ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Agriculture
Alimentation
Food
Biologie
Biology
Environnement
Environment
Santé
Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Nutrition humaine

présentée et soutenue publiquement par

Xinxin LIU

le 24 octobre 2013

Effets d'un régime hyperprotéique sur l'écosystème intestinal et d'un mélange d'acides aminés sur la cicatrisation de la muqueuse intestinale

Directeur de thèse : **François BLACHIER**

Co-encadrement de la thèse: **Anne-Marie DAVILA**

Jury

Professeur Daniel TOME, UMR914 PNCA, INRA/AgroParisTech	Président du jury
Docteur Moïse COEFFIER, MCU/PH, UMR1073, Université de Rouen	Rapporteur
Docteur Jean-Pierre SEGAIN, CR, UMR1280 PHAN, INRA/Nantes	Rapporteur
Docteur Lionel RIGOTTIER-GOIS, CR, Unité MICALIS, INRA /Jouy en Josas	Examinateur
Docteur Edith BROT-LAROCHE, DR, UMR S872, Centre de Recherche des Cordeliers	Examinateur
Docteur François BLACHIER, DR, UMR914 PNCA, INRA/AgroParisTech	Directeur de thèse

AgroParisTech
UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA)
16, rue Claude Bernard 75005 PARIS

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué dans l'UMR914 INRA/AgroParisTech Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, dans le cadre d'un financement de doctorat par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je remercie tout d'abord Pr. Daniel Tomé de m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire qu'il dirige et qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ma thèse.

Je tiens à remercier Moïse Coëffier et Jean-Pierre Segain d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Lionel Rigottier-Gois et Edith Brot-Laroche pour leur participation en tant qu'examinateurs.

Je remercie la société Ajinomoto pour leur financement d'une partie de mes expérimentations.

J'exprime ma grande reconnaissance à François Blachier, mon directeur de thèse, pour son encadrement tout au long de ces trois années de thèse, pour sa grande disponibilité, sa simplicité, sa confiance et pour sa compréhension lors des moments difficiles. A Mireille, pour son accompagnement, son aide et son soutien avec une petite pensée aux soupes chinoises que nous avons mangées ensemble.

J'exprime tout particulièrement ma profonde gratitude à Anne-Marie Davila, qui m'a encadrée, accompagnée, conseillée et soutenue pendant les moments difficiles durant ma thèse.

Je tiens à remercie vivement tout le personnel du labo « Microbial Ecophysiology and Nutrition Research » de Valencia en Espagne : Yolanda Sanz, la directrice qui m'a chaleureusement accueillie et encadrée durant un mois ; les thésards et stagiaires avec qui j'ai passé des moments très sympathiques. Je pense particulièrement à Arlette Santacruz, qui m'a apportée beaucoup d'aides techniques et à Sabina Wilkanowicz qui a toujours son humeur au top.

J'adresse mes remerciements aux personnes du Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon/Université Paris 7, à Jean-Claude Marie, pour sa bonne humeur, sa zénitude et son aide précieuse avec une petite pensée pour les pauvres petits rats malades, à Francine Walker pour son expertise en histopathologie et ses patientes explications, à Olivier Thibaudeau et Véronique Albano pour leurs excellentes aides techniques.

J'adresse également mes remerciements chaleureux à tout le personnel du labo. A toutes les personnes qui m'ont aidée durant ces trois années de thèse. A Catherine, Claire, Nadia, Annaïg et Jean-Marc pour leurs transmissions techniques. A Jean-François pour son expertise en dosage du glutathion. A Patrick pour la discussion de l'article. A Corine pour son aide technique et ses petits gâteaux. A Pierre-Henri pour son soutien et sa bonne humeur. Aux stagiaires qui ont contribué à l'avancement de mes travaux, Elodie Priez, Noémie Derriche et Martin Beaumont. A Nad, pour son aide en R et en anglais. A tous les thésards de co-bureau, Marion J., Rojo, Virginie, Anne-Sophie, Marion O., Emilien, Olga, Odile et Caroline, pour tous les bons moments passés ensemble.

Je voudrais exprimer ma plus profonde reconnaissance à mes parents et l'ensemble de ma famille en Chine, pour leur soutien absolu et inconditionnel durant mes dix ans d'études en France. Je suis sure qu'ils seront fiers de moi à travers ce travail de thèse.

Je termine en remerciant Cédric, pour ta présence, ton soutien et ton encouragement.

Résumé

Dans l'alimentation des pays industrialisés, l'apport en protéines est bien supérieur à l'apport nutritionnel conseillé (ANC). De plus, cet apport peut être encore supérieur lors de la consommation de régimes riches en protéines utilisés à des fins de perte de poids par des personnes obèses ou en surpoids. Cependant, les conséquences des régimes riches en protéines au niveau de l'écosystème du gros intestin sont encore très mal connues. Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié l'impact d'un régime hyperprotéique sur le microbiote, le contenu endoluminal du gros intestin et le métabolisme des colonocytes. Les rats ont consommé pendant 15 jours soit un régime hyperprotéique (53% de protéines) soit un régime normoprotéique (14% de protéines). Nous avons observé que le régime hyperprotéique réduit la quantité des groupes bactériens majeurs comme *Clostridium coccoides* et *Clostridium leptum*, ainsi que *Faecalibacterium prausnitzii* dans le microbiote du gros intestin avec conjointement des modifications sur sa biodiversité. En même temps, les quantités des produits finaux de la fermentation des acides aminés par le microbiote, les acides gras à chaîne courte (AGCC) et les acides gras à chaîne branchée sont fortement augmentées. Cependant, l'expression des transporteurs des acides monocarboxyliques et l'oxydation du butyrate par les colonocytes ne sont pas modifiés en lien avec des modifications mineures des concentrations en AGCC dues à une augmentation des contenus du gros intestin après l'ingestion du régime hyperprotéique. Il en résulte une augmentation de l'excrétion des AGCC dans les fèces. Ces phénomènes permettraient une homéostasie du métabolisme du butyrate dans les colonocytes, en lien avec le rôle crucial de cet AGCC sur l'épithélium du côlon.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons testé l'effet d'un mélange d'acides aminés (Thr, Met et Glu) sur la cicatrisation de la muqueuse colique après une colite induite par le DSS (dextran sodium sulfate) ; un modèle d'étude des maladies inflammatoires intestinales souvent utilisé. Une optimisation de la cicatrisation de la muqueuse intestinale émerge comme une cible thérapeutique, dans la prise en charge de ces maladies. La colite a été induite chez le rat avec 5% (w/v) de DSS pendant 6 jours, puis, à l'arrêt du traitement DSS, les animaux ont soit reçu le mélange d'acides aminé soit l'Ala comme témoin iso-azoté, pendant 3, 7 et 10 jours. Nous avons observé que 10 jours de complément en mélange d'acides aminés améliorent la cicatrisation post-colite, avec des modifications sur le taux de synthèse protéique dans la muqueuse colique, sans toutefois modifier la résolution de l'inflammation. Nos résultats suggèrent que l'utilisation des mélanges d'acides aminés améliore la cicatrisation de la muqueuse colique après colite chimio-induite.

Mots clé : régime riche en protéines, microbiote, acides gras à chaîne courte, métabolisme des colonocytes, colite, cicatrisation de la muqueuse intestinale.

Summary

In industrialized countries, protein intake is largely higher than the recommended dietary allowance (RDA). Furthermore, high protein diets are used for their slimming effect by obese or overweight people. However, little is known regarding to the consequences of a high protein diet on the large intestinal ecosystem. We thus study the influence of a high protein diet on the microbiota, on the endoluminal composition of the large intestine and on the butyrate metabolism by isolated colonocytes. Rats received during 15 days either a high protein diet (53% of proteins) or a normo protein diet (14% of proteins). We observed that the quantity of major bacterial groups *Clostridium coccoides* and *Clostridium leptum*, but also *Faecalibacterium prausnitzii* was reduced in the microbiota of the large intestine together with modifications of its biodiversity. In the same time, the quantities of short-chain fatty acids (SCFA) and branched-chain fatty acids, final products of bacterial fermentation of amino acids, were increased. However, the expression of monocarboxylic acid transporters and butyrate oxidation in colonocytes remained unchanged, in association with minor changes of the SCFA concentrations due to marked increase of the weight of the large intestine content. We then observed an increase in the amount of SCFA in the feces. These phenomena would allow homeostatic metabolism of butyrate in colonocytes, in relationship with its crucial role on the colonic epithelium

In the second part of this thesis, we have tested the effects of a mixture of amino acids (Thr, Met and Glu) on the colonic mucosa healing after colitis induced by DSS (dextran sodium sulphate); a model to study intestinal inflammatory bowel diseases largely used. Optimization of intestinal mucosa healing is more and more considered as a therapeutic goal. Colitis was induced in rats by 5% (w/v) DSS during 6 days, then at the end of the treatment with DSS, animals received either the amino acid mixture or Ala as iso-nitrogenous control, during 3, 7 or 10 days. We observed that 10 days amino acid mixture supplementation was able to improve the colonic mucosal healing, with modification of the protein synthesis rate, without however changes in the resolution of inflammation. Our results suggest that the supplementation with the amino acid mixture improve the mucosal healing after experimental colitis.

Key words : high protein diet, microbiota, short-chain fatty acids, colonocyte metabolism, colitis, intestinal mucosal healing.

