Ait-Belgnaoui, A., Mancuso, A., Mercade-Loubière, M., Salvador-Cartier, C., Gillet, M., Ferrier, L., Loubière, P., Dague, E., et al. (2014). Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *307*, G420-429.
- D'Amato, M. (2013). Genes and functional GI disorders: from casual to causal relationship. *Neurogastroenterol. Motil.* *25*, 638–649.

- Dapoigny, M., Stockbrügger, R.W., Azpiroz, F., Collins, S., Coremans, G., Müller-Lissner, S., Oberndorff, A., Pace, F., Smout, A., Vatn, M., et al. (2003). Role of Alimentation in Irritable Bowel Syndrome. *Digestion* 67, 225–233.
- Dapoigny, M., Piche, T., Ducrotte, P., Linaud, B., Cardot, J.-M., and Bernalier-Donadille, A. (2012). Efficacy and safety profile of LCR35 complete freeze-dried culture in irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind study. *World J. Gastroenterol.* 18, 2067–2075.
- Darbaky, Y., Evrard, B., Patrier, S., Falenta, J., Garcin, S., Tridon, A., Dapoigny, M., Silberberg, C., Nivoliez, A., and Diop, L. (2017). Oral probiotic treatment of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® prevents visceral hypersensitivity to a colonic inflammation and an acute psychological stress. *J. Appl. Microbiol.* 122, 188–200.
- Dave, L.A., Montoya, C.A., Rutherford, S.M., and Moughan, P.J. (2014). Gastrointestinal Endogenous Proteins as a Source of Bioactive Peptides - An In Silico Study. *PLOS ONE* 9, e98922.
- Davidson, D.J., Currie, A.J., Reid, G.S.D., Bowdish, D.M.E., MacDonald, K.L., Ma, R.C., Hancock, R.E.W., and Speert, D.P. (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 1146–1156.
- Delvaux, M., Denis, P., Allemand, H., and Motility, the F.C. of D. (1997). Sexual abuse is more frequently reported by IBS patients than by patients with organic digestive diseases or controls. Results of a multicentre inquiry. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 345.
- Demaude, J. (2006). Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* 55, 655–661.
- Demaude, J., Levêque, M., Chaumaz, G., Eutamène, H., Fioramonti, J., Bueno, L., and Ferrier, L. (2009). Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: Involvement of pancreatic trypsin. *Life Sci.* 84, 847–852.
- Deng, Y., Zhu, Y., Dai, N., and Fox, M. (2016). Dietary Challenge Tests: Identifying Food Intolerance as a Cause of Symptoms in Irritable Bowel Syndrome Patients. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 1364–1365.
- Derrien, M., Passel, M.W.J. van, Bovenkamp, J.H.B. van de, Schipper, R., Vos, W. de, and Dekker, J. (2010). Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 1, 254–268.
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., and Dinan, T.G. (2008). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J. Psychiatr. Res.* 43, 164–174.
- Djordjevic, J., Vuckovic, T., Jasnic, N., and Cvijic, G. (2007). Effect of various stressors on the blood ACTH and corticosterone concentration in normotensive Wistar and spontaneously hypertensive Wistar-Kyoto rats. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 217–220.
- Drossman, D.A. (1999). The functional gastrointestinal disorders and the Rome II process. *Gut* 45, II1-II5.
- Ducrotté, P. (2010). [Microbiota and irritable bowel syndrome]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34 Suppl 1, S52-56.

Ducrotté, P., Sawant, P., and Jayanthi, V. (2012). Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* *18*, 4012–4018.

Duerkop, B.A., Vaishnava, S., and Hooper, L.V. (2009). Immune Responses to the Microbiota at the Intestinal Mucosal Surface. *Immunity* *31*, 368–376.

Duncan, S.H., Louis, P., and Flint, H.J. (2004). Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 5810–5817.

Duncan, S.H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A.M., Flint, H.J., and Lobley, G.E. (2007). Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 1073–1078.

Dunn, A.J., and Berridge, C.W. (1990). Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Brain Res. Rev.* *15*, 71–100.

Dusko Ehrlich, S., and MetaHIT consortium (2010). [Metagenomics of the intestinal microbiota: potential applications]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* *34 Suppl 1*, S23-28.

E

Earley, H., Lennon, G., Balfe, A., Kilcoyne, M., Clyne, M., Joshi, L., Carrington, S., Martin, S.T., Coffey, J.C., Winter, D.C., et al. (2015). A Preliminary Study Examining the Binding Capacity of *Akkermansia muciniphila* and *Desulfovibrio* spp., to Colonic Mucin in Health and Ulcerative Colitis. *PloS One* *10*, e0135280.

Economou, M., Zambeli, E., and Michopoulos, S. (2009). Incidence and prevalence of Crohn's disease and its etiological influences. *Ann. Gastroenterol.* *22*, 158–167.

Eijkelkamp, N., Heijnen, C.J., Elsenbruch, S., Holtmann, G., Schedlowski, M., and Kavelaars, A. (2009). G protein-coupled receptor kinase 6 controls post-inflammatory visceral hyperalgesia. *Brain. Behav. Immun.* *23*, 18–26.

Elenkov, I.J., and Chrousos, G.P. (2002). Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *966*, 290–303.

Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., et al. (2011). NLRP6 inflammasome is a regulator of colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* *145*, 745–757.

Ellinghaus, D., Jostins, L., Spain, S.L., Cortes, A., Bethune, J., Han, B., Park, Y.R., Raychaudhuri, S., Pouget, J.G., Hübenthal, M., et al. (2016). Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nat. Genet.*

Ellison, R.T., and Giehl, T.J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* *88*, 1080–1091.

Estienne, M., Claustre, J., Clain-Gardechaux, G., Paquet, A., Taché, Y., Fioramonti, J., and Plaisancié, P. (2010). Maternal deprivation alters epithelial secretory cell lineages in rat duodenum: role of CRF-related peptides. *Gut* *59*, 744–751.

Eurolactis (2017). Eurolactis -.

F

- Fantuz, F., Ferraro, S., Todini, L., Piloni, R., Mariani, P., and Salimei, E. (2012). Donkey milk concentration of calcium, phosphorus, potassium, sodium and magnesium. *Int. Dairy J.* *24*, 143–145.
- Farhadi, A., Fields, J.Z., and Keshavarzian, A. (2007). Mucosal mast cells are pivotal elements in inflammatory bowel disease that connect the dots: Stress, intestinal hyperpermeability and inflammation. *World J. Gastroenterol. WJG* *13*, 3027–3030.
- Faure, C., and Giguère, L. (2008). Functional gastrointestinal disorders and visceral hypersensitivity in children and adolescents suffering from Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *14*, 1569–1574.
- Fellermann, K., Wehkamp, J., Herrlinger, K.R., and Stange, E.F. (2003). Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *15*, 627–634.
- Feng, B., La, J.H., Schwartz, E.S., and Gebhart, G.F. (2012). Irritable Bowel Syndrome: Methods, Mechanisms, and Pathophysiology. Neural and neuro-immune mechanisms of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G1085–G1098.
- Ferrier, L. (2008). Significance of increased human colonic permeability in response to corticotrophin-releasing hormone (CRH). *Gut* *57*, 7–9.
- Ferrier, L., Bérard, F., Debrauwer, L., Chabo, C., Langella, P., Buéno, L., and Fioramonti, J. (2006). Impairment of the Intestinal Barrier by Ethanol Involves Enteric Microflora and Mast Cell Activation in Rodents. *Am. J. Pathol.* *168*, 1148–1154.
- Fioramonti, J., and Gebhart, G.F. (2007). In vivo and transgenic animal models used to study visceral hypersensitivity. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *19*, 20–28.
- FitzGerald, R.J., Murray, B.A., and Walsh, D.J. (2004). Hypotensive Peptides from Milk Proteins. *J. Nutr.* *134*, 980S–988S.
- Forshammar, J., Isaksson, S., Strid, H., Stotzer, P.-O., Sjövall, H., Simrén, M., and Ohman, L. (2008). A pilot study of colonic B cell pattern in irritable bowel syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.* *43*, 1461–1466.
- Fort, M.M., Mozaffarian, A., Stöver, A.G., Correia, J. da S., Johnson, D.A., Crane, R.T., Ulevitch, R.J., Persing, D.H., Bielefeldt-Ohmann, H., Probst, P., et al. (2005). A Synthetic TLR4 Antagonist Has Anti-Inflammatory Effects in Two Murine Models of Inflammatory Bowel Disease. *J. Immunol.* *174*, 6416–6423.
- Fourie, N.H., Wang, D., Abey, S.K., Creekmore, A.L., Hong, S., Martin, C.G., Wiley, J.W., and Henderson, W.A. (2017). Structural and functional alterations in the colonic microbiome of the rat in a model of stress induced irritable bowel syndrome. *Gut Microbes* *8*, 33–45.
- Franchimont, D., Vermeire, S., Housni, H.E., Pierik, M., Steen, K.V., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Gossuin, A.V., Devière, J., et al. (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* *53*, 987–992.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13780–13785.

Fratini, F., Turchi, B., Pedonese, F., Pizzurro, F., Ragolini, P., Torracca, B., Tozzi, B., Galiero, A., and Nuvoloni, R. (2016). Does the addition of donkey milk inhibit the replication of pathogen microorganisms in goat milk at refrigerated condition? *Dairy Sci. Technol.* *96*, 243–250.

Frost, G., Sleeth, M.L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., et al. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat. Commun.* *5*, ncomms4611.

Fujimori, S., Gudis, K., Takahashi, Y., Seo, T., Yamada, Y., Ehara, A., Kobayashi, T., Mitsui, K., Yonezawa, M., Tanaka, S., et al. (2010). Distribution of small intestinal mucosal injuries as a result of NSAID administration. *Eur. J. Clin. Invest.* *40*, 504–510.

Fukudo, S. (2007). Role of corticotropin-releasing hormone in irritable bowel syndrome and intestinal inflammation. *J. Gastroenterol.* *42 Suppl 17*, 48–51.

Furlund, C.B., Ulleberg, E.K., Devold, T.G., Flengsrud, R., Jacobsen, M., Sekse, C., Holm, H., and Vegarud, G.E. (2013). Identification of lactoferrin peptides generated by digestion with human gastrointestinal enzymes. *J. Dairy Sci.* *96*, 75–88.

Furness, J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* *81*, 87–96.

Furness, J.B. (2008). The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol. Motil.* *20*, 32–38.

G

Gaber, O.H. (2016). The Relationship Between Irritable Bowel Syndrome , Depression , Anxiety, and Stress among a Sample of Irritable Bowel Patients - Predictive Study. *J. Sociol. Res.* *7*, 44–64.

Gagnaire, V., Jardin, J., Jan, G., and Lortal, S. (2009). Invited review: Proteomics of milk and bacteria used in fermented dairy products: From qualitative to quantitative advances. *J. Dairy Sci.* *92*, 811–825.

Gallo, A., Passaro, G., Gasbarrini, A., Landolfi, R., and Montalto, M. (2016). Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An update. *World J. Gastroenterol.* *22*, 7186–7202.

Ganesh, B.P., Klopffleisch, R., Loh, G., and Blaut, M. (2013). Commensal *Akkermansia muciniphila* Exacerbates Gut Inflammation in Salmonella Typhimurium-Infected Gnotobiotic Mice. *PLoS ONE* *8*, e74963.

García-Lara, N.R., Vieco, D.E., De la Cruz-Bértolo, J., Lora-Pablos, D., Velasco, N.U., and Pallás-Alonso, C.R. (2013). Effect of Holder Pasteurization and Frozen Storage on Macronutrients and Energy Content of Breast Milk: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *57*, 377–382.

Garrett, V.D., Brantley, P.J., Jones, G.N., and McKnight, G.T. (1991). The relation between daily stress and Crohn's disease. *J. Behav. Med.* *14*, 87–96.

Gastaldi, D., Bertino, E., Monti, G., Baro, C., Fabris, C., Lezo, A., Medana, C., Baiocchi, C., Mussap, M., Galvano, F., et al. (2010). Donkey's milk detailed lipid composition. *Front. Biosci. E* *2*, 537–546.

Gearry, R.B., Irving, P.M., Barrett, J.S., Nathan, D.M., Shepherd, S.J., and Gibson, P.R. (2009). Reduction of dietary poorly absorbed short-chain carbohydrates (FODMAPs) improves abdominal symptoms in patients with inflammatory bowel disease—a pilot study. *J. Crohns Colitis* *3*, 8–14.

- Gebhart, G.F. (1999). Peripheral contributions to visceral hyperalgesia. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 13 Suppl A, 37A–41A.
- Gecse, K., Róka, R., Ferrier, L., Leveque, M., Eutamene, H., Cartier, C., Ait-Belgnaoui, A., Rosztóczy, A., Izbéki, F., Fioramonti, J., et al. (2008). Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 57, 591–599.
- Gendler, S.J., and Spicer, A.P. (1995). Epithelial mucin genes. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 607–634.
- Gershon, M.D. (1981). The Enteric Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 4, 227–272.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2003). Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *J. Biol. Chem.* 278, 8869–8872.
- Giufrida, M.G., CANTISANI, A., NAPOUTANO, L., CONTI, A., and GODOVAC-ZIMMERMANN, J. (1992). The Amino-Acid Sequence of Two Isoforms of α -Lactalbumin from Donkey (*Equus asinus*) Milk is Identical. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* 373, 931–936.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., Angelis, M.D., Corsetti, A., and Cagno, R.D. (2002). Latent Bioactive Peptides in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Significance in Dairy Processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 223–239.
- Gobbetti, M., Minervini, F., and Rizzello, C.G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* 57, 173–188.
- Gottlieb, M.G.V., Closs, V.E., Junges, V.M., and Schwanke, C.H.A. (2017). Impact Of Human Aging And Modern Lifestyle On Microbiota. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 0, 00–00.
- Goyal, R.K., and Hirano, I. (1996). The Enteric Nervous System. *N. Engl. J. Med.* 334, 1106–1115.
- Graham, D.B., and Xavier, R.J. (2013). From genetics of inflammatory bowel disease towards mechanistic insights. *Trends Immunol.* 34, 371–378.
- Greenstein, A.J., Janowitz, H.D., and Sachar, D.B. (1976). The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. *Medicine (Baltimore)* 55, 401–412.
- Greenwood-Van Meerveld, B., Moloney, R.D., Johnson, A.C., and Vicario, M. (2016). Mechanisms of Stress-Induced Visceral Pain: Implications in Irritable Bowel Syndrome. *J. Neuroendocrinol.* 28, n/a-n/a.
- Gubic, J., Tomic, J., Torbica, A., Ilicic, M., Tasic, T., Saric, L., and Popovic, S. (2016). Characterization of several milk proteins in Domestic Balkan donkey breed during lactation, using lab-on-a-chip capillary electrophoresis. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 22, 9–15.
- Gue, M., Fioramonti, J., and Bueno, L. (1987). Comparative influences of acoustic and cold stress on gastrointestinal transit in mice. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 253, G124–G128.
- Gunter, W.D., Shepard, J.D., Foreman, R.D., Myers, D.A., and Beverley (2000). Evidence for visceral hypersensitivity in high-anxiety rats. *Physiol. Behav.* 69, 379–382.

Guo, H.Y., Pang, K., Zhang, X.Y., Zhao, L., Chen, S.W., Dong, M.L., and Ren, F.Z. (2007). Composition, Physiochemical Properties, Nitrogen Fraction Distribution, and Amino Acid Profile of Donkey Milk. *J. Dairy Sci.* *90*, 1635–1643.

H

Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., and Dary-Mouro, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Res. Int.* *63*, 71–80.

Halfvarson, J. (2011). Genetics in twins with Crohn’s disease: Less pronounced than previously believed? *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 6–12.

Halfvarson, J., Jess, T., Bodin, L., Järnerot, G., Munkholm, P., Binder, V., and Tysk, C. (2007). Longitudinal concordance for clinical characteristics in a Swedish-Danish twin population with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *13*, 1536–1544.

Halliday, J.A., Bell, K., and Shaw, D.C. (1991). The complete amino acid sequence of feline beta-lactoglobulin II and a partial revision of the equine beta-lactoglobulin II sequence. *Biochim. Biophys. Acta* *1077*, 25–30.

Halmos, E.P., Power, V.A., Shepherd, S.J., Gibson, P.R., and Muir, J.G. (2014). A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *146*, 67–75.e5.

Halmos, E.P., Christophersen, C.T., Bird, A.R., Shepherd, S.J., Muir, J.G., and Gibson, P.R. (2016). Consistent Prebiotic Effect on Gut Microbiota With Altered FODMAP Intake in Patients with Crohn’s Disease: A Randomised, Controlled Cross-Over Trial of Well-Defined Diets. *Clin. Transl. Gastroenterol.* *7*, e164.

Hand, T.W., Vujkovic-Cvijin, I., Ridaura, V.K., and Belkaid, Y. (2016). Linking the Microbiota, Chronic Disease, and the Immune System. *Trends Endocrinol. Metab.* *27*, 831–843.

Hansen, M.B. (2003). The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification. *Pharmacol. Toxicol.* *92*, 105–113.

Haque, E., Chand, R., and Kapila, S. (2008). Biofunctional Properties of Bioactive Peptides of Milk Origin. *Food Rev. Int.* *25*, 28–43.

Harvey, R.F., and Bradshaw, J.M. (1980). A simple index of Crohn’s-disease activity. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 514.

Hattay, P., Prusator, D.K., Tran, L., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2017). Psychological stress-induced colonic barrier dysfunction: Role of immune-mediated mechanisms. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.*

Hayes, P.A., Fraher, M.H., and Quigley, E.M. (2014). Irritable bowel syndrome: the role of food in pathogenesis and management. *Gastroenterol Hepatol NY* *10*, 164–174.

Heaney, R.P. (2000). Calcium, Dairy Products and Osteoporosis. *J. Am. Coll. Nutr.* *19*, 83S–99S.

Hébert, L. (2008). Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis*. Université de Caen.

- Hébert, L., Courtin, P., Torelli, R., Sanguinetti, M., Chapot-Chartier, M.-P., Auffray, Y., and Benachour, A. (2007). *Enterococcus faecalis* Constitutes an Unusual Bacterial Model in Lysozyme Resistance. *Infect. Immun.* *75*, 5390–5398.
- Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Fischer, A., Fuchs, D., Struck, D., Niebergall, J., Jahn, H.-K., Dunay, I.R., Moter, A., Gescher, D.M., et al. (2006). Gram-Negative Bacteria Aggravate Murine Small Intestinal Th1-Type Immunopathology following Oral Infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *177*, 8785–8795.
- Herrouin, M., Mollé, D., Fauquant, J., Ballestra, F., Maubois, J.-L., and Léonil, J. (2000). New genetic variants identified in donkey's milk whey proteins. *J. Protein Chem.* *19*, 105–116.
- Hibi, T., Ogata, H., and Sakuraba, A. (2002). Animal models of inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* *37*, 409–417.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., et al. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *11*, 506–514.
- Hollander, D. (1992). The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* *27*, 721–726.
- Hollander, D., Vadheim, C.M., Brettholz, E., Petersen, G.M., Delahunty, T., and Rotter, J.I. (1986). Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann. Intern. Med.* *105*, 883–885.
- Hong, S., Zheng, G., Wu, X., Snider, N.T., Owyang, C., and Wiley, J.W. (2011). Corticosterone Mediates Reciprocal Changes in CB1 and TRPV1 Receptors in Primary Sensory Neurons in the Chronically Stressed Rat. *Gastroenterology* *140*, 627–637.e4.
- Hopper, K.E., and McKenzie, H.A. (1974). Comparative studies of α -Lactalbumin and lysozyme: Echidna lysozyme. *Mol. Cell. Biochem.* *3*, 93–108.
- Hou, J.K., Abraham, B., and El-Serag, H. (2011). Dietary Intake and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of the Literature. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 563–573.
- Hou, J.K., Lee, D., and Lewis, J. (2014). Diet and Inflammatory Bowel Disease: Review of Patient-Targeted Recommendations. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 1592–1600.
- Hs, C., Sn, M., Rs, S., and Dj, S. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* *69*, 238–249.
- Hunter, J.O., Tuffnell, Q., and Lee, A.J. (1999). Controlled Trial of Oligofructose in the Management of Irritable Bowel Syndrome. *J. Nutr.* *129*, 1451S–1453s.
- Hurst, N.R., Kendig, D.M., Murthy, K.S., and Grider, J.R. (2014). The short chain fatty acids, butyrate and propionate, have differential effects on the motility of the guinea pig colon. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *26*, 1586–1596.
- Hyland, N.P., Quigley, E.M., and Brint, E. (2014). Microbiota-host interactions in irritable bowel syndrome: Epithelial barrier, immune regulation and brain-gut interactions. *World J. Gastroenterol.* *WJG* *20*, 8859.

I

- Iacono, G., Carroccio, A., Cavataio, F., Montalto, G., Soresi, M., and Balsamo, V. (1992). Use of ass' milk in multiple food allergy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *14*, 177–181.
- Ibrahim, H.R., Higashiguchi, S., Koketsu, M., Juneja, L.R., Kim, M., Yamamoto, T., Sugimoto, Y., and Aoki, T. (1996). Partially Unfolded Lysozyme at Neutral pH Agglutinates and Kills Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria through Membrane Damage Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* *44*, 3799–3806.
- Ibrahim, H.R., Matsuzaki, T., and Aoki, T. (2001). Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett.* *506*, 27–32.
- INAM (2014). Observatoire économique et social de la filière asine en France, 2014.
- Inglingstad, R.A., Devold, T.G., Eriksen, E.K., Holm, H., Jacobsen, M., Liland, K.H., Rukke, E.O., and Vegarud, G.E. (2010). Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Sci. Technol.* *90*, 549–563.
- Irvine, E.J., Whitehead, W.E., Chey, W.D., Matsueda, K., Shaw, M., Talley, N.J., and Zanten, S.J.O.V. van (2006). Design of Treatment Trials for Functional Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology* *130*, 1538–1551.

J

- Jackson, M.E., and Moghaddam, B. (2004). Stimulus-specific plasticity of prefrontal cortex dopamine neurotransmission. *J. Neurochem.* *88*, 1327–1334.
- Jäger, S., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch. Surg.* *398*, 1–12.
- Jakobsson, H.E., Rodriguez-Pineiro, A.M., Schutte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Backhed, F., Hansson, G.C., and Johansson, M.E. (2015). The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep.* *16*, 164–177.
- Jeffery, I.B., O'Toole, P.W., Öhman, L., Claesson, M.J., Deane, J., Quigley, E.M.M., and Simrén, M. (2012). An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* *61*, 997–1006.
- de Jesus Raposo, M.F., de Morais, A.M.M.B., and de Morais, R.M.S.C. (2016). Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae. *Mar. Drugs* *14*.
- Jirillo, F., and Magrone, T. (2014). Anti-inflammatory and anti-allergic properties of donkey's and goat's milk. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* *14*, 27–37.
- Jirillo, F., Jirillo, E., and Magrone, T. (2010). Donkey's and goat's milk consumption and benefits to human health with special reference to the inflammatory status. *Curr. Pharm. Des.* *16*, 859–863.
- Johansson, M.E.V., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Subramani, D.B., Holmén-Larsson, J.M., Thomsson, K.A., Bergström, J.H., et al. (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 3635.
- Jollès, J., and Jollès, P. (1967). Human Tear and Human Milk Lysozymes*. *Biochemistry (Mosc.)* *6*, 411–417.

Jordan, C., Sin, J., Fear, N.T., and Chalder, T. (2016). A systematic review of the psychological correlates of adjustment outcomes in adults with inflammatory bowel disease. *Clin. Psychol. Rev.* 47, 28–40.

K

Kamau, S.M., Lu, R.-R., Chen, W., Liu, X.-M., Tian, F.-W., Shen, Y., and Gao, T. (2010). Functional Significance of Bioactive Peptides Derived from Milk Proteins. *Food Rev. Int.* 26, 386–401.