Sommaire

LISTE DES FIGURES 8

LISTE DES TABLEAUX 9

LISTE DES ABREVIATIONS 10

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 12

1 PROTEINES DANS L'ALIMENTATION 13

1.1 Protéine : macronutriment 13

1.2 La consommation des protéines en France 13

1.3 Les rôles des acides aminés au niveau de l'intestin 14

1.4 Dégradation et absorption des protéines 14

2 PHYSIOLOGIE DU GROS INTESTIN 17

2.1 Structure du gros intestin 17

2.2 Epithélium colique 19

2.3 Métabolismes des acides aminés dans les colonocytes 22

3 MICROBIOTE INTESTINAL 28

3.1 Composition et rôles du microbiote 28

3.2 Métabolisme bactérien des protéines et des acides aminés 36

3.3 Utilisation des métabolites bactériens par l'hôte et ses effets physiologiques 41

4 MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN 48

4.1 Epidémiologie descriptive 49

4.2 Etiologie et pathogenèse 50

4.3 Etat inflammatoire dans la muqueuse 53

4.4 Cicatrisation de la muqueuse 59

4.5 Modèle expérimental : colite induite par le DSS 63

TRAVAUX PERSONNELS 66

5 ARTICLE 1 : UN REGIME RICHE EN PROTEINES MODIFIE LE MICROBIOTE COLIQUE ET L'ENVIRONNEMENT LUMINAL MAIS PAS LE METABOLISME DES COLONOCYTES DANS LE MODELE RAT: LA CONNECTION # 67

6 ARTICLE 2 : EFFETS BENEFIQUES D'UN MELANGE D'ACIDES AMINES SUR LA CICATRISATION DE LA MUQUEUSE COLIQUE CHEZ LE RAT## 100

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 113

7 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 114

7.1 Effets du régime hyperprotéique sur le microbiote, le métabolisme des colonocytes et le métabolisme de l'hôte 114

7.2 Effets des acides aminés sur la cicatrisation colique post-colite 119

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 125

Liste des figures

Figure 1. La structure histologique de la muqueuse colique. 18

Figure 2. Les cellules de l'épithélium colique. 20

Figure 3. Les voies de métabolismes du glutamate (A) et de l'arginine (B) dans les entérocytes et les colonocytes. 23

Figure 4. La voie de la biosynthèse de la cystéine à partir de la méthionine. 25

Figure 5. La distribution et la concentration du microbiote intestinal le long du tube digestif (A). L'arbre phylogénétique du microbiote chez l'homme et chez la souris (B). 29

Figure 6. Dendrogrammes des groupes *Clostridium* XIVa et IV. 31

Figure 7. Comparaison de l'activité métabolique du microbiote caecal (A et B), la concentration en AGCC dans le contenu caecal (C) et le contenu en énergie dans les fèces (D) de souris obèses ou non. 34

Figure 8. Caractéristiques de fermentation selon les segments du gros intestin. 37

Figure 9. Schéma des voies de métabolisme des protéines par les bactéries. 39

Figure 10. Acétylation des histones par le butyrate selon 2 mécanismes distincts. 44

Figure 11. Les cytokines impliquées dans les MICI. 54

Figure 12. La biosynthèse du glutathion. 56

Figure 13. Le cycle redox GSH/GSSG. 58

Figure 14. Processus de la cicatrisation de la muqueuse intestinale. 60

Figure 15. Reptation lamellipode des cellules épithéliales. 60

Figure 16. Schéma du métabolisme global des protéines dans l'intestin grêle et le gros intestin. 117

Figure 17. Méthionine et synthèse des polyamines. 121

Liste des tableaux

Tableau 1. Les 20 acides aminés classés selon Reeds et al. (2000) 13

Tableau 2. Fonctions des acides aminés dans l'intestin en condition physiologique (Reeds, 2000) 14

Tableau 3. Bactéries, leurs substrats et leurs produits dans le gros intestin (Salminen et al., 1998) ... 40

Tableau 4. Les AGCC, AGCB, acides organiques et leurs acides aminés précurseurs (Blachier et al., 2007; Davila et al., 2013; Macfarlane and Macfarlane, 2012) 40

Tableau 5. Les métabolites bactériens présumés délétères et leurs précurseurs. 46

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNr: acide désoxyribonucléique ribosomique

AGCC: acides gras à chaîne courte

AGCB: acides gras à chaîne branchée

AMPK : AMP-activated protein kinase

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

AMPc : 3',5'-adenosine monophosphate cyclique

bFGF : basic fibroblast growth factor

DSS : dextran sodium sulfate

EGF : epidermal growth factor

EMT : epithelial-mesenchymal transition

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

Fiaf : Fasting-induced adipocyte factor

GMPc : 3',5'-guanosine monophosphate cyclique

HAT : histone acétyltransférase

HDAC : histone déacétylase

IFNγ : interferon γ

IGF : insulin-like growth factor

iNOS : inducible nitric oxide synthase

IL: interleukine

IRGM: immunity-related GTPase family M protein

ITF: intestinal trefoil factor

KC: keratinocyte-derived chemokine

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LPL: lipoprotéine lipase

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MC : maladie de Crohn

MDP : muramyl dipeptide

MICI: maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MIP: macrophage inflammatory protein

NF-κB: nuclear factor-kappa B

NOX: NADPH oxidase

PDEF : platelet-derived growth factor

RCH: recto-colite hémorragique

TNF: tumor necrosis factor

TGF : transforming growth factor

TFF : Trefoil Peptides

Introduction bibliographique

1 Protéines dans l'alimentation

1.1 Protéine : macronutriment

Les protéines constituent, avec les glucides et les lipides, une des trois grandes familles de macronutriments. Les protéines sont constituées d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote et de soufre pour certains d'entre eux, sous formes de chaînes d'acides aminés, unités de base des protéines, qui sont reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Il existe 20 acides aminés qui peuvent être utilisés par l'organisme pour la synthèse des protéines, dont 9 sont indispensables (Tableau 1), c'est-à-dire que l'organisme n'est pas capable de les synthétiser ou en quantité insuffisante pour satisfaire ses besoins. Certains acides aminés sont conditionnellement indispensables en fonction des conditions pathologiques ou physiologiques spécifiques car leur taux de synthèse peut être limité par divers facteurs (Reeds et al., 2000; Reeds, 2000). Par exemple, l'arginine est un acide aminé indispensable chez les mammifères seulement en phase de développement précoce.

Tableau 1. Les 20 acides aminés classés selon Reeds et al. (2000)

Indispensables	Conditionnellement indispensables	Non indispensables
Lysine (Lys)	Cystéine (Cys)	Aspartate (Asp)
Phénylalanine (Phe)	Tyrosine (Tyr)	Asparagine (Asp)
Méthionine (Met)	Glycine (Gly)	Glutamate (Glu)
Histidine (His)	Arginine (Arg)	Alanine (Ala)
Valine (Val)	Glutamine (Gln)	Sérine (Ser)
Isoleucine (Ile)	Proline (Pro)	
Leucine (Leu)		
Thréonine (Thr)		
Tryptophane (Try)		

1.2 La consommation des protéines en France

La recommandation par l'Organisation Mondiale de la Santé en consommation de protéines est de 132 mg d'azote/kg/j, soit 0,83 g/kg/j de protéines (Rand et al., 2003). L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a établi l'apport nutritionnel conseillé (ANC) en protéines pour la population française à 0,83 g/kg/j chez les adultes en bonne santé. Cependant, la consommation en protéines actuelle française est bien supérieure puisqu'elle représente environ 1,5 à 2 fois la valeur de l'ANC.

La ration calorique journalière recommandée par l'ANSES est de 15 % en protéines (avec 50 % en glucides et 35 % en lipides). Selon les résultats de l'étude INCA2 (Etude individuelle Nationale sur les Consommations Alimentaires 2006-2007), l'apport en protéines chez les français adultes représente en moyenne 17% de l'apport énergétique (44% de glucides et 39% de lipides). Chez les femmes, cet apport énergétique représente 74 g de protéines par jour et chez les hommes, 100 g de protéines par jour. Pour un homme ayant un poids corporel de 80 kg, son ANC est de 66,4 g de protéines par jour. La consommation moyenne de 100g de protéines par jour est donc 1,5 fois plus élevée que l'ANC.

Les régimes hyperprotéiques sont aujourd'hui largement utilisés pour des finalités amaigrissantes non seulement chez les personnes en surpoids ou obèses (Indice de masse corporelle, IMC ≥ 25), mais aussi chez les gens ayant un IMC normal ou proche de la normale (18,5 < IMC < 24,9) et voulant perdre quelques kilos. Dans le cas d'un régime hyperprotéique, l'apport en protéines peut être doublé voire triplé par rapport à la valeur de l'ANC.

Aux 100 g de protéines ingérées par jour, s'ajoutent les protéines endogènes (sécrétions salivaire et gastro-intestinale), 6 – 18 g passent la jonction iléo-caecale et arrivent dans le gros intestin.

1.3 Les rôles des acides aminés au niveau de l'intestin

En plus de leur fonction de précurseur pour la synthèse protéique au niveau intestinal, plusieurs acides aminés sont des précurseurs pour la synthèse de composés impliqués dans les fonctions physiologique et métabolique de l'intestin (Tableau 2) :

Tableau 2. Fonctions des acides aminés dans l'intestin en condition physiologique (Reeds, 2000)

Fonctions	Produits	Précurseurs
Génération d'énergie	ATP	Glu, Asp, Gln
Prolifération	Acides nucléiques	Gln, Gly, Asp
Protection	Glutathion	Cys, Glu, Gly
	Oxyde nitrique	Arg
	Mucines	Thr, Cys, Ser, Pro

1.4 Dégradation et absorption des protéines

Les protéines exogènes et endogènes vont subir une série complexe de transformations réalisées par les protéases gastrique (pepsine) et pancréatique dans un premier temps. Les produits issus de cette dégradation sont essentiellement des peptides de grande taille, qui vont être ensuite dégradés par les peptidases présentes sur la membrane en bordure en brosse de l'épithélium intestinal en

oligopeptides dont les di-et tripeptides et en acides aminés avant d'être absorbés à travers les entérocytes absorbants. L'analyse du contenu luminal après l'ingestion des protéines chez l'homme montre que les acides aminés sont présents plutôt sous forme de peptides que sous forme libres. Les peptides représentent jusqu'à 80% des acides aminés totaux dans la lumière intestinale et sont composés majoritairement de 2 à 6 acides aminés.

Même si la dégradation des protéines est initiée au niveau de l'estomac, l'absorption des acides aminés, des dipeptides et tripeptides est réalisée essentiellement au niveau de l'intestin grêle par des systèmes de transports actifs ou passifs présents sur la membrane de la bordure en brosse des entérocytes. Il a été rapporté que les colonocytes auraient également la capacité d'absorber les acides aminés et les di-, tripeptides, mais à un niveau bien moindre que celui observé dans les entérocytes (Calonge et al., 1990; James and Smith, 1976; Robinson et al., 1973; Sepulveda and Smith, 1979). Cependant, il est généralement admis que les acides aminés ne sont pas absorbés dans le gros intestin sauf dans la période néonatale (Darragh et al., 1994).

Il est à souligner qu'une partie non négligeable de protéines et peptides (12 – 18 g) ayant échappé à la digestion et à l'absorption dans l'intestin grêle est transférée via la jonction iléo-caecale dans le gros intestin. S'y ajoutent des protéines endogènes (sécrétions pancréatiques, mucus, entérocytes desquamés etc.). Il a été rapporté que la perte d' azote alimentaire est de l'ordre de 10% (Bos et al., 2005).

Les protéines et peptides non digérés ou non totalement digérés sont transférés dans le gros intestin, et vont être métabolisés par les bactéries du microbiote intestinal. Cet aspect sera détaillé dans le chapitre 3.2.

Messages clé:

- ✓ Les protéines font partie des macronutriments et sont composées d'acides aminés indispensables ou non.
- ✓ La dégradation des protéines est initiée dans l'estomac et le site majeur d'absorption est l'intestin grêle.
- ✓ La consommation de protéines, par rapport aux apports nutritionnels conseillés, est très importante dans un régime de type occidental et encore plus en cas de régime hyperprotéique.
- ✓ Une partie des protéines et peptides, notamment lorsque la consommation de protéines est importante, peuvent échapper à la digestion et passer la jonction iléo-caecale vers le gros intestin, où elle sera fermentée par le microbiote intestinal (voire chapitre 3).

2 Physiologie du gros intestin

Les résidus alimentaires et les composés endogènes non absorbés et non digérés dans l'intestin grêle sont transférés dans le gros intestin par l'activité péristaltique intestinale via la jonction iléo-caecale. Le rôle physiologique principal du gros intestin est de transformer les contenus liquides ou semi-liquides de l'intestin grêle en résidus plus déshydratés en réabsorbant l'eau et les électrolytes. Pour assurer cette fonction, plusieurs types de cellules sont présents au niveau de l'épithélium du gros intestin.

2.1 Structure du gros intestin

2.1.1 Structure au plan longitudinal

Le gros intestin est la partie distale du tractus gastro-intestinal. Il commence à la fin de l'ileum et se termine à l'anus. Chez l'homme, le gros intestin comprend les segments suivants : le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde et le rectum. Le caecum est le premier segment du gros intestin qui fait suite à l'ileum. Sa taille est relativement petite chez l'homme, alors que certains animaux, comme le rat, la taille du caecum est plus importante.

2.1.2 Structure au plan transversal

Du point de vue microscopique, le gros intestin est un tube constitué de plusieurs tuniques (Figure 1A et B). Le centre de ce tube est la lumière intestinale où se trouvent le bol alimentaire et le microbiote. On trouve ensuite 5 tuniques formant la structure du gros intestin (DANIELS, 1979) :

La muqueuse

Elle est constituée de cryptes tubuleuses (glandes de Lieberkühn), droites et serrées qui comprend 2 types de cellules : des colonocytes et de nombreuses cellules caliciformes à mucus. Le tissu conjonctif de soutien remplissant les espaces entre les cryptes est le chorion (lamina propria), contient beaucoup de cellules, en particulier des cellules lymphatiques, et de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les nodules lymphatiques peuvent y être présents et s'étendent jusqu'à la sous-muqueuse.

La musculaire-muqueuse (muscularis mucosae)

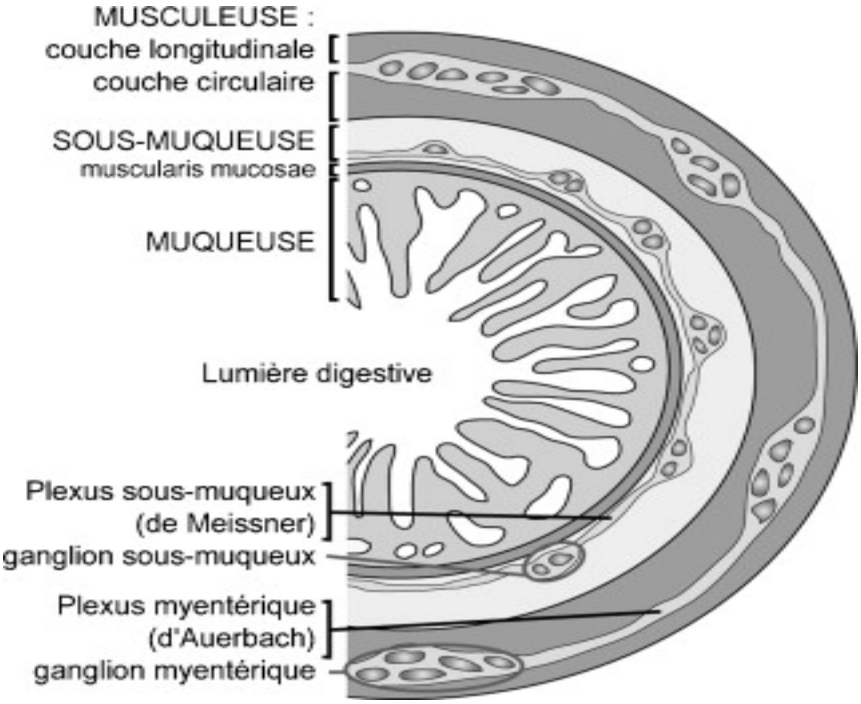
C'est une couche de tissu musculaire lisse où les parties inférieures des cryptes reposent directement sur cette couche. Elle est responsable des mouvements locaux et des replis de la muqueuse.

La sous-muqueuse

Elle est composée de tissus conjonctifs et soutient la muqueuse. Elle contient de gros vaisseaux sanguins, lymphatiques et des nerfs.

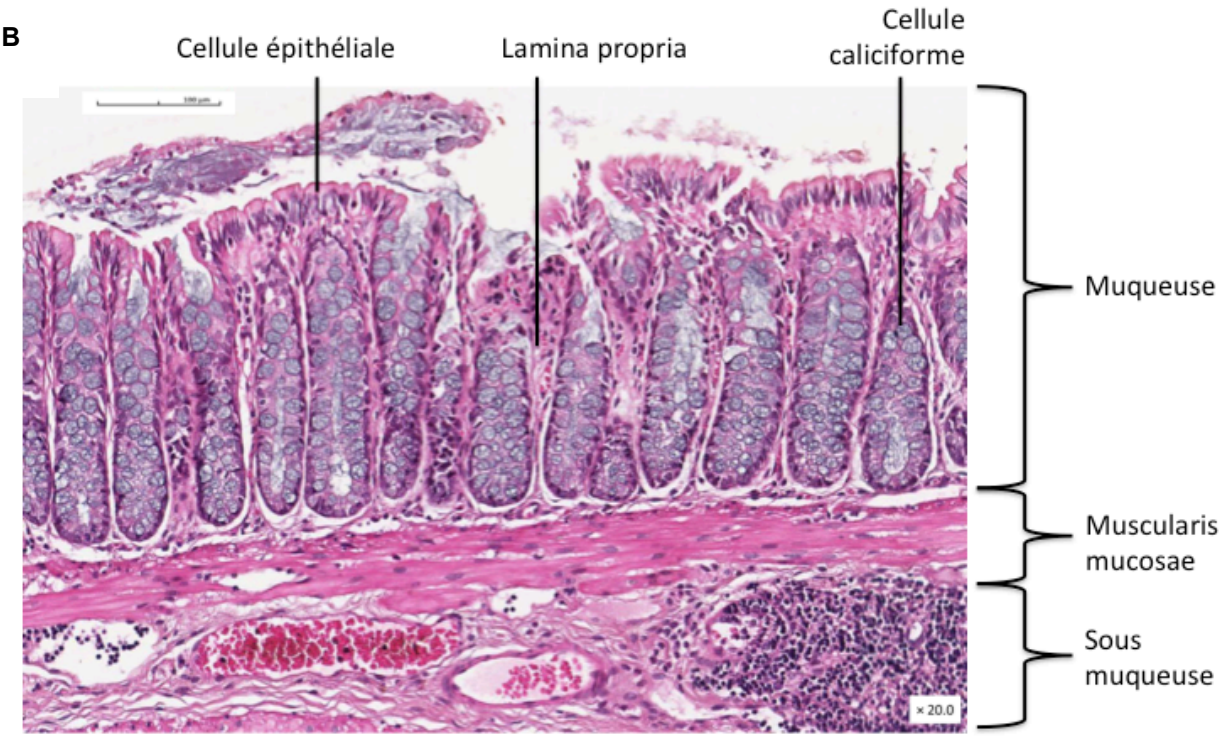
Figure 1. La structure histologique de la muqueuse colique.

A



Selon Paillusson, S., et al. Rev Med Interne 2012 ;33(6): 335-338.

B



La musculeuse (muscularis externa)

Elle est constituée de muscles lisses qui comprennent 2 couches musculaires, circulaire interne et longitudinale externe et assurer l'activité péristaltique du gros intestin.

La tunique externe (l'adventice ou la séreuse)

C'est un tissu conjonctif qui enveloppe le gros intestin et qui est le tissu de soutien des gros vaisseaux et des nerfs.

2.2 Epithélium colique

L'épithélium colique est un tissu en renouvellement constant et rapide (tous les 3 à 5 jours chez l'homme), Les cellules souches pluripotentes sont responsables du renouvellement de l'épithélium colique et sont localisées au fond des cryptes. Elles subissent des mitoses asymétriques. Une des deux cellules filles conserve ses propriétés de cellules souches alors que la deuxième migre le long de l'axe vers le sommet des cryptes puis vers l'épithélium de surface. C'est au cours de cette migration qu'elle acquiert ses caractéristiques structurales et fonctionnelles, et se différencient en 3 grands phénotypes cellulaires : les colonocytes absorbants, les cellules entéroendocrines et les cellules caliciformes à mucus (Figure 2A et B). Une fois leur différenciation achevée, les cellules meurent par apoptose et sont extrudées dans la lumière colique (Hall et al., 1994). Le processus de prolifération, différenciation et d'apoptose doivent être très finement régulée afin de maintenir les populations cellulaires et préserver l'homéostasie cellulaire cryptique.

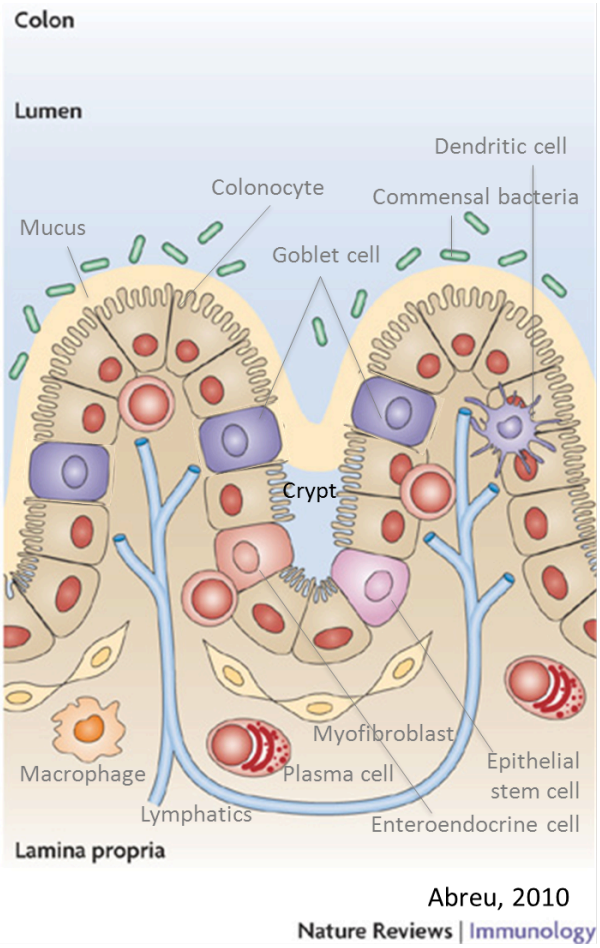
2.2.1 Colonocytes

Les colonocytes sont les cellules épithéliales coliques, issues de la lignée non sécrétoire des cellules souches, dont la fonction est de réabsorber l'eau, les électrolytes et d'autres composés, comme les vitamines liposolubles et les acides gras à chaîne courte dérivés des bactéries. Ils ont aussi un rôle important de barrière sélective de protection vis-à-vis de composés et de bactéries présents dans la lumière colique.