Kamphuis, J.B.J., Mercier-Bonin, M., Eutamène, H., and Theodorou, V. (2017). Mucus organisation is shaped by colonic content; a new view. *Sci. Rep.* 7, 8527.

Kanauchi (2010). Preventive effects of enzyme-treated rice fiber in a restraint stress-induced irritable bowel syndrome model. *Int. J. Mol. Med.* 25.

Kanyshkova, T.G., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2001). Lactoferrin and its biological functions. *Biochem. Biokhimiia* 66, 1–7.

Kaser, A., Niederreiter, L., and Blumberg, R.S. (2011). Genetically determined epithelial dysfunction and its consequences for microflora-host interactions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 3643–3649.

Kassinen, A., Krogius-Kurikka, L., Mäkivuokko, H., Rinttilä, T., Paulin, L., Corander, J., Malinen, E., Apajalahti, J., and Palva, A. (2007). The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly From That of Healthy Subjects. *Gastroenterology* 133, 24–33.

Kato-Kataoka, A., Nishida, K., Takada, M., Kawai, M., Kikuchi-Hayakawa, H., Suda, K., Ishikawa, H., Gondo, Y., Shimizu, K., Matsuki, T., et al. (2016). Fermented Milk Containing *Lactobacillus casei* Strain Shirota Preserves the Diversity of the Gut Microbiota and Relieves Abdominal Dysfunction in Healthy Medical Students Exposed to Academic Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3649–3658.

Keohane, J., O'Mahony, C., O'Mahony, L., O'Mahony, S., Quigley, E.M., and Shanahan, F. (2010). Irritable bowel syndrome-type symptoms in patients with inflammatory bowel disease: a real association or reflection of occult inflammation? *Am. J. Gastroenterol.* 105, 1788, 1789–1794; quiz 1795.

Khan, S., and Chang, L. (2010). Diagnosis and management of IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 565–581.

Khan, K.J., Ullman, T.A., Ford, A.C., Abreu, M.T., Abadir, A., Abadir, A., Marshall, J.K., Talley, N.J., and Moayyedi, P. (2011). Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 661–673.

Kingeter, L.M., and Lin, X. (2012). C-type lectin receptor-induced NF- κ B activation in innate immune and inflammatory responses. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 105–112.

Kitts, D.D., and Weiler, K. (2003). Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1309–1323.

Knust, E., and Bossinger, O. (2002). Composition and Formation of Intercellular Junctions in Epithelial Cells. *Science* 298, 1955–1959.

Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., et al. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* 111, 1665–1672.

Konaka, A., Kato, S., Tanaka, A., Kunikata, T., Korolkiewicz, R., and Takeuchi, K. (1999). Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol. Res.* *40*, 517–524.

Korhonen, H., and Pihlanto, A. (2003). Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Curr. Pharm. Des.* *9*, 1297–1308.

Kostic, A.D., Xavier, R.J., and Gevers, D. (2014). The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* *146*, 1489–1499.

Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* *75*, 263–274.

L

Lacy, B.E., Mearin, F., Chang, L., Chey, W.D., Lembo, A.J., Simren, M., and Spiller, R. (2016). Bowel Disorders. *Gastroenterology* *150*, 1393–1407.e5.

Laible, N.J., and Germaine, G.R. (1985). Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect. Immun.* *48*, 720–728.

Laine, A., Laurent, A., Mariage, A., Boschetti, G., Charlois, A.-L., Roblin, X., Bommelaer, G., Nancey, S., and Flourie, B. (2016). Psychosocial factors and relapse risk in Crohn's disease. In *ANNALES MEDICO-PSYCHOLOGIQUES*, (MASSON EDITEUR 21 STREET CAMILLE DESMOULINS, ISSY, 92789 MOULINEAUX CEDEX 9, FRANCE), pp. 461–467.

Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S.Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nuñez, G., and Keshav, S. (2003). Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* *125*, 47–57.

Lamb, K., Zhong, F., Gebhart, G.F., and Bielefeldt, K. (2006). Experimental colitis in mice and sensitization of converging visceral and somatic afferent pathways. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *290*, G451–G457.

Larauche, M., Mulak, A., and Taché, Y. (2011). Stress-Related Alterations of Visceral Sensation: Animal Models for Irritable Bowel Syndrome Study. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 213–234.

Lauziers, V. (2011). L'ALIMENTATION DE L'ÂNESSE EN LACTATION.

Le Pluart, D., Sabaté, J.-M., Bouchoucha, M., Hercberg, S., Benamouzig, R., and Julia, C. (2015). Functional gastrointestinal disorders in 35 447 adults and their association with body mass index. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *41*, 758–767.

Lee, J.C., and Parkes, M. (2011). Genome-wide association studies and Crohn's disease. *Brief. Funct. Genomics* *10*, 71–76.

Lee, J.C., Biacci, D., Roberts, R., Geary, R.B., Mansfield, J.C., Ahmad, T., Prescott, N.J., Satsangi, J., Wilson, D.C., Jostins, L., et al. (2017). Genome-wide association study identifies distinct genetic contributions to prognosis and susceptibility in Crohn's disease. *Nat. Genet.* *49*, 262–268.

Lennard-Jones, J.E. (1989). Classification of Inflammatory Bowel Disease. *Scand. J. Gastroenterol.* *24*, 2–6.

- Lepage, P., Häslér, R., Spehlmann, M.E., Rehman, A., Zvirbliene, A., Begun, A., Ott, S., Kupcinkas, L., Doré, J., Raedler, A., et al. (2011). Twin Study Indicates Loss of Interaction Between Microbiota and Mucosa of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* *141*, 227–236.
- Lerebours, E., Gower-Rousseau, C., Merle, V., Brazier, F., Debeugny, S., Marti, R., Salomez, J.L., Hellot, M.F., Dupas, J.L., Colombel, J.F., et al. (2007). Stressful Life Events as a Risk Factor for Inflammatory Bowel Disease Onset: A Population-Based Case–Control Study. *Am. J. Gastroenterol.* *102*, 122–131.
- Lesage, S., Zouali, H., Cézard, J.-P., Colombel, J.-F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C., Gassull, M., Binder, V., et al. (2002). CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 845–857.
- Levine, S. (2002). Regulation of the Hypothalamic-pituitary-adrenal Axis in the Neonatal Rat: The Role of Maternal Behavior. *Neurotox. Res.* *4*, 557–564.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., et al. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* *320*, 1647–1651.
- Li, B., Lee, C., Zani, A., Zani-Ruttenstock, E., Ip, W., Chi, L., Olguin, P.D., Gonska, T., and Pierro, A. (2014). Early maternal separation induces alterations of colonic epithelial permeability and morphology. *Pediatr. Surg. Int.* *30*, 1217–1222.
- Liesenfeld, O. (2002). Oral Infection of C57BL/6 Mice with *Toxoplasma gondii*: A New Model of Inflammatory Bowel Disease? *J. Infect. Dis.* *185*, S96–S101.
- Liu, B., Gulati, A.S., Cantillana, V., Henry, S.C., Schmidt, E.A., Daniell, X., Grossniklaus, E., Schoenborn, A.A., Sartor, R.B., and Taylor, G.A. (2013). *Irgm1*-deficient mice exhibit Paneth cell abnormalities and increased susceptibility to acute intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *305*, G573–G584.
- Lopez-Siles, M., Khan, T.M., Duncan, S.H., Harmsen, H.J.M., Garcia-Gil, L.J., and Flint, H.J. (2012). Cultured Representatives of Two Major Phylogroups of Human Colonic *Faecalibacterium prausnitzii* Can Utilize Pectin, Uronic Acids, and Host-Derived Substrates for Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 420–428.
- Lopez-Siles, M., Martinez-Medina, M., Abellà, C., Busquets, D., Sabat-Mir, M., Duncan, S.H., Aldeguer, X., Flint, H.J., and Garcia-Gil, L.J. (2015). Mucosa-Associated *Faecalibacterium prausnitzii* Phylotype Richness Is Reduced in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 7582–7592.
- Lotz, M., Ménard, S., and Hornef, M. (2007). Innate immune recognition on the intestinal mucosa. *Int. J. Med. Microbiol.* *297*, 379–392.
- Louis, P., and Flint, H.J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* *294*, 1–8.
- Louis, P., Young, P., Holtrop, G., and Flint, H.J. (2010). Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ. Microbiol.* *12*, 304–314.
- Louis, P., Hold, G.L., and Flint, H.J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 661–672.

Lu, D., Li, Q., Wu, Z., Shang, S., Liu, S., Wen, X., Li, Z., Wu, F., and Li, N. (2014). High-level recombinant human lysozyme expressed in milk of transgenic pigs can inhibit the growth of *Escherichia coli* in the duodenum and influence intestinal morphology of sucking pigs. *PLoS One* 9, e89130.

Lucas, A., and Cole, T.J. (1990). Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet Lond. Engl.* 336, 1519–1523.

Luckey, T.D. (1972). Introduction to intestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 1292–1294.

M

MacDONALD, L.E., Brett, J., Kelton, D., Majowicz, S.E., Snedeker, K., and Sargeant, J.M. (2011). A systematic review and meta-analysis of the effects of pasteurization on milk vitamins, and evidence for raw milk consumption and other health-related outcomes. *J. Food Prot.* 74, 1814–1832.

MacFie, J., O’Boyle, C., Mitchell, C.J., Buckley, P.M., Johnstone, D., and Sudworth, P. (1999). Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 45, 223–228.

Maga, E.A., Desai, P.T., Weimer, B.C., Dao, N., Kültz, D., and Murray, J.D. (2012). Consumption of Lysozyme-Rich Milk Can Alter Microbial Fecal Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6153–6160.

Maharshak, N., Packey, C.D., Ellermann, M., Manick, S., Siddle, J.P., Huh, E.Y., Plevy, S., Sartor, R.B., and Carroll, I.M. (2013). Altered enteric microbiota ecology in interleukin 10-deficient mice during development and progression of intestinal inflammation. *Gut Microbes* 4, 316–324.

Malissiova, E., Arsenos, G., Papademas, P., Fletouris, D., Manouras, A., Aspri, M., Nikolopoulou, A., Giannopoulou, A., and Arvanitoyannis, I.S. (2016). Assessment of donkey milk chemical, microbiological and sensory attributes in Greece and Cyprus. *Int. J. Dairy Technol.* 69, 143–146.

Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., et al. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205–211.

Mao, X., Gu, J., Sun, Y., Xu, S., Zhang, X., Yang, H., and Ren, F. (2009). Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. *Int. Dairy J.* 19, 703–708.

Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., et al. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44, 94–102.

Marotta, F., Naito, Y., Tajiri, H., Lighthouse, J., Yoshioka, M., Oglari, C., Bozzani, A., Fuji, H., and Fesce, E. (2003). Disrupted mucosal barrier in quiescent ulcerative colitis: effect of metronidazole and of a symbiotic preparation in a pilot cross-over study. *Chin. J. Dig. Dis.* 4, 180–185.

Marques, R., and Boneca, I.G. (2011). Expression and functional importance of innate immune receptors by intestinal epithelial cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3661.

Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Lu, J., Gratadoux, J.-J., Sokol, H., Verdu, E.F., Bercik, P., Bermúdez-Humarán, L.G., and Langella, P. (2014). The Commensal Bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* Is Protective in DNBS-induced Chronic Moderate and Severe Colitis Models. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 417–430.