Les colonocytes constituent l'épithélium de surface en haut des cryptes. Ce sont des cellules différenciées et polarisées. La polarité se traduit par 2 domaines distincts de la membrane plasmique : apicale et basolatérale. Le domaine apical est celui qui est en contact avec la lumière colique et présente des microvillosités (plateau strié) du côté luminal. La surface apicale contient la plupart des protéines liées à la fonction spécifique de l'épithélium colique, c'est-à-dire la réabsorption d'eau, d'électrolytes et d'autres composés. Le domaine basolatéral contient des protéines liées au passage de composés du colonocytes vers le système capillaire veineux.

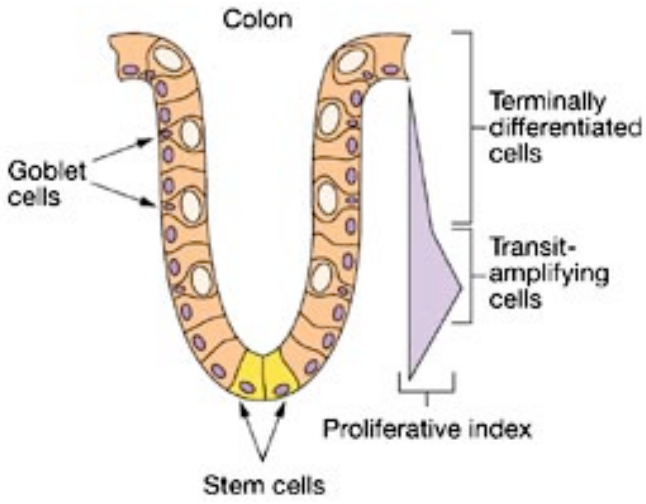
Figure 2. Les cellules de l'épithélium colique.

A



Selon Abreu, M.T. Nat Rev Immunol. 2010 Feb;10(2):131-44.

B



Selon McDonald, S.A. et al. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2006 May;3(5):267-74.

2.2.2 Cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines sont issues de la lignée sécrétoire des cellules souches et sont plus rares dans le colon (environ 1% des cellules épithéliales) que dans l'intestin grêle (May and Kaestner, 2010). Constituées d'une population hétérogène de types cellulaires, elles sont classées selon la composition de leur granules de sécrétion concentrés du côté basolatéral Il existe au moins 10 sous-types de cellules entéroendocrines dans l'épithélium intestinal (Rindi et al., 2004). Les lignées cellulaires prédominantes dans le gros intestin sont les cellules productrices de PYY, GLP-1, GLP-2 et neurotensin (PYY : PP-like peptide with N-terminal tyrosine amide ; PP : pancreatic polypeptide ; GLP : glucagon-like peptide) (Schonhoff et al., 2004). Les hormones sécrétées ont pour rôle principal de contrôler les fonctions physiologiques et homéostatiques, en particulier les sécrétions exocrines postprandiales et la motilité (Moran et al., 2008).

2.2.3 Cellules caliciformes à mucus

Les cellules caliciformes sont aussi issues de la lignée sécrétoire des cellules souches. Elles sont plus abondantes dans les cryptes que sur l'épithélium de surface. D'un point de vue plus global, elles sont d'autant plus nombreuses quand on se rapproche du rectum : 4% des cellules épithéliales au niveau du duodénum et 16% au niveau du côlon distal. Elles concentrent leurs granules de sécrétion du côté apical, leur permettant ainsi une libération continue de mucus (Kim and Ho, 2010). Cette couche de mucus protège l'épithélium colique du milieu extérieur et des agressions physico-chimiques, et facilite le passage du contenu luminal de plus en plus déshydraté.

Mucus

La couche de gel de mucus est un composant structural et intégral de l'intestin. Elle a un rôle de protection, de lubrification et de transport entre le contenu luminal et les cellules épithéliales intestinales. Cette couche de mucus est formée de 2 sous-couches distinctes: une intérieure attachée à la surface épithéliale apicale et une qui est considérée comme faiblement associée à la surface épithéliale (Deplancke and Gaskins, 2001). Les composantes majeures de la couche de mucus sont les mucines. Ce sont des glycoprotéines avec un squelette de protéines hautement polymérisées et des chaînes latérales d'oligosaccharides (Kim and Ho, 2010). Les mucines sécrétoires sont produites au niveau de la surface apicale des cellules caliciformes par 2 processus distincts : la sécrétion constitutive (faible sécrétion en continue dépendant du mouvement cytosquelettique des granules sécrétoires) ou la sécrétion stimulée/régulée, en réponse à des stimuli extérieurs, tels que les hormones/neuropeptides, les micro-organismes, les produits microbiens et les cytokines inflammatoires (Kim and Ho, 2010).

Mucines

Les mucines sont classées en 2 sous-types selon la composition de la chaîne oligosaccharidique: neutre ou acide. La chaîne d'oligosaccharides des mucines acides se termine par l'acide sialique ou des groupements sulfates, ce qui leur donne une nature anionique avec un pH neutre. Les mucines acides sont prédominantes dans le gros intestin. (Deplancke and Gaskins, 2001).

Actuellement, 20 gènes différents codant les mucines ont été identifiés chez l'homme, de *MUC1* à *MUC20*. Toutes les mucines ne sont pas présentes dans le gros intestin. En fonction de leurs caractéristiques structurales et physiologiques, les mucines peuvent être classées en 2 classes : sécrétoires ou membranaires. (Kim and Ho, 2010). Dans le gros intestin, *MUC2* est la mucine sécrétoire majeure synthétisée et sécrétée par les cellules caliciformes (Tytgat et al., 1994). Les mucines membranaires sont exprimées non seulement par les cellules caliciformes mais aussi par les colonocytes. La mucine membranaire *MUC3* est abondamment exprimée dans l'intestin grêle et a été détectée chez les colonocytes (Audie et al., 1993).

L'analyse structurale de la mucine sécrétoire majeure *MUC2* montre qu'elle possède des régions centrales répétées riches en proline, thréonine et sérine, nommées domaine PTS. Les mucines sécrétoires possèdent aussi des régions riches en cystéine du côté du C-Terminal, ce qui permet à ces mucines de former des réseaux de polymères complexes dont la texture ressemble à un gel. (Andrianifahanana et al., 2006)

Des facteurs bioactifs, incluant microorganismes, produits bactériens, hormones/neuropeptides et des facteurs de croissance ont été identifiés comme facteurs de régulation positive ou négative de la transcription de *MUC2* (Andrianifahanana et al., 2006; Thai et al., 2008). La cytokine pro-inflammatoire, TNF-α, régule son expression positivement via l'activation de NF-κB (Kim and Ho, 2010).

2.3 Métabolismes des acides aminés dans les colonocytes

Le métabolisme des acides aminés a été beaucoup plus étudié dans les entérocytes de l'intestin grêle que dans les colonocytes du gros intestin. Néanmoins il a été établi que le métabolisme des acides aminés n'est pas très différent dans les colonocytes par rapport aux entérocytes. La différence majeure entre les entre les deux phénotypes cellulaires est reliée au pôle d'entrée des acides aminés dans les cellules épithéliales intestinales. Ainsi, dans les colonocytes, les acides aminés sont apportés par la voie sanguine artérielle alors que dans le cas des entérocytes, les pôles d'entrée sont le pôle apical (lumière vers entérocyte) et le pôle basolatéral (sang vers entérocyte).

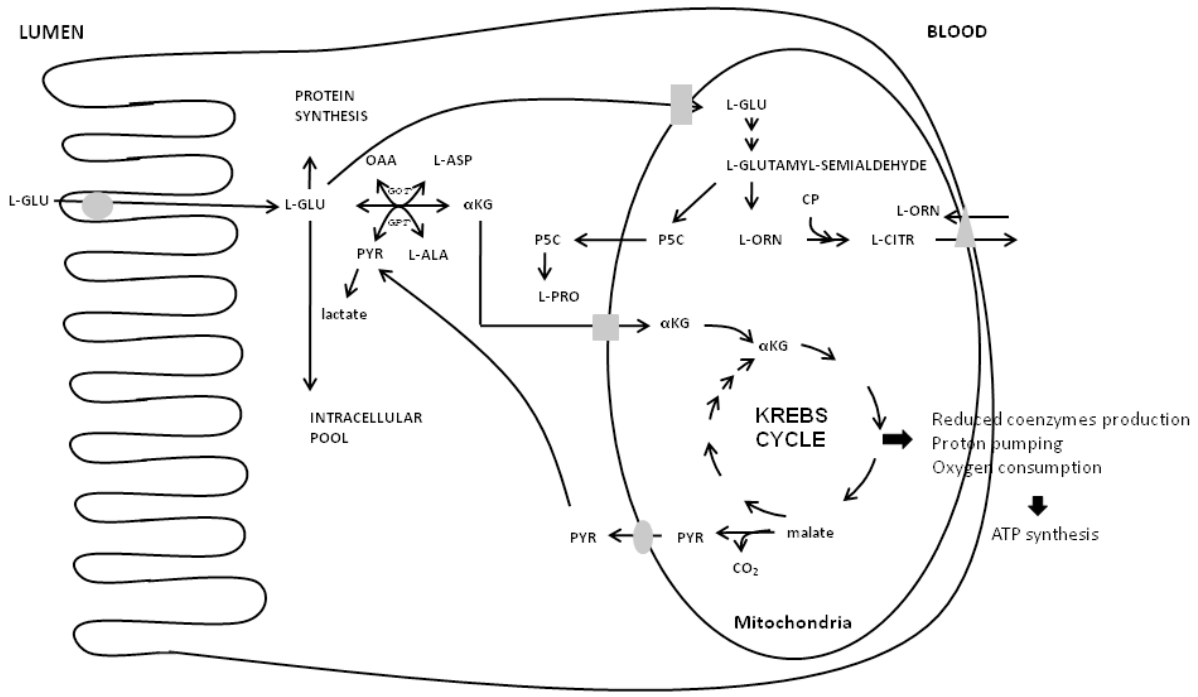
Glutamate et glutamine

Comme dans les entérocytes, le glutamate et la glutamine sont largement métabolisés dans les colonocytes. Le glutamate peut rentrer dans le pool intracellulaire des acides aminés libres, ou être utilisé par ces cellules soit comme précurseur pour la synthèse des protéines soit comme substrat oxydatif pour produire de l'énergie. En effet, bien que le tractus gastro-intestinal ne représente environ que 5% du poids corporel, il consomme 20% de l'oxygène du corps entier (Vaugelade et al., 1994). Au niveau du gros intestin, le besoin en énergie est attribué en partie au renouvellement rapide de l'épithélium qui s'accompagne d'une intense activité anabolique.