- Masschalck, B., and Michiels, C.W. (2003). Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* *29*, 191–214.
- Masschalck, B., Houdt, R.V., Haver, E.G.R.V., and Michiels, C.W. (2001). Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Lysozyme, Denatured Lysozyme, and Lysozyme-Derived Peptides under High Hydrostatic Pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 339–344.
- Masschalck, B., Deckers, D., and Michiels, C.W. (2002). Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of gram-positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure. *J. Food Prot.* *65*, 1916–1923.
- Mastroianni, J.R., and Ouellette, A.J. (2009). α -Defensins in Enteric Innate Immunity. *J. Biol. Chem.* *284*, 27848–27856.
- Mastroianni, J.R., Costales, J.K., Zaksheske, J., Selsted, M.E., Salzman, N.H., and Ouellette, A.J. (2012). Alternative luminal activation mechanisms for paneth cell α -defensins. *J. Biol. Chem.* *287*, 11205–11212.
- Maunder, R.G., and Levenstein, S. (2008). The Role of Stress in the Development and Clinical Course of Inflammatory Bowel Disease: Epidemiological Evidence. *Curr. Mol. Med.* *8*, 247–252.
- Mawdsley, J.E., and Rampton, D.S. (2005). Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* *54*, 1481–1491.
- Mawe, G.M., and Hoffman, J.M. (2013). Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 473–486.
- Mayer, E.A. (2011). Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 453–466.
- Mazzon, E., Sturniolo, G.C., Puzzolo, D., Frisina, N., and Fries, W. (2002). Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. *Gut* *51*, 507–513.
- McGuckin, M.A., and Hasnain, S.Z. (2017). Goblet cells as mucosal sentinels for immunity. *Mucosal Immunol.*
- McLaughlin, K.J., Gomez, J.L., Baran, S.E., and Conrad, C.D. (2007). The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: An evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res.* *1161*, 56–64.
- Medzhitov (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* *454*, 428–435.
- Meisel, H., Meisel, H., Fairweather-Tait, S., FitzGerald, R.J., Hartmann, R., Lane, C.N., McDonagh, D., Teucher, B., and Wal, J.M. (2003). Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *Br. J. Nutr.* *89*, 351–358.
- Melgar, S., Karlsson, A., and Michaëlsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *288*, G1328–G1338.
- Menees, S.B., Maneerattannaporn, M., Kim, H.M., and Chey, W.D. (2012). The Efficacy and Safety of Rifaximin for the Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *107*, 28–35.

- Miki, K., Moore, D.J., Butler, R.N., Southcott, E., Couper, R.T., and Davidson, G.P. (1998). The sugar permeability test reflects disease activity in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J. Pediatr.* *133*, 750–754.
- Mikulski, Z., Johnson, R., Shaked, I., Kim, G., Nowyhed, H., Goodman, W., Chodaczek, G., Pizarro, T.T., Cominelli, F., and Ley, K. (2015). SAMP1/YitFc Mice Develop Ileitis via Loss of CCL21 and Defects in Dendritic Cell Migration. *Gastroenterology* *148*, 783–793.e5.
- Miller, T.L., and Wolin, M.J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 1589–1592.
- Minderhoud, I.M., Oldenburg, B., Wismeijer, J.A., Van Berge Henegouwen, G.P., and Smout, A.J. (2004). IBS-like symptoms in patients with inflammatory bowel disease in remission; relationships with quality of life and coping behavior. *Dig. Dis. Sci.* *49*, 469–474.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Darewicz, M., Iwaniak, A., Dziuba, M., and Nałęcz, D. (2008). Food peptidomics. *Food Technol. Biotechnol.* *46*, 1–10.
- Miquel, S., Martín, R., Bridonneau, C., Robert, V., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L.G., Thomas, M., and Langella, P. (2014). Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. *Gut Microbes* *5*, 146–151.
- Miquel, S., Leclerc, M., Martin, R., Chain, F., Lenoir, M., Raguideau, S., Hudault, S., Bridonneau, C., Northen, T., Bowen, B., et al. (2015). Identification of Metabolic Signatures Linked to Anti-Inflammatory Effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *MBio* *6*, e00300-15.
- Mohanty, D.P., Mohapatra, S., Misra, S., and Sahu, P.S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi J. Biol. Sci.* *23*, 577–583.
- Molloy, M.J., Grainger, J.R., Bouladoux, N., Hand, T.W., Koo, L.Y., Naik, S., Quinones, M., Dzutsev, A.K., Gao, J.-L., Trinchieri, G., et al. (2013). Intraluminal Containment of Commensal Outgrowth in the Gut during Infection-Induced Dysbiosis. *Cell Host Microbe* *14*, 318–328.
- Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., et al. (2012). Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* *142*, 46–54.e42.
- Moloney, R.D., Johnson, A.C., O'Mahony, S.M., Dinan, T.G., Greenwood-Van Meerveld, B., and Cryan, J.F. (2016). Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome. *CNS Neurosci. Ther.* *22*, 102–117.
- Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., and Wallace, J.L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* *96*, 795–803.
- Moussa, L., Bézirard, V., Salvador-Cartier, C., Bacquié, V., Lencina, C., Lévêque, M., Braniste, V., Ménard, S., Théodorou, V., and Houdeau, E. (2012). A Low Dose of Fermented Soy Germ Alleviates Gut Barrier Injury, Hyperalgesia and Faecal Protease Activity in a Rat Model of Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* *7*.
- M.P. Bennet, S., Ohman, L., and Simren, M. (2015). Gut Microbiota as Potential Orchestrators of Irritable Bowel Syndrome. *Gut Liver* *9*.

Müller, C.A., Autenrieth, I.B., and Peschel, A. (2005). Intestinal epithelial barrier and mucosal immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 1297.

Muniz, L.R., Knosp, C., and Yeretssian, G. (2012). Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front. Immunol.* *3*.

Muraro, M.A., Giampietro, P.G., and Galli, E. (2002). Soy formulas and nonbovine milk. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* *89*, 97–101.

Murua, A., Todorov, S.D., Vieira, A.D.S., Martinez, R.C.R., Cencič, A., and Franco, B.D.G.M. (2013). Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of *Lactobacillus plantarum* with potential beneficial properties from donkey milk. *J. Appl. Microbiol.* *114*, 1793–1809.

N

Nagpal, R., Behare, P., Rana, R., Kumar, A., Kumar, M., Arora, S., Morotta, F., Jain, S., and Yadav, H. (2011). Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food Funct.* *2*, 18–27.

Nakamura, K., Sakuragi, N., and Ayabe, T. (2013). A monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of secreted α -defensin. *Anal. Biochem.* *443*, 124–131.

NAKAMURA, K., SAKURAGI, N., TAKAKUWA, A., and AYABE, T. (2016). Paneth cell α -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Biosci. Microbiota Food Health* *35*, 57–67.

Nash, J.A., Ballard, T.N.S., Weaver, T.E., and Akinbi, H.T. (2006). The Peptidoglycan-Degrading Property of Lysozyme Is Not Required for Bactericidal Activity In Vivo. *J. Immunol.* *177*, 519–526.

Nazzaro, F. (2010). Isolation of Components with Antimicrobial Property from the Donkey Milk: A Preliminary Study. *Open Food Sci. J.* *4*, 43–47.

Nébot-Vivinus, M. (2014). Multispecies probiotic protects gut barrier function in experimental models. *World J. Gastroenterol.* *20*, 6832.

Neutra, M.R., Mantis, N.J., and Kraehenbuhl, J.-P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* *2*, 1004–1009.

Nevalainen, T.J., Graham, G.G., and Scott, K.F. (2008). Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1781*, 1–9.

Newburg, D.S., Ko, J.S., Leone, S., and Nanthakumar, N.N. (2016). Human Milk Oligosaccharides and Synthetic Galactosyloligosaccharides Contain 3′-, 4-, and 6′-Galactosyllactose and Attenuate Inflammation in Human T84, NCM-460, and H4 Cells and Intestinal Tissue Ex Vivo. *J. Nutr.* *146*, 358–367.

Nguyen, T.L.A., Vieira-Silva, S., Liston, A., and Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis. Model. Mech.* *8*, 1–16.

North, C.S., Clouse, R.E., Spitznagel, E.L., and Alpers, D.H. (1990). The relation of ulcerative colitis to psychiatric factors: a review of findings and methods. *Am. J. Psychiatry* *147*, 974–981.

Nusrat, A., Turner, J.R., and Madara, J.L. (2000). IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *279*, G851–G857.

O

- Ogura, Y., Lala, S., Xin, W., Smith, E., Dowds, T.A., Chen, F.F., Zimmermann, E., Tretiakova, M., Cho, J.H., Hart, J., et al. (2003). Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52, 1591–1597.
- Ohkusa, T., and Koido, S. (2015). Intestinal microbiota and ulcerative colitis. *J. Infect. Chemother.* 21, 761–768.
- Öhman, L., and Simrén, M. (2010). Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 163–173.
- Okamoto, K., and Aoki, K. (1963). Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Jpn. Circ. J.* 27, 282–293.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694–702.
- Olesen, M., and Gudmand-Høyer, E. (2000). Efficacy, safety, and tolerability of fructooligosaccharides in the treatment of irritable bowel syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1570–1575.
- O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F., et al. (2005). Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 128, 541–551.
- O'Neil, D.A., Porter, E.M., Elewaut, D., Anderson, G.M., Eckmann, L., Ganz, T., and Kagnoff, M.F. (1999). Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 6718–6724.
- Osman Swar, M. (2011). Donkey milk-based formula: A substitute for patients with cow's milk protein allergy. *Sudan. J. Paediatr.* 11, 21–24.
- Oświęcimska, J., Szymłak, A., Roczniak, W., Girczys-Połedniok, K., and Kwiecień, J. (2017). New insights into the pathogenesis and treatment of irritable bowel syndrome. *Adv. Med. Sci.* 62, 17–30.

P

- Paineau, D., Payen, F., Panserieu, S., Coulombier, G., Sobaszek, A., Lartigau, I., Brabet, M., Galmiche, J.-P., Tripodi, D., Sacher-Huvelin, S., et al. (2008). The effects of regular consumption of short-chain fructo-oligosaccharides on digestive comfort of subjects with minor functional bowel disorders. *Br. J. Nutr.* 99, 311–318.
- Patel, S.M., Stason, W.B., Legedza, A., Ock, S.M., Kaptchuk, T.J., Conboy, L., Canenguez, K., Park, J.K., Kelly, E., Jacobson, E., et al. (2005). The placebo effect in irritable bowel syndrome trials: a meta-analysis. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 17, 332–340.
- Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., and Gambacorta, E. (2015). Donkey Milk for Manufacture of Novel Functional Fermented Beverages. *J. Food Sci.* 80, S1352-1359.
- Persson, P.-G., Ahlbom, A., and Hellers, G. (1992). Diet and Inflammatory Bowel Disease: A Case-Control Study. *Epidemiology* 3, 47–52.

- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 141–153.
- Piche, T. (2014). Tight junctions and IBS--the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *26*, 296–302.
- Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Varannes, S.B. des, Dainese, R., Nano, J.L., Cremon, C., Stanghellini, V., Giorgio, R.D., Galmiche, J.P., et al. (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* *58*, 196–201.
- Piche, T., Ducrotté, P., Sabate, J.M., Coffin, B., Zerbib, F., Dapoigny, M., Hua, M., Marine-barjoan, E., Dainese, R., and Hébuterne, X. (2010). Impact of functional bowel symptoms on quality of life and fatigue in quiescent Crohn disease and irritable bowel syndrome: IBS-like symptoms in quiescent CD patients. *Neurogastroenterol. Motil.* *22*, 626-e174.
- Pilla, R., Daprà, V., Zecconi, A., and Piccinini, R. (2010). Hygienic and health characteristics of donkey milk during a follow-up study. *J. Dairy Res.* *77*, 392–397.
- Pimentel, M., Chatterjee, S., Chow, E.J., Park, S., and Kong, Y. (2006). Neomycin Improves Constipation-Predominant Irritable Bowel Syndrome in a Fashion That Is Dependent on the Presence of Methane Gas: Subanalysis of a Double-Blind Randomized Controlled Study. *Dig. Dis. Sci.* *51*, 1297–1301.
- Pimentel, M., Lembo, A., Chey, W.D., Zakko, S., Ringel, Y., Yu, J., Mareya, S.M., Shaw, A.L., Bortey, E., and Forbes, W.P. (2011). Rifaximin Therapy for Patients with Irritable Bowel Syndrome without Constipation. *N. Engl. J. Med.* *364*, 22–32.
- Pitz, M., Cheang, M., and Bernstein, C.N. (2005). Defining the predictors of the placebo response in irritable bowel syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *3*, 237–247.
- Pline l’Ancien, l’Ancien Histoire naturelle. Livre XXVIII - PLINE L’ANCIEN.
- Plovier, H., Everard, A., Druart, C., Depommier, C., Van Hul, M., Geurts, L., Chilloux, J., Ottman, N., Duparc, T., Lichtenstein, L., et al. (2017). A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat. Med.* *23*, 107–113.
- Polidori, P., and Vincenzetti, S. (2012). Protein Profile Characterization of Donkey Milk. In *Milk Protein*, W. Hurley, ed. (InTech), p.
- Polidori, P., and Vincenzetti, S. (2013a). Use of Donkey Milk in Children with Cow’s Milk Protein Allergy. *Foods* *2*, 151–159.
- Polidori, P., and Vincenzetti, S. (2013b). Effects of thermal treatments on donkey milk nutritional characteristics. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* *5*, 182–187.
- Polidori, P., Beghelli, D., Mariani, P., and Vincenzetti, S. (2010). Donkey milk production: state of the art. *Ital. J. Anim. Sci.* *8*, 677–683.
- Poligné, J. (2011). La capacité du système immunitaire intestinal à tolérer les bactéries commensales et à les «utiliser» pour être plus réactif face aux pathogènes. *Synthèse Bibliogr. En Immunol.*

Prince, A.C., Myers, C.E., Joyce, T., Irving, P., Lomer, M., and Whelan, K. (2016). Fermentable Carbohydrate Restriction (Low FODMAP Diet) in Clinical Practice Improves Functional Gastrointestinal Symptoms in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **22**, 1129–1136.