Le métabolisme du glutamate dans les entérocytes et les colonocytes est similaire (Figure 3A). Tout d'abord, le glutamate est transaminé soit en présence d'oxaloacétate, soit en présence de pyruvate et

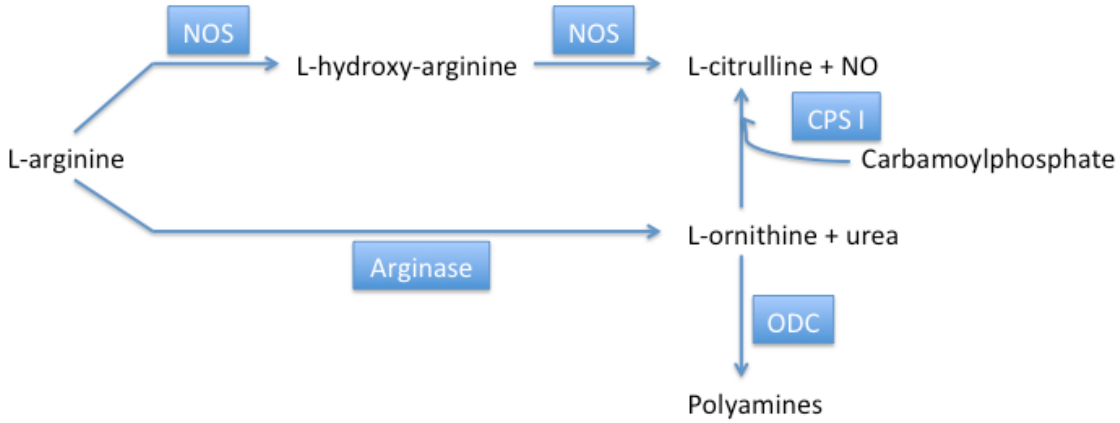
Figure 3. Les voies de métabolismes du glutamate (A) et de l'arginine (B) dans les entérocytes et les colonocytes.

A



Riby et al. Ped. Res. 1990., Wu and Morris Biochem. J. 1998, Henslee and Jones Arch. Biochem. Biophys. 1982

B



NOS : nitric oxyde synthase ; CPS I : carbamoylphosphate synthase isoform I ; ODC : ornithine decarboxylase.

Selon Blachier, F., et al. (1991). Biochem Biophys Res Commun 177: 1171-1177; Johnson, L. R. et S. A. McCormack 1999. News Physiol Sci 14: 12-17.

conduit à la synthèse d'aspartate et d'alanine. La voie de transamination est la voie principale puisque ces cellules possèdent peu de capacité à convertir le glutamate en alpha-cétoglutarate et ammoniaque par l'enzyme glutamate déhydrogénase (Madej et al., 2002). L'alpha-cétoglutarate est ensuite oxydée dans la mitochondrie dans le cycle de Krebs. Les coenzymes réduits seront ensuite oxydés dans la chaîne respiratoire mitochondriale située dans la membrane interne. Les électrons issus de cette oxydation sont transportés à travers 4 complexes protéiques successifs jusqu'à l'oxygène moléculaire qui va être réduit en eau. L'énergie libérée lors du transfert des électrons est utilisée pour pomper les protons vers l'espace intermembranaire. La différence de charge et la différence de pH entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire génère alors un potentiel électrochimique qui est à l'origine de la force protonmotrice utilisée pour le retour des protons dans la matrice mitochondriale et la synthèse d'ATP à partir de l'ADP. La glutamine est métabolisée par les colonocytes de façon similaire que le glutamate, mise à part qu'elle doit être au préalable dégradée en glutamate (et ammoniaque) dans la mitochondrie par la glutaminase.

Comme décrit précédemment, le glutamate et la glutamine sont fournis aux colonocytes par la voie sanguine puisqu'il est généralement admis que, excepté pendant la période néonatale, le gros intestin est incapable d'absorber de manière significative les acides aminés de la lumière vers le sang.

Arginine

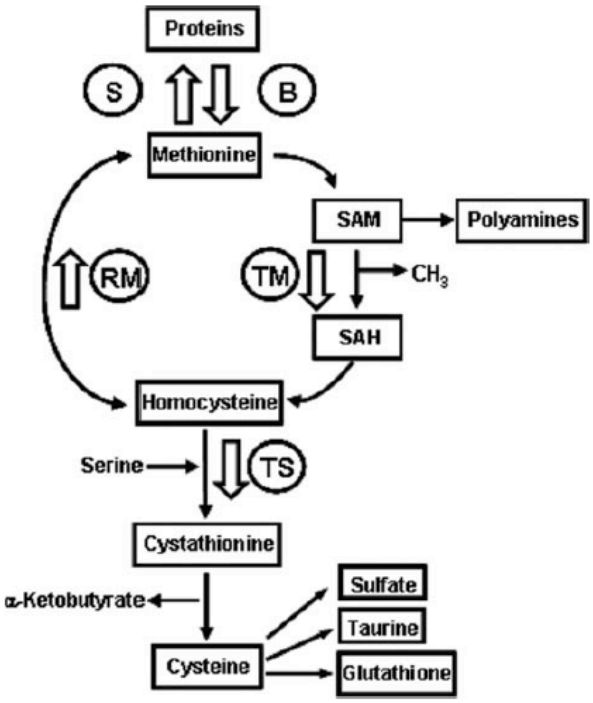
Dans les entérocytes, l'arginine est dégradée selon 2 voies différentes (Figure 3B) : soit par l'enzyme nitric oxide synthase (NOS) en citrulline et NO ; soit par l'arginase en ornithine et urée (Blachier et al., 1993; M'Rabet-Touil et al., 1993). L'ornithine produite peut ensuite à son tour être dégradée en polyamines avec l'activité de l'enzyme ornithine décarboxylase (ODC) (Johnson and McCormack, 1999), ou réagir avec le carbamoylphosphate pour synthétiser la citrulline catalysée par la carbamoylphosphate synthase isoform I (CPS I). Cependant, la quantité de citrulline produite via la voie de la NOS est moins élevée que celle via la voie de l'arginase/CPS I (Blachier et al., 1991).

L'arginine dans les entérocytes est soit d'origine luminale soit d'origine sanguine, alors que dans les colonocytes, cet apport est quasi-exclusivement d'origine sanguine. Le métabolisme de l'arginine dans les colonocytes a été peu étudié. Il a été rapporté que l'activité de l'arginase est similaire dans les colonocytes et les entérocytes chez le porc (M'Rabet-Touil et al., 1993). Dans les colonocytes, la NOS est exprimée et est catalytiquement active. Dans la muqueuse colique humaine, l'activité de la NOS est essentiellement du type inductible, et cette activité est augmentée de manière très importante en cas de rectocolite hémorragique et de maladie de Crohn (Guihot et al., 2000; Kimura et al., 1998; Middleton et al., 1993; Rachmilewitz et al., 1995)

Méthionine et cystéine

La méthionine et la cystéine sont des acides aminés soufrés. La cystéine peut être synthétisée à partir de la méthionine par les voies de la transméthylation et de la transulfuration (Figure 4). Les tissus gastro-intestinaux possèdent des enzymes nécessaires pour la conversion de la méthionine en cystéine (Shoveller et al., 2005). Une étude *in vitro* sur des cellules Caco-2 (des cellules épithéliales coliques humaines originaires d'un adenocarcinome colique) a montré une production considérable de

Figure 4. La voie de la biosynthèse de la cystéine à partir de la méthionine.



S : protein synthesis ; B : breakdown ; TM : transmethylation ; TS : transsulfuration ; RM : remethylation ; SAM : S-adenosylmethionine ; SAH : S-adenosyl-L-homocysteine.

Selon Shoveller, A. K., et al. J Nutr 2005,135(7): 1609-1612.

cystathionine et de cystéine par ces cellules (Townsend et al., 2004). La cystéine est un des trois acides aminés (avec le glutamate et la glycine) utilisé pour la synthèse du glutathion dans les entérocytes.

Les bilans porto-artériels suggèrent un métabolisme intestinal important de la méthionine (48% de l'apport alimentaire) chez les porcelets (Stoll et al., 1999). Il a été rapporté que chez les porcelets nouveau-nés, la déficience en acides aminés soufrés induit une atrophie de l'intestin grêle avec moins de cellules caliciformes à mucus, de cellules en prolifération et de glutathion dans le tissu (Bauchart-Thevret et al., 2009). Cependant, la méthionine est moins catabolisée par les entérocytes chez les adultes.

Thréonine

La capacité de métaboliser la thréonine chez les entérocytes est quasi absente. Cependant, les mucines intestinales sont très riches en thréonine, serine et proline suggérant une large utilisation de la thréonine par les cellules en gobelets productrices de mucus. Dans un modèle de mini-porcs avec iléite, l'inflammation intestinale augmente la synthèse de mucines intestinales (Remond et al., 2009). Une étude utilisant un régime déficient en thréonine de façon modérée a montré qu'un tel régime réduisait la teneur en thréonine des protéines dans le côlon, mais pas dans l'intestin grêle ; indiquant que ce dernier est moins sensible à une déficience modérée en thréonine que le côlon. Une autre étude a montré que la déficience modérée en thréonine est responsable de l'altération de la fonctionnalité et de l'intégrité intestinale, plus précisément en terme de la perméabilité paracellulaire (Hamard et al., 2010). Dans le modèle du porcelet, le pourcentage de thréonine alimentaire utilisé par les organes drainés par la veine porte est estimé à environ 85% (Schaart et al., 2005). Comme attendu, la thréonine alimentaire est préférentiellement utilisée par rapport à la thréonine systémique pour la synthèse protéique intestinale chez le porcelet.

Acides aminés branchés

Les entérocytes de porcs ont la capacité de cataboliser les acides aminés branchés (leucine, isoleucine et valine) (Chen et al., 2009), alors que leur métabolisme dans les colonocytes restent à déterminer. Dans le modèle du porcelet, il a été estimé que 32% de la leucine alimentaire est utilisé par les organes drainés par la veine porte avec 21% de cette extraction utilisé pour la synthèse des protéines de la muqueuse intestinale (Stoll et al., 1998).

Messages clé:

- ✓ Le gros intestin comprend les segments suivants : caecum, côlon et rectum.
- ✓ La structure du gros intestin présente plusieurs tuniques, dont la muqueuse avec la structure épithéliale (recouverte d'une couche de mucus) en contact direct avec le milieu extérieur (lumière intestinale).
- ✓ Dans la muqueuse, les cellules épithéliales coliques absorbantes (colonocytes) et les cellules caliciformes à mucus jouent des rôles métaboliques et physiologiques importants.
- ✓ La couche de mucus sur l'épithélium colique est composée essentiellement des mucines avec 20 gènes correspondants identifiés à ce jour.
- ✓ De grandes quantités de mucine sécrétoire *MUC2* sont retrouvées dans les cellules caliciformes du gros intestin.
- ✓ Les colonocytes sont capables de métaboliser les acides aminés, principalement d'origine sanguine.

3 Microbiote intestinal

La fermentation et la digestion de certains composés par le microbiote ont lieu principalement dans le gros intestin grâce à des conditions favorables au développement de la flore anaérobie stricte et le temps de transit ralenti.