Proctor, V.A., and Cunningham, F.E. (1988). The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **26**, 359–395.

Q

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65.

Quigley, E.M. (2009). Review: Do patients with functional gastrointestinal disorders have an altered gut flora? *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2**, s23–s30.

Quigley, E.M.M. (2012). Prebiotics and probiotics: their role in the management of gastrointestinal disorders in adults. *Nutr. Clin. Pract. Off. Publ. Am. Soc. Parenter. Enter. Nutr.* **27**, 195–200.

R

Rachinel, N., Buzoni-Gatel, D., Dutta, C., Mennechet, F.J.D., Luangsay, S., Minns, L.A., Grigg, M.E., Tomavo, S., Boothroyd, J.C., and Kasper, L.H. (2004). The Induction of Acute Ileitis by a Single Microbial Antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **173**, 2725–2735.

Ragona, G., Corrias, F., Benedetti, M., Paladini, I., Salari, F., Altomonte, I., and Martini, M. (2016). Amiata donkey milk chain: animal health evaluation and milk quality. *Ital. J. Food Saf.* **5**.

Rajca, S., Grondin, V., Louis, E., Vernier-Massouille, G., Grimaud, J.-C., Bouhnik, Y., Laharie, D., Dupas, J.-L., Pillant, H., Picon, L., et al. (2014). Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**, 978–986.

Rajilić-Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H.G.H.J., Kajander, K., Kekkonen, R.A., Tims, S., and de Vos, W.M. (2011). Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **141**, 1792–1801.

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229–241.

Ramasundara, M., Leach, S.T., Lemberg, D.A., and Day, A.S. (2009). Defensins and inflammation: The role of defensins in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **24**, 202–208.

Rampelli, S., Candela, M., Turroni, S., Biagi, E., Pflueger, M., Wolters, M., Ahrens, W., and Brigidi, P. (2016). Microbiota and lifestyle interactions through the lifespan. *Trends Food Sci. Technol.* **57**, 265–272.

Rao, A.V., Bested, A.C., Beaulne, T.M., Katzman, M.A., Iorio, C., Berardi, J.M., and Logan, A.C. (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog.* **1**, 6.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., and Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 659–661.

Règlement (CE) n°1924/2006, C.L.A.N. Règlement (CE) no 1924/2006 du parlement européen et du conseil du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires.

Reul, J.M.H.M., and Holsboer, F. (2002). Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr. Opin. Pharmacol.* *2*, 23–33.

Rhee, S.H., Pothoulakis, C., and Mayer, E.A. (2009). Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *6*, 306–314.

Riba, A., Olier, M., Lacroix-Lamande, S., Lencina, C., Bacquie, V., Sommer, C., Cartier, C., Laurent, F., Theodorou, V., and Menard, S. (2017). Microbiota Dysbiosis Induced by Defect of Paneth Cells Triggers Visceral Hypersensitivity in Mice. *Gastroenterology* *152*, S40.

Rivera-Nieves, J., Bamias, G., Vidrich, A., Marini, M., Pizarro, T.T., McDuffie, M.J., Moskaluk, C.A., Cohn, S.M., and Cominelli, F. (2003). Emergence of perianal fistulizing disease in the SAMP1/YitFc mouse, a spontaneous model of chronic ileitis. *Gastroenterology* *124*, 972–982.

Rivier, C., Rivier, J., and Vale, W. (1986). Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science* *231*, 607–610.

Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., et al. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* *104 Suppl 2*, S1-63.

Robert, A., and Asano, T. (1977). Resistance of germfree rats to indomethacin-induced intestinal lesions. *Prostaglandins* *14*, 333–341.

Rocha, J.D.B., Schlossmacher, M.G., and Philpott, D.J. (2015). LRRK2 and Nod2 promote lysozyme sorting in Paneth cells. *Nat. Immunol.* *16*, 898–900.

Rojas-Macías, V., Rodríguez-Fandiño, O., Jiménez-Ponce, F., Saldivar-González, J.A., Melendro-Lozano, E., López-Alvarenga, J.C., Raya-Santoyo, S.B., Santana-Vargas, A.D., and Schmulson, M. (2010). [External validity of a relevant model for Irritable Bowel Syndrome (IBS) using chronic stress by water avoidance in Wistar rats]. *Rev. Gastroenterol. México* *75*, 421–426.

Róka, R., Demaude, J., Cenac, N., Ferrier, L., Salvador-Cartier, C., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2007). Colonic luminal proteases activate colonocyte proteinase-activated receptor-2 and regulate paracellular permeability in mice. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *19*, 57–65.

Ruddick, J.P., Evans, A.K., Nutt, D.J., Lightman, S.L., Rook, G.A.W., and Lowry, C.A. (2006). Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev. Mol. Med.* *8*, 1–27.

S

Sa, A., Krishnaa, R.S., Pavithrab, V., Hemalathab, V., and Ingalea, P. (2011). Production and antibacterial activity of bacteriocin by *Lactobacillus paracasei* isolated from donkey milk. *Int. J. Curr. Sci.* *10*.

Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A.C., and Horak, I. (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* *75*, 253–261.

Salimei, E., and Fantuz, F. (2012). Equid milk for human consumption. *Int. Dairy J.* *24*, 130–142.

- Salimei, E., Fantuz, F., Coppola, R., Chiofalo, B., Polidori, P., and Varisco, G. (2004a). Composition and characteristics of ass's milk. *Anim. Res.* *53*, 67–78.
- Salimei, E., Fantuz, F., Coppola, R., Chiofalo, B., Polidori, P., and Varisco, G. (2004b). Composition and characteristics of ass's milk. *Anim. Res.* *53*, 67–78.
- Salminen, S., and Isolauri, E. (2006). Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *J. Pediatr.* *149*, S115–S120.
- Salzman, N.H. (2010). Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: Détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* *1*, 401–406.
- Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Hanauer, S.B., Lochs, H., Löfberg, R., Modigliani, R., Present, D.H., Rutgeerts, P., Schölmerich, J., Stange, E.F., et al. (2002). A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology* *122*, 512–530.
- Sansonetti, P.J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 953–964.
- Sansonetti, P.J., and Medzhitov, R. (2009). Learning Tolerance while Fighting Ignorance. *Cell* *138*, 416–420.
- Santos, J., Saunders, P.R., Hanssen, N.P.M., Yang, P.-C., Yates, D., Groot, J.A., and Perdue, M.H. (1999). Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *277*, G391–G399.
- Santos, J., Yang, P.C., Söderholm, J.D., Benjamin, M., and Perdue, M.H. (2001). Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* *48*, 630–636.
- Šarić, L.Ć., Šarić, B.M., Mandić, A.I., Torbica, A.M., Tomić, J.M., Cvetković, D.D., and Okanović, Đ.G. (2012). Antibacterial properties of Domestic Balkan donkeys' milk. *Int. Dairy J.* *25*, 142–146.
- Šarić, L.Ć., Šarić, B.M., Kravić, S.Ž., Plavšić, D.V., Milovanović, I.L., Gubić, J.M., and Nedeljković, N.M. (2014). Antibacterial activity of Domestic Balkan donkey milk toward *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Feed Res.* *41*, 47–54.
- Sarno, E., Santoro, A.M.L., Di Palo, R., and Costanzo, N. (2012). Microbiological quality of raw donkey milk from Campania Region. *Ital. J. Anim. Sci.* *11*, e49.
- Sartor, R.B. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* *126*, 1620–1633.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* *134*, 577–594.
- Sartor, R.B. (2015). Gut microbiota: Optimal sampling of the intestinal microbiota for research. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 253–254.
- Sartor, R.B., and Muehlbauer, M. (2007). Microbial host interactions in IBD: implications for pathogenesis and therapy. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *9*, 497–507.
- Savage, D.C. (1977). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu. Rev. Microbiol.* *31*, 107–133.

- Schaubeck, M., Clavel, T., Calasan, J., Lagkouvardos, I., Haange, S.B., Jehmlich, N., Basic, M., Dupont, A., Hornef, M., Bergen, M. von, et al. (2015). Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* *gutjnl-2015-309333*.
- Schaubeck, M., Clavel, T., Calasan, J., Lagkouvardos, I., Haange, S.B., Jehmlich, N., Basic, M., Dupont, A., Hornef, M., Bergen, M. von, et al. (2016). Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* *65*, 225–237.
- Schauber, J., Rieger, D., Weiler, F., Wehkamp, J., Eck, M., Fellermann, K., Scheppach, W., Gallo, R.L., and Stange, E.F. (2006). Heterogeneous expression of human cathelicidin hcap18/II-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *18*, 615–621.
- Scott, K.G.-E., Yu, L.C.H., and Buret, A.G. (2004). Role of CD8+ and CD4+ T Lymphocytes in Jejunal Mucosal Injury during Murine Giardiasis. *Infect. Immun.* *72*, 3536–3542.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* *14*, e1002533.
- Shukla, R., Ghoshal, U., Dhole, T.N., and Ghoshal, U.C. (2015). Fecal Microbiota in Patients with Irritable Bowel Syndrome Compared with Healthy Controls Using Real-Time Polymerase Chain Reaction: An Evidence of Dysbiosis. *Dig. Dis. Sci.* *60*, 2953–2962.
- Silk, D.B.A., Davis, A., Vulevic, J., Tzortzis, G., and Gibson, G.R. (2009). Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *29*, 508–518.
- Simms, L.A., Doecke, J.D., Walsh, M.D., Huang, N., Fowler, E.V., and Radford-Smith, G.L. (2008). Reduced -defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* *57*, 903–910.
- Simrén, M., Axelsson, J., Gillberg, R., Abrahamsson, H., Svedlund, J., and Björnsson, E.S. (2002). Quality of life in inflammatory bowel disease in remission: the impact of IBS-like symptoms and associated psychological factors. *Am. J. Gastroenterol.* *97*, 389–396.
- Sluis, M.V. der, Koning, B.A.E.D., Bruijn, A.C.J.M.D., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Goudoever, J.B.V., Büller, H.A., Dekker, J., Seunigen, I.V., Renes, I.B., et al. (2006). Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology* *131*, 117–129.
- Söderholm, J.D., and Perdue, M.H. (2001). II. Stress and intestinal barrier function. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *280*, G7–G13.
- Söderholm, J.D., Yang, P.-C., Ceponis, P., Vohra, A., Riddell, R., Sherman, P.M., and Perdue, M.H. (2002). Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* *123*, 1099–1108.
- Sokol, H., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Lay, C., Lepage, P., Podglajen, I., Marteau, P., and Doré, J. (2006). Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *12*, 106–111.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., et al. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16731–16736.