3.1 Composition et rôles du microbiote

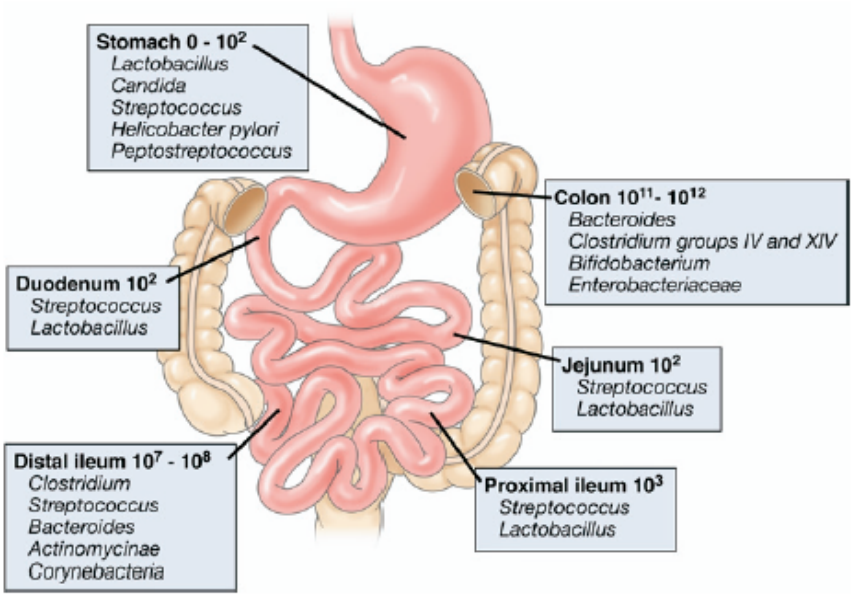
Entre 10^{13} - 10^{14} microorganismes résident de façon permanente dans l'intestin de l'homme adulte (Backhed et al., 2005). Ils sont 10 fois plus nombreux que les cellules du corps humain (Savage, 1977) et représentent une grande proportion de la masse fécale, c'est-à-dire environ 55% de la masse solide (Stephen and Cummings, 1980). La distribution, la complexité et la concentration de ce grand nombre de microorganismes sont différentes en fonction des régions du tube digestif. La population microbienne augmente de 10^{2-3} microorganismes/g de contenu dans l'estomac (aérobies et aérotolérants) à rapidement 10^{11-12}/g de contenu dans le caecum et le côlon (bactéries essentiellement anaérobies) (Figure 5A).

Les analyses moléculaires phylogénétiques sur les séquences d'ADNr et d'ARNr 16S ont montré que la plupart des bactéries du microbiote intestinal chez l'homme (Arumugam et al., 2011; Eckburg et al., 2005) appartiennent à deux phyla : *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (Figure 5B). Ceci est également vrai chez la souris (Ley et al., 2005). Grâce aux technologies moléculaires à haut débit, des espèces bactériennes non-cultivables ont pu être analysées à haute résolution et sur de nombreux individus. Ainsi, ont été identifiés plus de 1000 phylotypes ou niveau de « l'espèce » : un ensemble de séquences qui ont autant de diversité dans les séquences de la petite sous-unité d'ARN ribosomique que dans les espèces connues (Claesson et al., 2009).

A la naissance, le tube digestif du nouveau-né est stérile et la colonisation commence dès l'accouchement par une série d'évènements successifs (Favier et al., 2002). A l'âge de 2 à 4 ans, la composition du microbiote est déjà quasi identique à celle de l'adulte. Le microbiote reste stable à l'âge adulte pour un individu sain donné sur un plan général. Cependant, les analyses avec des techniques « culture-indépendante » ont montré qu'il existe des spécificités individuelles qui varient avec le temps et à travers des populations quand on analyse à haute résolution (Lozupone et al., 2012; Yatsunenko et al., 2012; Zoetendal et al., 1998). Une étude de Turnbaugh et ses collègues (2009) sur le microbiome intestinal de jumelles obèses et maigres a montré que la communauté microbienne varie au niveau des lignées bactériennes avec une co-variation à un degré comparable entre les paires de jumelles (monozygotes et hétérozygotes). Les auteurs ont conclu également qu'il existe des ensembles de gènes microbiens largement partagés entre les individus échantillonnés (« core microbiome ») au niveau fonctionnel. En plus de la période infantile où la structure du microbiote se met en place progressivement, le stade de vieillissement est une période de vie où la composition du microbiote est également en mouvement. Il a été rapporté que le ratio

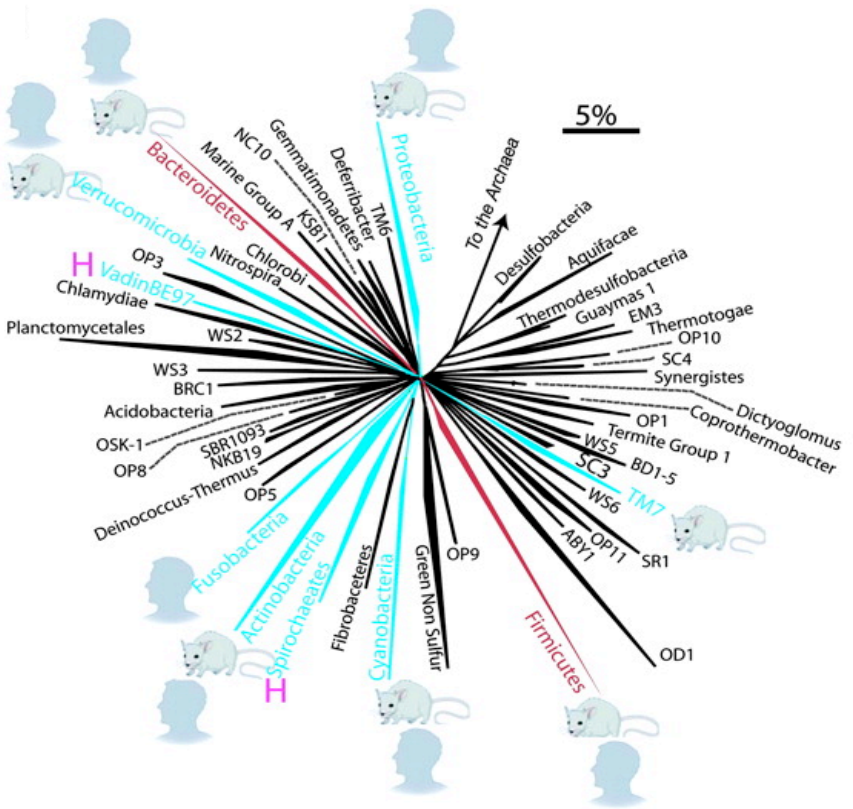
Figure 5. La distribution et la concentration du microbiote intestinal le long du tube digestif (A). L'arbre phylogénétique du microbiote chez l'homme et chez la souris (B).

A



Selon Sartor RB Gastroenterology 2008;134:577-597

B



Selon Ley RE et al. PNAS 2005;102:11070-11075

Firmicutes/Bacteroidetes change selon le stade de vie. Ainsi, ce ratio est de 0,4 chez les enfants (âgés de 3 semaines à 10 mois), 10,9 chez l'adulte et 0,6 chez les personnes âgées (de 70 à 90 ans) (Mariat et al., 2009).

3.1.1 Grands groupes bactériens – phylotypes et entérotypes

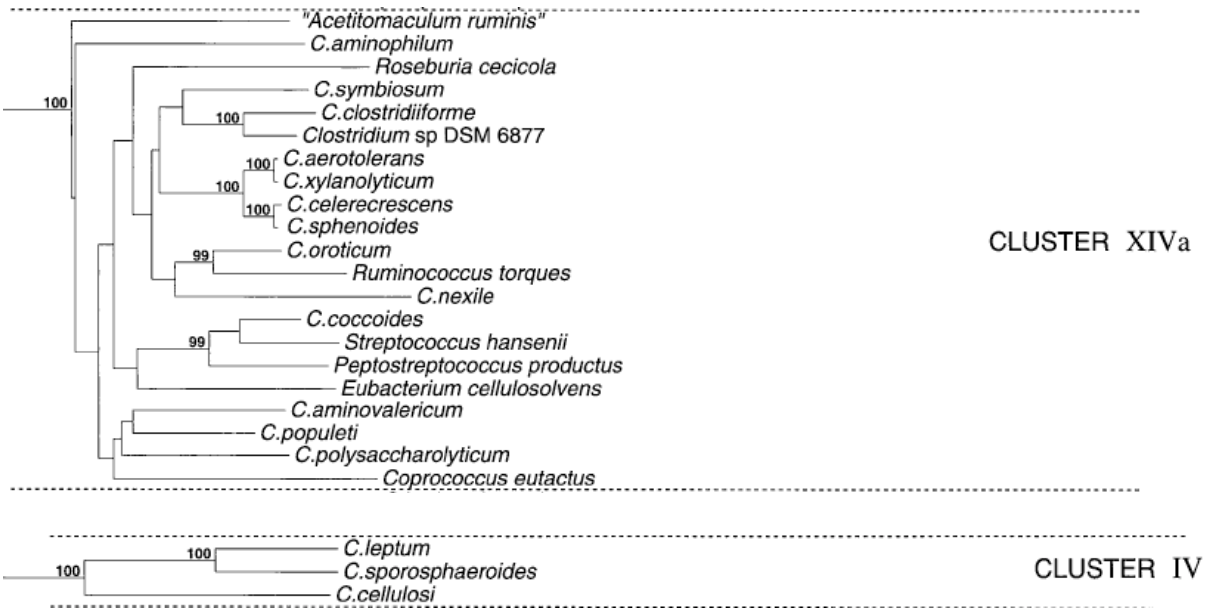
Selon les résultats d'analyse de la composition phylogénétique bactérienne dans les fèces de 39 échantillons de 6 nationalités, seulement 3 phyla regroupent 75% de l'abondance du microbiote (Arumugam et al., 2011). Ce sont dans l'ordre : *Firmicutes* (38,8% ± 11,3%), *Bacteroidetes* (27,8% ± 16,6%) et *Actinobacteria* (8,2% ± 6,8%). Le phylum dominant, *Firmicutes*, est composé essentiellement des groupes *Clostridium* XIV et IV. 95% des *Firmicutes* sont membres de la classe *Clostridia* et un nombre important de *Firmicutes* sont des bactéries productrices de butyrate, qui sont membres des clusters clostridiaux IV, XIVa et XVI (Eckburg et al., 2005). *Faecalibacterium* est le genre le plus représenté de ce phylum. Le 2ème phylum le plus important mais aussi le plus variable, *Bacteroidestes,* inclut le genre le plus abondant, *Bacteroides*. *Actinobacteria* est le 3ème plus grand phylum, mais y figurent des genres importants comme *Bifidobacterium* (Arumugam et al., 2011).

Le cluster *Clostridium* XIVa est aussi appelé le groupe *Clostridium coccoides* (Figure 6) qui inclut des espèces des genres comme *Clostridium*, *Coprococcus*, *Butyrivibrio*, *Dorea*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Eubacterium* et *Ruminococcus* (Barmeyer et al., 2013; Collins et al., 1994; Eaton et al., 2010). En se basant sur les analyses phylogénétiques, les groupes *Clostridium Coccoides*, *Clostridium leptum* et *Bacteroides* sont les groupes prédominants des microbiotes fécal et colique (Beltran et al., 2008; Cummings et al., 1989; Hoogerwerf et al., 1996; Matsuki et al., 2004).

Le cluster *Clostridium* IV (Figure 6) est appelé également le groupe *Clostridium leptum* qui inclut *Faecalibacterium prausnitzii* et certaines espèces du *Eubacterium* et *Ruminococcus* (Ritzhaupt et al., 1998a). *F. prausnitzii* est le membre le plus abondant de ce groupe (Cummings et al., 1989; Ritzhaupt et al., 1998a). L'intérêt qui lui est porté actuellement tient aussi à sa possible implication dans l'inflammation du tractus gastrointestinal. Il a été trouvé que l'abondance du le groupe *C. leptum* était beaucoup réduite chez les patients souffrant de la maladie de Crohn (Manichanh et al., 2006; McNeil et al., 1979) et que *F. prausnitzii* était particulièrement touché (Gupta et al., 2006). Sokol et al. (2008) ont par la suite montré l'effet anti-inflammatoire du *F. prausnitzii* sur des modèles cellulaires et animaux. Ces effets anti-inflammatoires sont dus en partie aux effets des métabolites sécrétés qui bloquent l'activation de NF-κB et la production d'IL-8 (Sokol et al., 2008).

Certaines espèces de ces 2 groupes *C. coccoides* et *C. leptum* sont des bactéries productrices de butyrate. 80% des bactéries productrices de butyrate sont membres du groupe *C. coccoides* (Barcenilla et al., 2000).

Figure 6. Dendrogrammes des groupes *Clostridium* XIVa et IV.



Selon Collins MD et al. Int J Syst Bacteriol 44(4): 812-826.

En plus de la classification phylogénétique, les avancées dans la technologie de séquençage et d'analyses métagénomiques ont ouvert d'autres voies pour analyser les 10^{13-14} microorganismes. L'étude très récente en cette matière (Arumugam et al., 2011) a proposé de classer le microbiome humain en 3 entérotypes ayant chacun un genre représentatif : *Bacteroides* (entérotype 1), *Prevotella* (entérotype 2) et *Ruminococcus* (entérotype 3). Les mêmes auteurs ont poursuivi cette première étude (39 sujets) par l'analyse de 663 autres sujets danois ou espagnols. Ces résultats, qui ont été communiqués en 2012 par un article dans Nature News, semblent indiquer que la séparation entre les entérotypes 1 et 3 n'est plus si claire, parce que le genre *Methanobrevibacter* des Archées qui était compris dans l'entérotype 1 a été nouvellement classé comme micro-organisme définissant l'entérotype 3. Cependant, l'entérotype 2 reste toujours bien distinct des 2 autres (Yong, 2012).

3.1.2 Rôles du microbiote colique

Plusieurs centaines de grammes de bactéries vivent dans la lumière colique et sont en constante interaction avec l'hôte. Des données scientifiques récentes montrent de plus en plus leur implication importante dans l'homéostasie de l'hôte. Tout d'abord, le microbiote colique joue un rôle important dans la physiologie digestive. Un ensemble de gènes et de fonctionnalités du microbiote est largement partagé entre les individus (Qin et al., 2010). La principale activité métabolique du microbiote est liée à la digestion des glucides et des protéines. Le microbiote colique joue donc un rôle majeur dans la digestion et se situe en aval du processus digestif. Ces activités métaboliques aboutissent à la récupération d'énergie à partir des aliments non digestibles et des nutriments absorbables. Outre ces activités métaboliques, le microbiote exerce des effets trophiques sur l'épithélium intestinal, sur la structure et la fonction immunitaire lié à l'intestin, ainsi que des effets protecteurs contre la colonisation des pathogènes (Stephen and Cummings, 1980).

Le microbiote semble jouer aussi un rôle essentiel dans divers troubles pathologiques. Des études datant du milieu des années 2000 soulignent l'importance du microbiote dans le gain de poids et l'obésité. En effet, la colonisation de souris axéniques par un microbiote normal issu d'une souris conventionnelle implique une augmentation de 60% de la masse adipeuse en 2 semaines malgré une prise alimentaire réduite (Backhed et al., 2004). Dans cette étude et dans une étude ultérieure (Backhed et al., 2007), les auteurs ont suggéré que le microbiote intestinal peut agir comme un facteur qui influence non seulement la récupération d'énergie alimentaire, mais aussi les gènes de l'hôte régulant la production, le stockage et l'utilisation de l'énergie:

i) la colonisation microbienne intestinale augmente la dégradation des polysaccharides via l'action des enzymes microbiennes (glycosylhydrolases) et la production des acides gras à chaîne courte (AGCC). Une fois absorbés, ces derniers sont transportés dans le foie et induisent la lipogenèse hépatique *de novo* à travers leur conversion en triglycérides.
ii) le microbiote intestinal réprime l'expression du facteur Fiaf qui est un inhibiteur de l'enzyme lipoprotéine lipase (LPL). L'augmentation de l'activité de LPL conduit à une accumulation des triglycérides dans les adipocytes.

iii) la colonisation microbienne intestinale diminue l'oxydation des acides gras par les muscles squelettiques via une voie métabolique qui implique la phosphorylation de l'AMPK.

Globalement, le microbiote intestinal agirait sur différentes voies d'action qui affectent la prédisposition de l'hôte vers un stockage de l'énergie et l'obésité.

Parallèlement, il a été montré que le « microbiote des animaux obèses » a une capacité plus importante à récupérer de l'énergie à partir des aliments ingérés et que la colonisation des souris axéniques par le « microbiote des obèses » induit un gain en masse adipeuse plus élevé que la colonisation par le « microbiote des maigres » (Turnbaugh et al., 2006). En effet, la comparaison du microbiome caecal entre les souris obèses et les souris ayant un poids normal (Figure 7A et B) a révélé que le « microbiote des obèses » a plus d'activités métaboliques sur les étapes initiales de la dégradation des polysaccharides alimentaires, i.e. les voies de métabolisme KEGG d'amidons et de saccharose, de galactose et de butanoate. La concentration des produits finaux de la dégradation des polysaccharides, butyrate et acétate, est plus élevée dans le contenu caecal des souris obèses (Figure 7C). Les auteurs ont trouvé que cette observation est en accord avec la proportion relative élevée des *Firmicutes* par rapport aux *Bacteroidetes* chez les obèses, puisque beaucoup de *Firmicutes* sont productrices de butyrate (Ley et al., 2006). De plus, les auteurs ont observé moins d'énergie restante dans les fèces de ces souris obèses (Figure 7D).

Cependant, le rôle du microbiote dans l'obésité est controversé par des études plus récentes. Duncan et al. (2008) ont mis en évidence une réduction des *Firmicutes* après qu'ils aient suivi un régime amaigrissant chez les obèses mais pas de variation des *Bacteroidetes*. Une autre étude (Schwiertz et al., 2010) a rapporté que la proportion des *Firmicutes* diminue alors que celle des *Bacteroidetes* augmente chez les personnes en surpoids et les obèses par rapport aux personnes ayant un poids normal.

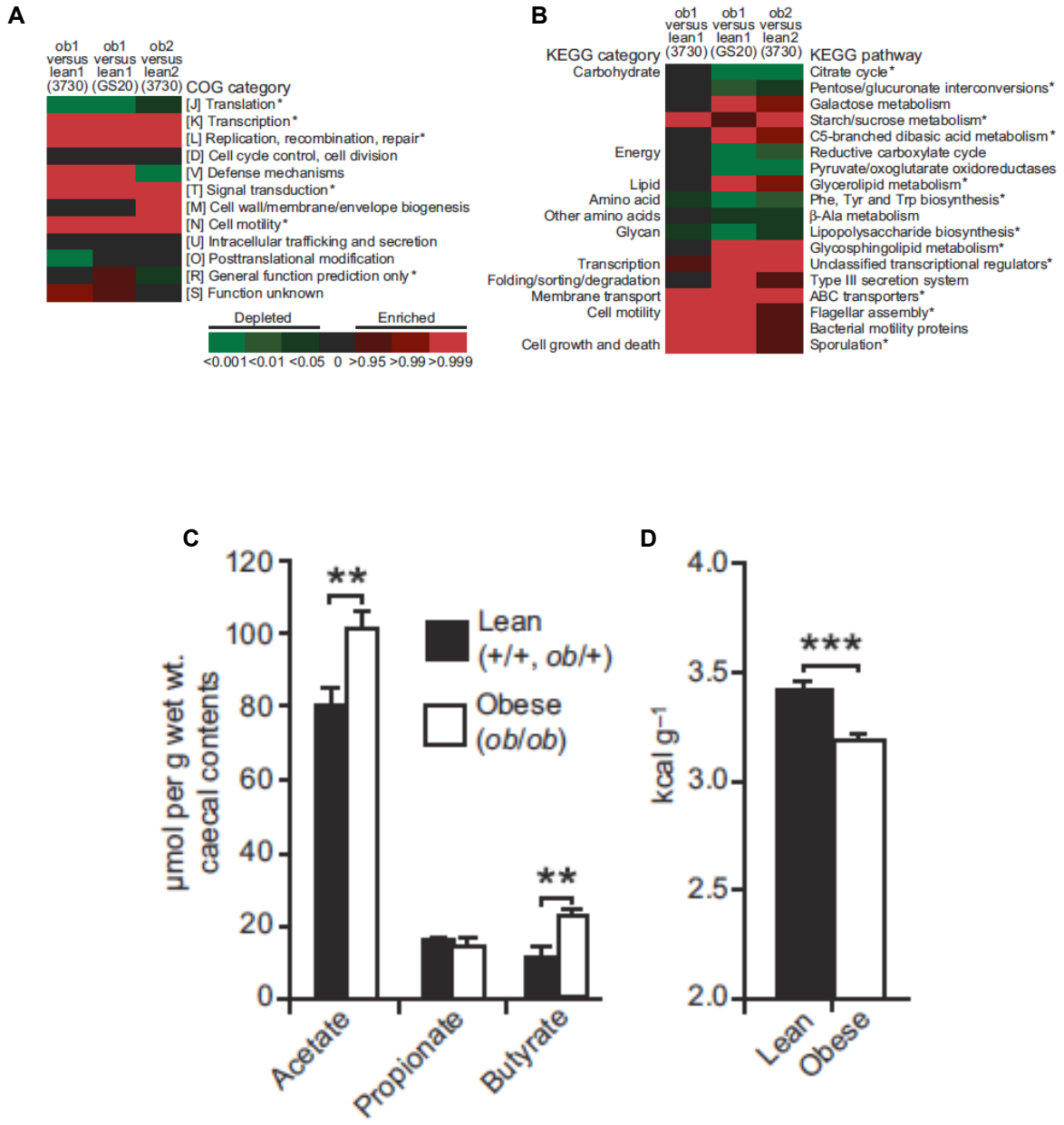
Le rôle du microbiote dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin semble aussi être important (Dicksved et al., 2008; Frank et al., 2007) (cf. chapitre 4.3), ainsi que dans certains troubles neuropsychiatriques (Gonzalez et al., 2011) et certains cancers notamment le cancer colorectal (Arthur et al., 2012; de Martel et al., 2012; de Martel et al., 2013; Moore and Moore, 1995; Ou et al., 2013; Sobhani et al., 2011).