- Soloviev, M., and Finch, P. (2005). Peptidomics, current status. *J. Chromatogr. B* *815*, 11–24.
- Sousa, S.G., Delgadillo, I., and Saraiva, J.A. (2014). Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chem.* *151*, 79–85.
- Spencer, D.M., Veldman, G.M., Banerjee, S., Willis, J., and Levine, A.D. (2002). Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice. *Gastroenterology* *122*, 94–105.
- Spiller, R.C. (1999). Problems and challenges in the design of irritable bowel syndrome clinical trials: experience from published trials. *Am. J. Med.* *107*, 91S–97S.
- Spiller, R., and Major, G. (2016). IBS and IBD — separate entities or on a spectrum? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 613–621.
- Staudacher, H.M., Irving, P.M., Lomer, M.C.E., and Whelan, K. (2014). Mechanisms and efficacy of dietary FODMAP restriction in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *11*, 256–266.
- Strober, W., Nakamura, K., and Kitani, A. (2001). The SAMP1/Yit mouse: another step closer to modeling human inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* *107*, 667–670.
- Strugala, V., Dettmar, P.W., and Pearson, J.P. (2008). Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn’s disease. *Int. J. Clin. Pract.* *62*, 762–769.
- Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Assche, G.V., Geboes, K., Ceuppens, J.L., and Rutgeerts, P. (2002). Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn’s disease. *Am. J. Gastroenterol.* *97*, 2000–2004.
- Sun, L., Wang, W., Xiao, W., and Yang, H. (2016). The Roles of Cathelicidin LL-37 in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *22*, 1986–1991.
- Sun, Y., Zhang, M., Chen, C.-C., Gilliland, M., Sun, X., El-Zaatari, M., Huffnagle, G.B., Young, V.B., Zhang, J., Hong, S.-C., et al. (2013). Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice. *Gastroenterology* *144*, 1478–1487, 1487.e1-8.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., and Hale, L.P. (2005). Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* *11*, 1131–1140.

T

- Taché, Y., and Perdue, M.H. (2004). Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol. Motil.* *16*, 137–142.
- Taché, Y., V, M., M, M., and C, M. (2002). Role of corticotropin releasing factor receptor subtype 1 in stress-related functional colonic alterations: implications in irritable bowel syndrome. *Eur. J. Surg. Suppl. Acta Chir. Suppl.* 16–22.
- Tafaro, A., Magrone, T., Jirillo, F., Martemucci, G., D’Alessandro, A.G., Amati, L., and Jirillo, E. (2007). Immunological properties of donkey’s milk: its potential use in the prevention of atherosclerosis. *Curr. Pharm. Des.* *13*, 3711–3717.

- Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I., and Akira, S. (1999). Enhanced Th1 Activity and Development of Chronic Enterocolitis in Mice Devoid of Stat3 in Macrophages and Neutrophils. *Immunity* 10, 39–49.
- Takeuchi, K., Smale, S., Premchand, P., Maiden, L., Sherwood, R., Thjodleifsson, B., Bjornsson, E., and Bjarnason, I. (2006). Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 4, 196–202.
- Talley, N.J. (2008). Functional gastrointestinal disorders as a public health problem. *Neurogastroenterol. Motil.* 20, 121–129.
- Tannock, G.W. (1999). Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 265–278.
- Tap, J., Derrien, M., Törnblom, H., Brazeilles, R., Cools-Portier, S., Doré, J., Störsrud, S., Le Nevé, B., Öhman, L., and Simrén, M. (2017). Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 152, 111–123.e8.
- Taverniti, V., and Guglielmetti, S. (2014). Methodological issues in the study of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 8821.
- Terán-Ventura, E., Aguilera, M., Vergara, P., and Martínez, V. (2014). Specific changes of gut commensal microbiota and TLRs during indomethacin-induced acute intestinal inflammation in rats. *J. Crohns Colitis* 8, 1043–1054.
- Teruel, C., Garrido, E., and Mesonero, F. (2016). Diagnosis and management of functional symptoms in inflammatory bowel disease in remission. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 7, 78–90.
- Tesse, R., Paglialunga, C., Braccio, S., and Armenio, L. (2009). Adequacy and tolerance to ass's milk in an Italian cohort of children with cow's milk allergy. *Ital. J. Pediatr.* 35, 19.
- The Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. *Nature* 486, 207–214.
- Theodorou, V., Ait-Belgnaoui, A., Agostini, S., and Eutamene, H. (2014). Effect of commensals and probiotics on visceral sensitivity and pain in irritable bowel syndrome. *Gut Microbes* 5, 430–629.
- Thierry, A., Pogačić, T., Weber, M., and Lortal, S. (2015). Production of Flavor Compounds by Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, F. Mozzi, R.R. Raya, and G.M. Vignolo, eds. (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 314–340.
- Thijssen, A.Y., Jonkers, D.M.A.E., Leue, C., van der Veek, P.P.J., Vidakovic-Vukic, M., van Rood, Y.R., Clemens, C.H.M., and Masclee, A.A.M. (2010). Dysfunctional cognitions, anxiety and depression in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 44, e236-241.
- Tidona, F., Sekse, C., Criscione, A., Jacobsen, M., Bordonaro, S., Marletta, D., and Vegarud, G.E. (2011). Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *Int. Dairy J.* 21, 158–165.
- Tidona, F., Criscione, A., Devold, T.G., Bordonaro, S., Marletta, D., and Vegarud, G.E. (2014). Protein composition and micelle size of donkey milk with different protein patterns: Effects on digestibility. *Int. Dairy J.* 35, 57–62.

Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet, D., Legrain–Raspaud, S., Trotin, B., Naliboff, B., et al. (2013). Consumption of Fermented Milk Product With Probiotic Modulates Brain Activity. *Gastroenterology* 144, 1394–1401.e4.

Trinchese, G., Cavaliere, G., Canani, R.B., Matamoros, S., Bergamo, P., De Filippo, C., Aceto, S., Gaita, M., Cerino, P., Negri, R., et al. (2015). Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *J. Nutr. Biochem.* 0.

Tsuchiya, J., Barreto, R., Okura, R., Kawakita, S., Fesce, E., and Marotta, F. (2004). Single-blind follow-up study on the effectiveness of a symbiotic preparation in irritable bowel syndrome. *Chin. J. Dig. Dis.* 5, 169–174.

Turchi, B., Pedonese, F., Torracca, B., Fratini, F., Mancini, S., Galiero, A., Montalbano, B., Cerri, D., and Nuvoloni, R. (2017). *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus thermophilus* as starter cultures for a donkey milk fermented beverage. *Int. J. Food Microbiol.* 256, 54–61.

Turnbull, A.V., and Rivier, C. (1997). Corticotropin-Releasing Factor (CRF) and Endocrine Responses to Stress: CRF Receptors, Binding Protein, and Related Peptides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215, 1–10.

U

Uejima, M., Kinouchi, T., Kataoka, K., Hiraoka, I., and Ohnishi, Y. (1996). Role of Intestinal Bacteria in Ileal Ulcer Formation in Rats Treated with a Nonsteroidal Antiinflammatory Drug. *Microbiol. Immunol.* 40, 553–560.

Unjacke-Lowe, T., Huppertz, T., and Fox, P.F. (2010). Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. *Int. Dairy J.* 20, 609–629.

V

Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Ismail, A.S., Eckmann, L., and Hooper, L.V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 20858–20863.

Valenti, P., and Antonini, G. (2005). Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 2576–2587.

Van Hauwermeiren, F., Vandenbroucke, R., Grine, L., Lodens, S., Van Wonterghem, E., De Rycke, R., De Geest, N., Hassan, B., and Libert, C. (2015). TNFR1-induced lethal inflammation is mediated by goblet and Paneth cell dysfunction. *MUCOSAL Immunol.* 8, 828–840.

Van Spaendonk, H., Ceuleers, H., Witters, L., Patteet, E., Joossens, J., Augustyns, K., Lambeir, A.-M., De Meester, I., De Man, J.G., and De Winter, B.Y. (2017). Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. *World J. Gastroenterol.* 23, 2106–2123.

Vase, L., Robinson, M.E., Verne, G.N., and Price, D.D. (2005). Increased placebo analgesia over time in irritable bowel syndrome (IBS) patients is associated with desire and expectation but not endogenous opioid mechanisms. *Pain* 115, 338–347.

Vergnolle, N. (2005). Clinical relevance of proteinase activated receptors (pars) in the gut. *Gut* 54, 867–874.

- Vergnolle, N. (2008). Proteinase-activated receptors (PARs) in infection and inflammation in the gut. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 1219–1227.
- Verraes, C., Claeys, W., Cardoen, S., Daube, G., De Zutter, L., Imberechts, H., Dierick, K., and Herman, L. (2014). A review of the microbiological hazards of raw milk from animal species other than cows. *Int. DAIRY J.* *39*, 121–130.
- Vincenzetti, S., Polidori, P., Mariani, P., Cammertoni, N., Fantuz, F., and Vita, A. (2008). Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chem.* *106*, 640–649.
- Vincenzetti, S., Savini, M., Cecchini, C., Micozzi, D., Carpi, F., Vita, A., and Polidori, P. (2011). Effects of Lyophilization and Use of Probiotics on Donkey's Milk Nutritional Characteristics. *Int. J. Food Eng.* *7*.
- Vincenzetti, S., Foghini, L., Pucciarelli, S., Polzonetti, V., Cammertoni, N., Beghelli, D., and Polidori, P. (2014). Hypoallergenic properties of donkey's milk: a preliminary study. *Vet. Ital.* *50*, 99–107.

W

- Wahrens, R., Ohlsson, H., Sundquist, J., Sundquist, K., and Zöller, B. (2015). Risk of irritable bowel syndrome in first-degree, second-degree and third-degree relatives of affected individuals: a nationwide family study in Sweden. *Gut* *64*, 215–221.
- Wallace, J.L., MacNaughton, W.K., Morris, G.P., and Beck, P.L. (1989). Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *96*, 29–36.
- Wallon, C., Yang, P.-C., Keita, A.V., Ericson, A.-C., McKay, D.M., Sherman, P.M., Perdue, M.H., and Söderholm, J.D. (2008). Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. *Gut* *57*, 50–58.
- Walsh, M.A., Schneider, T.R., Sieker, L.C., Dauter, Z., Lamzin, V.S., and Wilson, K.S. (1998). Refinement of triclinic hen egg-white lysozyme at atomic resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *54*, 522–546.
- Wang, S., Zhu, H., Lu, C., Kang, Z., Luo, Y., Feng, L., and Lu, X. (2012). Fermented milk supplemented with probiotics and prebiotics can effectively alter the intestinal microbiota and immunity of host animals. *J. Dairy Sci.* *95*, 4813–4822.
- Warren Strober, Ivan J. Fuss, and Blumberg, R.S. (2002). The Immunology of Mucosal Models of Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 495–549.
- Watanabe, T., Higuchi, K., Kobata, A., Nishio, H., Tanigawa, T., Shiba, M., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Asahara, T., et al. (2008). Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut* *57*, 181–187.
- Watson, C.J., Rowland, M., and Warhurst, G. (2001). Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *281*, C388–C397.
- Wehkamp, J. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal -defensin expression. *Gut* *53*, 1658–1664.
- Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2010). Paneth's disease. *J. Crohns Colitis* *4*, 523–531.

- Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., et al. (2005). Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18129–18134.
- Wehkamp, J., Wang, G., Kübler, I., Nuding, S., Gregorieff, A., Schnabel, A., Kays, R.J., Fellermann, K., Burk, O., Schwab, M., et al. (2007). The Paneth cell α -defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J. Immunol.* *179*, 3109–3118.
- Wehkamp, J., Koslowski, M., Wang, G., and Stange, E.F. (2008). Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol.* *1 Suppl 1*, S67-74.
- Wells, J.M., Loonen, L.M.P., and Karczewski, J.M. (2010). The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int. J. Med. Microbiol.* *300*, 41–48.
- Welte, T., Zhang, S.S.M., Wang, T., Zhang, Z., Hesslein, D.G.T., Yin, Z., Kano, A., Iwamoto, Y., Li, E., Craft, J.E., et al. (2003). STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: A critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 1879–1884.
- Westbrook, A.M., Szakmary, A., and Schiestl, R.H. (2016). Mouse models of intestinal inflammation and cancer. *Arch. Toxicol.* *90*, 2109–2130.
- Whelan, K. (2013). Mechanisms and effectiveness of prebiotics in modifying the gastrointestinal microbiota for the management of digestive disorders. *Proc. Nutr. Soc.* *72*, 288–298.
- Whitehead, W.E., Holtkotter, B., Enck, P., Hoelzl, R., Holmes, K.D., Anthony, J., Shabsin, H.S., and Schuster, M.M. (1990). Tolerance for Rectosigmoid Distention in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *98*, 1187–1192.
- Whitehead, W.E., Crowell, M.D., Robinson, J.C., Heller, B.R., and Schuster, M.M. (1992). Effects of stressful life events on bowel symptoms: subjects with irritable bowel syndrome compared with subjects without bowel dysfunction. *Gut* *33*, 825–830.
- Wilhelmsen, I. (2000). Brain-gut axis as an example of the bio-psycho-social model. *Gut* *47*, iv5-iv7.
- Will, C.C., Aird, F., and Redei, E.E. (2003). Selectively bred Wistar-Kyoto rats: an animal model of depression and hyper-responsiveness to antidepressants. *Mol. Psychiatry* *8*, 925–932.
- Williams, C.L., Villar, R.G., Peterson, J.M., and Burks, T.F. (1988). Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: A model for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *94*, 611–621.
- Willing, B.P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A.F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot, G., Tysk, C., Jansson, J.K., and Engstrand, L. (2010). A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease Phenotypes. *Gastroenterology* *139*, 1844–1854.e1.
- Wilson, B., and Whelan, K. (2017). Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *32 Suppl 1*, 64–68.
- Wittkopf, N., Pickert, G., Billmeier, U., Mahapatro, M., Wirtz, S., Martini, E., Leppkes, M., Neurath, M.F., and Becker, C. (2015). Activation of Intestinal Epithelial Stat3 Orchestrates Tissue Defense during Gastrointestinal Infection. *PLOS ONE* *10*, e0118401.

Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., et al. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334, 105–108.

Wyatt, J., Vogelsang, H., Hübl, W., Waldhoer, T., and Lochs, H. (1993). Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *The Lancet* 341, 1437–1439.

X

Xiao, X., Nakatsu, G., Jin, Y., Wong, S., Yu, J., and Lau, J.Y.W. (2017). Gut Microbiota Mediates Protection Against Enteropathy Induced by Indomethacin. *Sci. Rep.* 7, 40317.

Y

Yamamoto, N., Ejiri, M., and Mizuno, S. (2003). Biogenic Peptides and Their Potential Use. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1345–1355.

Yang, Ma L, Zhao XG, and Su DQ (2006). Studies on the development and exploitation of donkey milk. *Chin. Food Nutr.* 4:22–24 -.

Yoshida, N., and Yoshikawa, T. (2008). Basic and translational research on proteinase-activated receptors: implication of proteinase/proteinase-activated receptor in gastrointestinal inflammation. *J. Pharmacol. Sci.* 108, 415–421.

Yvon, S., Olier, M., Leveque, M., Jard, G., Tormo, H., Haimoud-Lekhal, D.A., Peter, M., and Eutamène, H. (2016). Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. *Eur. J. Nutr.*

Z

Zani, A., Zani-Ruttenstock, E., Peyvandi, F., Lee, C., Li, B., and Pierro, A. (2016). A spectrum of intestinal injury models in neonatal mice. *Pediatr. Surg. Int.* 32, 65–70.

Zannini, E., and Arendt, E.K. (2017). Low FODMAPs and gluten-free foods for irritable bowel syndrome treatment: Lights and shadows. *Food Res. Int.*

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.

Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56, 61–72.

Zeng, J., Li, Y.-Q., Zuo, X.-L., Zhen, Y.-B., Yang, J., and Liu, C.-H. (2008). Clinical trial: effect of active lactic acid bacteria on mucosal barrier function in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 28, 994–1002.

Zhang, X.-Y., Zhao, L., Jiang, L., Dong, M.-L., and Ren, F.-Z. (2008). The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control* 19, 1191–1195.

Zhang Ming, Yukunlun (2015). Milking a new dairy product. Industries | chinadaily.com.cn.

Zhou, Q., Zhang, B., and Nicholas Verne, G. (2009). Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *PAIN* 146, 41–46.

Zhou, Q., Fillingim, R.B., Riley III, J.L., Malarkey, W.B., and Verne, G.N. (2010). Central and peripheral hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *PAIN*® 148, 454–461.

Zhou, X.-Y., Li, M., Li, X., Long, X., Zuo, X.-L., Hou, X.-H., Cong, Y.-Z., and Li, Y.-Q. (2016). Visceral hypersensitive rats share common dysbiosis features with irritable bowel syndrome patients. *World J. Gastroenterol.* 22, 5211–5227.

Zia, J., Schroeder, J., Munson, S., Fogarty, J., Nguyen, L., Barney, P., Heitkemper, M., and Ladabaum, U. (2016). Feasibility and Usability Pilot Study of a Novel Irritable Bowel Syndrome Food and Gastrointestinal Symptom Journal Smartphone App. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 7, e147.

(2016). *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects (InTech)*.

ANNEXES

Annexe 1 : Short communication lors des Journées Francophones de Nutrition 2014

publiée dans « *Nutrition clinique et métabolisme* »

Nutrition clinique et métabolisme 28 (2014) S67–S240

S167

métabolisme et du comportement ainsi que sur l'expression et la structuration du microbiote intestinal.

P189**Propriétés anti-inflammatoires du lait d'ânesse sur un modèle d'iléite chez la souris**

S. Yvon^{1,*}, M. Peter², M. Leveque¹, G. Jard², H. Tormo², M. Gaucher², F. Violleau², D. Ali Haimoud-Lekhal², H. Eutamène¹
¹UMR1331 Toxalim, INRA,

²Sciences agronomiques et agroalimentaire, Ecole Ingénieur Purpan, Toulouse, France

Introduction et but de l'étude. – Le lait d'ânesse (LA), connu depuis l'Antiquité pour ses vertus cosmétiques, semble avoir des propriétés nutritionnelles importantes pour l'homme de part sa composition similaire au lait humain (1). Il pourrait, sous réserve d'une supplémentation en acides gras saturés, être utilisé comme lait infantile pour les enfants n'ayant pas la possibilité de bénéficier de l'allaitement maternel, ou en tant que substitut pour des patients allergiques au lait de vache (2). Son intérêt est renforcé par de fortes teneurs en peptides antimicrobiens (lysozyme, lactoferrine) qui lui confère des propriétés anti-bactérienne, anti-tumorale et anti-inflammatoire (3-4). Parmi les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la maladie de Crohn (MC) se caractérise par une atteinte préférentielle de l'iléon. Une dysbiose associée à un dysfonctionnement des cellules de Paneth ont été décrites dans la MC. Ce dysfonctionnement se traduit par une moindre production de peptides antimicrobiens (lysozyme, α -défensines) par ces cellules. Ainsi, le but de notre étude était d'évaluer l'effet d'un apport exogène en LA riche en lysozyme sur un modèle d'iléite de Crohn chez la souris, mise récemment au point au laboratoire.

Matériel et méthodes. – Pour cela, des souris C57BL/6 ont reçu une administration orale d'indométacine afin de développer une iléite et ont été traitées ou non par du lait d'ânesse. Des scores lésionnels macroscopiques, microscopiques, une évaluation des niveaux d'expression des α -défensines, des taux de lysozyme dans les cellules de Paneth et le niveau de dysbiose ont été mesurés chez ces souris. La teneur et l'activité en lysozyme ont été mesurées dans le lait respectivement par RP-HPLC et à l'aide d'une réaction enzymatique par fluorescence.

Résultats et Analyse statistique. – Le lait d'ânesse administré aux animaux était riche en lysozyme ($3,6 \pm 1,3$ mg/ml de lait) avec une activité de 11800UI. L'indométacine a provoqué 1) une chute de la masse corporelle, 2) une augmentation ($p < 0,05$) des scores lésionnels, 3) une dysbiose et 4) une réduction d'expression des α -défensines et de lysozyme dans les cellules de Paneth. Un traitement au LA a réduit de façon significative l'ensemble des altérations mesurées dans ce modèle d'iléite.

Conclusion. – Le lait d'ânesse, riche en lysozyme, exerce des propriétés anti-inflammatoires en palliant le déficit endogène en peptides antimicrobiens observés lors d'une iléite et en réduisant la dysbiose intestinale. Cette étude permet de proposer le lait d'ânesse dans le cadre d'une stratégie thérapeutique d'appoint visant à maintenir/prolonger les périodes de rémission de la maladie de Crohn.

Références:

- Guo HY, Pang K, Zhang XY, Zhao L, Chen SW, Dong ML, Ren FZ. Composition, physicochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *J Dairy Sci.* 2007

- Carroccio A, Cavataio F, Montalto G, D'Amico D, Alabrese L, Iacono G. Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clin Exp Allergy.* 2000
- Jirillo F1, Jirillo E, Magrone T. Donkey's and goat's milk consumption and benefits to human health with special reference to the inflammatory status. *Curr Pharm Des.* 2010
- Mao X, Gu J, Sun Y, Xu S, Zhang X, Yang H, Ren F. Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cell. *Int Dairy J.* 2009.

P190**Étude fonctionnelle de l'hypothalamus humain en spectroscopie par résonance magnétique chez l'anorexique mentale : modifications induites par la prise alimentaire**

V. Florent^{1,2,3,*}, M. Baroncini⁴, P. Jissendi⁵, R. Lopes⁵, D. Guardia⁶, J. Vignau⁷, O. Viltart^{2,8}, I. Nilsson⁹, M. Romon³, V. Prevot²

¹Nutrition, CH Arras, Arras,

²Inserm U. 837,

³Nutrition,

⁴Neurochirurgie,

⁵Radiologie, CHRU Lille,

⁶Psychiatrie, clinique lauréamont,

⁷Psychiatrie, CHRU Lille,

⁸Université Lille 1, Lille, France,

⁹Karolinska Institutet, Stockholm, Suède

Introduction et but de l'étude. – L'hypothalamus est une structure de petite taille dont le rôle est essentiel dans la régulation de la prise alimentaire. Différentes boucles neuronales sont activées de manière différentielle lors des phases successives de la prise alimentaire. Malgré ce système de contrôle, des dysrégulations contribuent à des états pathologiques comme l'anorexie mentale (AM). La spectroscopie par résonance magnétique (SRM) étudie spécifiquement de multiples métabolites cérébraux impliqués dans le fonctionnement neuronal. L'essentiel des données acquises sur le contrôle central de l'homéostasie énergétique résulte d'études chez le rongeur, et peu de choses sont connues chez l'homme. Ce travail a pour objectif d'étudier les modifications de l'activité hypothalamique en réponse à la prise alimentaire chez la patiente anorexique mentale grâce à une technique d'imagerie cérébrale non invasive.

Matériel et méthodes. – Trois groupes de 10 sujets féminins ont été inclus, l'un avec un IMC normal (20-25), le second avec un IMC < 18 (groupe des maigreurs constitutionnelles), le dernier avec un IMC < 18 et un trouble du comportement alimentaire de type anorexie mentale restrictive pure. Chez chaque sujet a été réalisé deux IRM cérébrales avec séquence de SRM, l'une à jeun, et la seconde une heure après la prise d'un petit déjeuner calibré à 25 % des besoins énergétiques théoriques. L'exploration IRM a consisté en une SRM pour une étude la biochimie cérébrale in vivo avec une approche métabolique. L'influence de l'état nutritionnel (pré/post prandial) et du groupe de sujets sur les concentrations de métabolites hypothalamiques, a été analysée par le logiciel d'imagerie LC Model puis calculée par un test two-way ANOVA.

Résultats et Analyse statistique. – L'analyse des spectres retrouve dans le groupe témoin une majoration significative du N-acétyl-aspartate ($p < 0,05$) et du Glutamate ($p < 0,0001$) en post-prandial traduisant une activité neuronale et une activité de neurotransmission plus importante en post prandial dans cette région. Dans le groupe anorexie mentale, nous retrouvons une diminution significative du

Annexe 2 : Short communication lors du Digestive Disease Week 2016

Tu1902

A Natural Food Matrix Containing High Levels of Lysozyme Exerts Anti-Inflammatory Properties by Normalizing Antimicrobial Peptides Levels in Paneth's Cells in a Model of Crohn's Disease Ileitis-Like in Mice

Sophie Yvon, Maïwenn Olier, Mathilde Leveque, Gwenaëlle Jard, Helene Tormo, Djamila Ali Hamoud-Lekhal, Magali Peter, Helene Eutamene

Background: The inflammation in Crohn's disease (CD) mainly occurs in the ileum and is associated with a dysbiosis and a deficit of antimicrobial peptides contained in Paneth's cells. Nowadays new strategies of microbiome manipulations are on the light involving probiotics, prebiotics and specific diets to induce and/or to maintain clinical remission periods. Therefore, a supplementation diet with a natural food matrix containing antimicrobial peptides seems a good candidate for reducing ileitis. Donkey milk (DM) presents high levels of antimicrobial peptides like lysozyme (lys). The aims of this study were to characterize on an ileitis model the incidence of a chronic administration of DM on various inflammatory damages, on endogenous antimicrobial peptides levels contained in Paneth's cells and on fecal microbiota profile. **Methods:** Male C57BL/6 mice were used. Ileitis was induced by oral administration of indomethacin (0.25 mg/mouse) for 5 days. Animals received by oral route twice daily: vehicle (0.2 mL of PBS) or DM (0.2 mL - 11300U/mL of lys activity) or heated-DM (0.2 mL). The first treatments were performed 2 h before, during and 2 days after ileitis induction. Body weight was daily followed. After sacrifice, intestinal length and Macroscopic damage scores (MDS) were determined, ileal samples were taken off for microscopic damage (MD), lys immunostaining and mRNA α -defensin assessments. Ileal luminal content and fecal pellets were collected for lys enzymatic activity evaluation. Microbiota profile was determined via GULDA method on fecal material. **Results:** Oral administration of indomethacin caused an ileitis in mice characterized by: i) a significant body weight loss reaching 5% and a decrease of intestinal length, ii) a significant increase of MDS and MD, iii) a drastic reduction of both α -defensin mRNA expression and lys levels in Paneth's cells reflected by a significant decrease in feces of lys activity, and IV) a significant variation of fecal microbiota profile illustrating a clear dysbiosis. DM treatment significantly reduced almost of all these ileitis damages and particularly restored α -defensins mRNA and lys levels in Paneth's cells, the lys enzymatic activity measured both in ileal luminal content and in fecal pellets and in part reduced the dysbiosis induced by indomethacin. In contrast, heated-DM treatments have no impact on ileitis induced by indomethacin administration.

Conclusion: Donkey milk treatment which contained high levels of lysozyme exerts anti-inflammatory properties in mice by restoring the endogenous levels (in Paneth's cells) of antimicrobial peptides (lysozyme and α -defensin) and/or which in turn contribute to reduce ileitis dysbiosis. This study allows proposing donkey's milk as a helpful supplementary therapeutic treatment used to maintain/extend the remission periods in CD patients.

Annexe 3 : Agrément préfectoral



MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

Paris, le 30 DEC. 2016

Direction générale
de la recherche
et de l'innovation

Service de la performance,
du financement et de la
contractualisation avec les
organismes de recherche

Département de la culture
scientifique et des relations
avec la société

Cellule Animaux utilisés à des
Fins Scientifiques – AFIS –

Affaire suivie par
Virginie Vallet
Chargée de mission
Responsable de la cellule AFIS

Mél.
virginie.vallet-erdtmann
@recherche.gouv.fr

Plateforme
apafis.demat@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

Objet : Notification d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro APAFIS#4972-2016021814258245 v3,
- ayant pour titre : Etude des propriétés anti-inflammatoires d'une matrice alimentaire sur deux modèles de pathologies digestives chez la souris,
- déposé par l'Établissement Utilisateur : UMR1331 INRA/ENVT TOXALIM - Site INRA, numéro d'agrément C3155513, dont la responsable est Madame Michèle MARIN,
- et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par Madame Hélène HEUTAMENE,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'Établissement Utilisateur, pour une durée de 5 ans à compter de l'autorisation.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le Comité d'éthique en expérimentation animale N°086 et a reçu un avis favorable.

Ce projet fera l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective. Il vous appartiendra de prendre contact directement avec le Comité d'éthique.

Pour la ministre et par délégation
l'adjoint au Directeur général de la recherche et de
l'innovation

Pierre VALLA

Madame Michèle MARIN
UMR1331 INRA/ENVT TOXALIM
Site INRA

Annexe 4 : Accréditation FELASA « Utilisation et protection de l'animal de laboratoire » fournie par l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.


Accréditation FELASA catégorie C 11-05
Accréditation CNEA R-31ENVT-F1-12
Diplôme n° ENVT - 1 - 15/031

R É P U B L I Q U E F R A N Ç A I S E

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

D I P L Ô M E D'É C O L E

YU le procès-verbal du Jury d'examen sanctionnant l'Enseignement en date du 5 juin 2015

Madame **YVON Sophie**, née(e) le 13/10/1990 à MOISSAC

A subi avec succès les épreuves de l'Enseignement de :

« Utilisation et protection de l'animal de laboratoire niveau 1 »

Le présent certificat lui est délivré pour valoir ce que de droit.

Fait à Toulouse, le 15 juin 2015




ISABELLE CHMTELEIN,
DIRECTRICE DE L'ECOLE NATIONALE
VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE



CHRISTOPHE BRARD
PRÉSIDENT DU CONSEIL D'ADMINISTRATION
DE L'ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE



NATHALIE BOURCES-ABELLA,
ENSEIGNANTE RESPONSABLE



MARTINE KOLLER-CLAUW,
ENSEIGNANTE RESPONSABLE



ISABELLE RAYMOND-LETRON,
ENSEIGNANTE RESPONSABLE



N° Individuel d'identification FELASA
FELASA certificate ID N° ENVT - I -15/031

CERTIFICATE

YVON Sophie

has completed with success the FELASA Accredited Course FELASA 011/05

Utilisation et Protection des Animaux de Laboratoire-UPAL

9th march-20th march 2015

Kolf-Clauw Martine, DVM, PhD

INP-ENVT, Toulouse, France

for persons *carrying out procedures on animals (Function A), designing procedures and projects (Function B), taking care of animals (Function C), and for euthanasia (Function D)*

It covered the species mice and rats and included the additional task specific module N°8 "Minimally Invasive Procedures Without Anesthesia - Skills"

The FELASA accredited course 011/05 covered according to the Directive 2010/63/EU and the related EC Guidelines (EC, 2014³¹) the following :

Modules:

Core Modules	1,2,3,1,3,2,4,5,6,1
Function Modules	7, 9,10,11
Additional Task Specific Modules	20,21
Other Additional Tasks Modules	8

Use of Live Animals for:

Handling teaching	Mice, Rat
Minor Invasive Procedures teaching	Mice, Rat.

Date of issue : Monday 14th September 2015

Signature

BOURGES-ABELLA Nathalie
Course Organizer

Signature

KOLF-CLAUW Martine
Course Organizer

³¹ http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Endorsed_E-T.pdf.

Annexe 5 : Accréditation chirurgie « Chirurgie générale de l'animal de laboratoire »
fournie par l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.



<u>RESPONSABLE PEDAGOGIQUE</u>	<u>RESPONSABLE ADMINISTRATIF</u>
Giovanni MOGICATO Anatomie Tel. 33 1(0)561193896 g.mogicato@envt.fr	Ismeline MATHET Tel : 33 1 (0)561 19 32 72 Fax : 33 1 (0)561 19 32 53 i.mathet@envt.fr

CHIRURGIE GENERALE DE L'ANIMAL DE LABORATOIRE

Je soussignée, Ismeline Mathet, responsable administratif de la formation continue certifiée que :
Sophie YVON (INRA Toxalim) a participé à la formation **Chirurgie générale de l'animal de laboratoire** se déroulant à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse du 16 au 19 février 2016 pour une durée totale de 28 heures et avec pour objectifs pédagogiques :

Formation complète en chirurgie générale des animaux de laboratoire, préalable indispensable à la pratique d'une chirurgie à visée plus neurologique telle que la stéréotaxie par exemple ou à visée vasculaire ou autre

*La formation **chirurgie générale des animaux de laboratoire** traite des items réglementaires pré, per et postopératoires, préalable indispensable à la pratique d'une chirurgie à visée plus neurologique telle que la stéréotaxie par exemple. Le but est de contribuer à améliorer notamment la vision d'ensemble de l'architecture encéphalique et des relations structure-fonction. L'enseignement dispensé doit aider ainsi les techniciens et les scientifiques travaillant en chirurgie à s'adapter rapidement à des problématiques variées. Cette formation qui associe des spécialistes de l'industrie et des universitaires est à vocation essentiellement professionnelle.*

Fait à Toulouse, le 19 février 2016
Pour valoir et servir ce que de droit.
Ismeline MATHET
P/o C. COUPEZ

**ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE
DE TOULOUSE - D.E.V.E.**
Bureau des formations continues
23, chemin des Capelles - BP 87614
31076 TOULOUSE CEDEX 3



Annexe 6 : Récapitulatif de participation aux formations dans le cadre du doctorat.

Récapitulatif de participation aux Formations Sophie YVON
--

Doctorat : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Ecole Doctorale : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries

Etablissement : INPT Institut National Polytechnique de Toulouse

Date de la 1ere inscription en thèse : 15 octobre 2014 (4 A en 2017)

Directeur de thèse : Hélène EUTAMENE

Sujet de thèse : Etude des propriétés anti-inflammatoires du lait d'ânesse sur deux modèles de pathologies digestives et Elaboration d'un produit alimentaire.

Formations suivies

Catégorie : 1- Accompagnement de la thèse

- Tremplin jeunes chercheurs Agri Sud Ouest Innovation

20 heures enregistrées par : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries.

Total du nombre d'heures pour la catégorie 1- Accompagnement de la thèse : 20 h

Catégorie : Cours scientifiques et techniques

- Chirurgie générale de l'animal de laboratoire Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

28 heures enregistrées par : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries.

- Utilisation et protection des animaux de Laboratoire - UPAL Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

57 heures enregistrées par : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Cours scientifiques et techniques : 85 h

Catégorie : Diffusion des savoirs

- La Nuit européenne des chercheurs - 12ème édition (29 septembre 2017)

Lieu de la manifestation: Quai des Savoirs et Muséum de Toulouse et Cinémovida à Albi

Lieu de formation : MRV - 118 route de Narbonne Toulouse et Quai des Savoirs - 39 allées Jules Guesde 31400 Toulouse

18 heures

- MA THESE EN 180 SECONDES Université de Toulouse - Maison de la Recherche et de la Valorisation (MRV) 118 route de Narbonne

18 heures

Total du nombre d'heures pour la catégorie Diffusion des savoirs : 36 h

Catégorie : Doctoriales

- DOCTORIALES 2017 - ALBI (18 juin 2017) Ecole des Mines d'ALBI - allée des sciences - 81000 ALBI

40 heures

Total du nombre d'heures pour la catégorie Doctoriales : 40 h

Catégorie : Poursuite de carrière et insertion

- Bilan de compétences et projet professionnel - 2 jours (18 mai 2017)

14 heures

- Visa pour l'innovation (Propriété industrielle et Brevet) - 1 jour (08 novembre 2016) Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées - Maison de la Recherche et de la Valorisation (MRV) 118 route de Narbonne

6 heures

Total du nombre d'heures pour la catégorie Poursuite de carrière et insertion : 20 h

Catégorie : Recherche Documentaire et Publications

- Elaborer et développer sa recherche - 1 jour (05 avril 2017) Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées - Maison de la Recherche et de la Valorisation (MRV) 118 route de Narbonne

7 heures

Total du nombre d'heures pour la catégorie Recherche Documentaire et Publications : 7 h

Catégorie : Test Toeic

- Cours d'anglais - Préparation au TOEIC Université Paul Sabatier, Toulouse

48 heures enregistrées par : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Test Toeic : 48 h

Total participation : 256 heures / 10 modules