3.1.3 Biodiversité - profils de diversité de Rényi

La compréhension des facteurs qui déterminent la stabilité des communautés est un point crucial en écologie d'une façon générale et en particulier en écologie microbienne du tube digestif.

La maturité d'une communauté se reflète dans sa biodiversité et sa productivité (Ronald and Richard, 1992). Les écosystèmes matures sont complexes et la présence d'un grand nombre d'espèces (grande diversité) permet de nombreuses relations inter-espèces. Une communauté qui possède une structure complexe et riche en informations, comme reflétée par sa grande richesse en espèces (nombre d'espèces différentes), a besoin de moins d'énergie pour maintenir sa structure. Ce besoin

Figure 7. Comparaison de l'activité métabolique du microbiote caecal (A et B), la concentration en AGCC dans le contenu caecal (C) et le contenu en énergie dans les fèces (D) de souris obèses ou non.



Selon Turnbaugh PJ, Nature. 2006 Dec 21;444(7122):1027-31.

moindre d'énergie se reflète dans le plus bas taux de production primaire par chaque unité de biomasse, alors que la stabilité du niveau de biodiversité est maintenue. Il y a donc une relation inverse entre la diversité et la productivité.

Le très grand nombre de micro-organismes résidant dans le tractus intestinal forme une communauté microbienne gigantesque et très complexe. Comme pour d'autres communautés écologiques, on peut décrire la biodiversité de la communauté microbienne par différents indices. Les 2 composants les plus importants dans la biodiversité sont la richesse, ou la variété, et l'équitabilité ou l'évènement. La richesse est le nombre d'espèces identifiées et l'équitabilité est l'égalité dans le nombre d'individus pour chaque espèce, indiquant ainsi la présence ou non des populations dominantes.

Le profil de diversité de Rényi est une des techniques de classement de la biodiversité. Ce sont des courbes qui fournissent l'information sur, à la fois, la richesse et l'équitabilité (Tothmeresz, 1995). Les profils de diversité de Rényi permettent de comparer tous ces paramètres entre plusieurs échantillons mais ils permettent aussi d'obtenir une comparaison globale. Si une courbe est complètement au-dessus d'une autre, cela indique une diversité plus élevée. L'indice de diversité de Rényi est calculé selon la formule ci-dessous :

$$H\alpha = \frac{\ln(\sum_{i=1}^{S} P_i^{\alpha})}{1-\alpha}$$

où S est le nombre d'espèces dans un même échantillon et P_i est la proportion de chaque espèce. Chaque valeur du profile de Rényi est basée sur le paramètre « alpha » qui varie de zéro à infini. La valeur de l'indice pour alpha=0 donne une information sur la richesse et pour alpha tendant vers l'infini, la valeur du profil de Rényi indique la proportion de l'espèce la plus abondante. Quand alpha=1, la valeur du profil de Rényi est égale à l'indice de diversité de Shannon. Quand alpha=2, la valeur du profil de Rényi est égale au logarithme de l'inverse de l'indice de diversité de Simpson.

3.1.4 Alimentation et composition du microbiote

Des facteurs comme l'âge, la génétique, l'environnement, l'alimentation ou l'état pathologique peuvent influencer la composition du microbiote (Gill et al., 2006; Lozupone et al., 2012). Les études sur des jumeaux et des pairs mères-filles montrent l'influence du facteur génétique sur la composition du microbiote, par le fait que les paires de jumeaux ou les paires mères-filles ont des microbiotes plus similaires que les individus non liés (Dicksved et al., 2008; Turnbaugh et al., 2009). Les mécanismes par lesquels les facteurs comme l'alimentation ou l'environnement modulent le microbiote ne sont pas encore établis. Le fait que les paires de jumeaux monozygotes et les paires hétérozygotes ont également des microbiotes similaires indique qu'à part le facteur génétique, d'autres facteurs peuvent conduire à des similarités familiales dans la composition du microbiote (Turnbaugh et al., 2009 ; Yatsunenko et al., 2012).

Il a été rapporté que le microbiote est distinct pour des populations différentes. Un exemple est que les enfants italiens ont un microbiote différent de ceux de l'Afrique rural (De Filippo et al., 2010). Un autre exemple est que le microbiote des enfants ou adultes américains est bien différent du celui des populations amérindiennes ou malawiennes (Yatsunenko et al., 2012). Dans ces 2 études, les auteurs ont conclu au rôle primordial de l'alimentation dans la différence de composition du microbiote. En effet, que ce soit la population rurale de l'Afrique, ou la population amérindienne ou du Malawi, un des points communs de ces populations est qu'ils ont une alimentation basée sur des céréales, légumineuses et légumes, donc riche en glucides et fibres, pauvre en protéines animales. Et l'alimentation typique de l'Europe ou de l'Amérique du Nord est riche en protéines. Le microbiote de ces derniers présente moins de biodiversité. De plus, la composition du microbiote est changée au niveau des phyla. Les phyla *Bacteroidetes* et *Actinobacteria* sont plus abondants dans le microbiote des enfants de l'Afrique rurale, avec une déplétion des phyla *Firmicutes* et *Proteobacteria*, ce qui est le cas inverse chez le microbiote des enfants européens. Ainsi, le ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes* augmente chez ces derniers. L'existence d'une communauté bactérienne et d'un microbiome liés au métabolisme des glucides a été également prouvée.

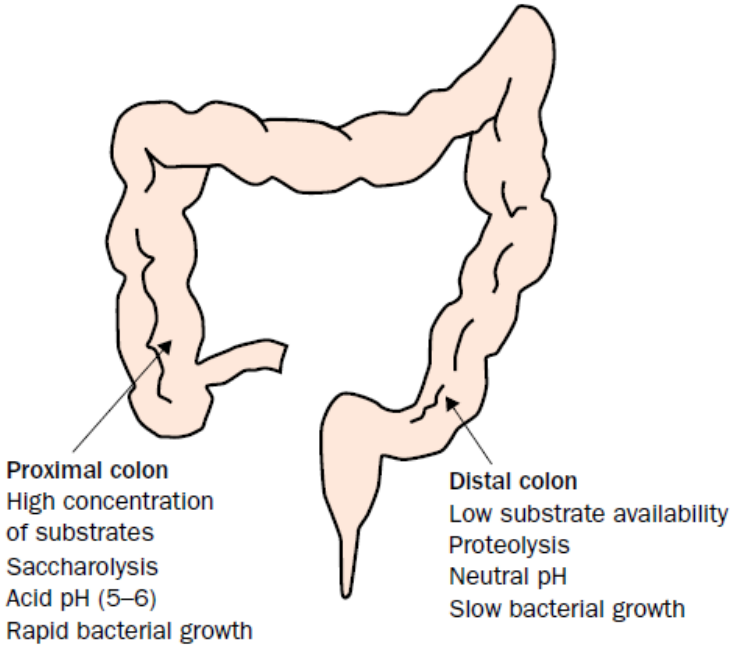
Une autre étude (Wu et al., 2011) a utilisé des questionnaires de rappels et des habitudes alimentaires à long-terme pour analyser la relation entre l'alimentation et la composition du microbiote fécal. En se basant sur la définition des entérotypes, les auteurs ont trouvé que l'entérotype *Bacteroides* (entérotype 1) est associé aux régimes riches en lipides ou protéines et l'entérotype *Prevotella* (entérotype 2) est associé aux régimes riches en glucides. De Filippo et al. (2010) ont également montré que *Prevotella* est fortement présent dans le microbiote des enfants africains qui ont une alimentation riche en glucides, mais pas dans celui des enfants européens. Cependant, l'étude la plus récente de Yatsunenko et al. (2012) n'a pas trouvé une relation entre l'alimentation des populations très différentes et les entérotypes distincts, mais plutôt une variation continue entre les proportions de *Bacteroides* et *Prevotella*.

Dans le même sens, une étude encore plus récente (Ou et al., 2013) examinant la différence de la composition du microbiote entre les africains américains et les africains natifs, montre une différence fondamentale entre les 2 populations. La prédominance de *Prevotella* a été retrouvée au sein du microbiote des africains natifs, alors que celle de *Bacteroides* a été retrouvée pour les africains américains.

3.2 Métabolisme bactérien des protéines et des acides aminés

Un rôle majeur du microbiote colique est la fermentation des résidus alimentaires non-digestibles, incluant des glucides et des protéines. Des preuves scientifiques (Gibson et al., 1976; Smiddy et al., 1960) montrent qu'une quantité substantielle de matériels azotés est transférée de l'intestin grêle au gros intestin, d'autant plus que même les protéines hautement digestibles peuvent elles aussi échapper à la digestion de l'intestin grêle (Evenepoel et al., 1999). Il a été documenté qu'environ 12 à 18 g de protéines passent par la jonction iléo-caecale et entrent dans le gros intestin par jour,

Figure 8. Caractéristiques de fermentation selon les segments du gros intestin.



Selon Guarner and Malagelada (2003) Lancet 361, 512-519.

correspondant à 2 à 3 g d'azote, dont 48-51% sous forme de protéines, 20-30% de peptides, 10-15% d'acides aminés, nitrate, urée et ammoniaque (Chacko and Cummings, 1988). La fermentation des protéines et des peptides par le microbiote, appelée aussi la putréfaction, est très intense dans le gros intestin. Du fait de la forme anatomique et physiologique de ce dernier (Figure 8), le substrat est naturellement plus abondant dans le caecum et le côlon ascendant, par rapport au côlon descendant où le substrat est moins disponible. Les acides gras à chaîne courte et des acides organiques produits lors de la fermentation bactérienne, induisent un pH plus acide (5 – 6) dans la partie proximale du gros intestin grâce à l'abondance du substrat alors que dans la partie distale le pH est proche du neutre (Cummings et al., 1987; Guarner and Malagelada, 2003). Conjointement avec le fait que l'activité des protéases est plus active au pH neutre ou légèrement alcalin qu'au pH acide (Macfarlane et al., 1988), la dégradation des protéines est plus importante dans la partie distale du gros intestin que la partie proximale.

3.2.1 Bactéries protéolytiques

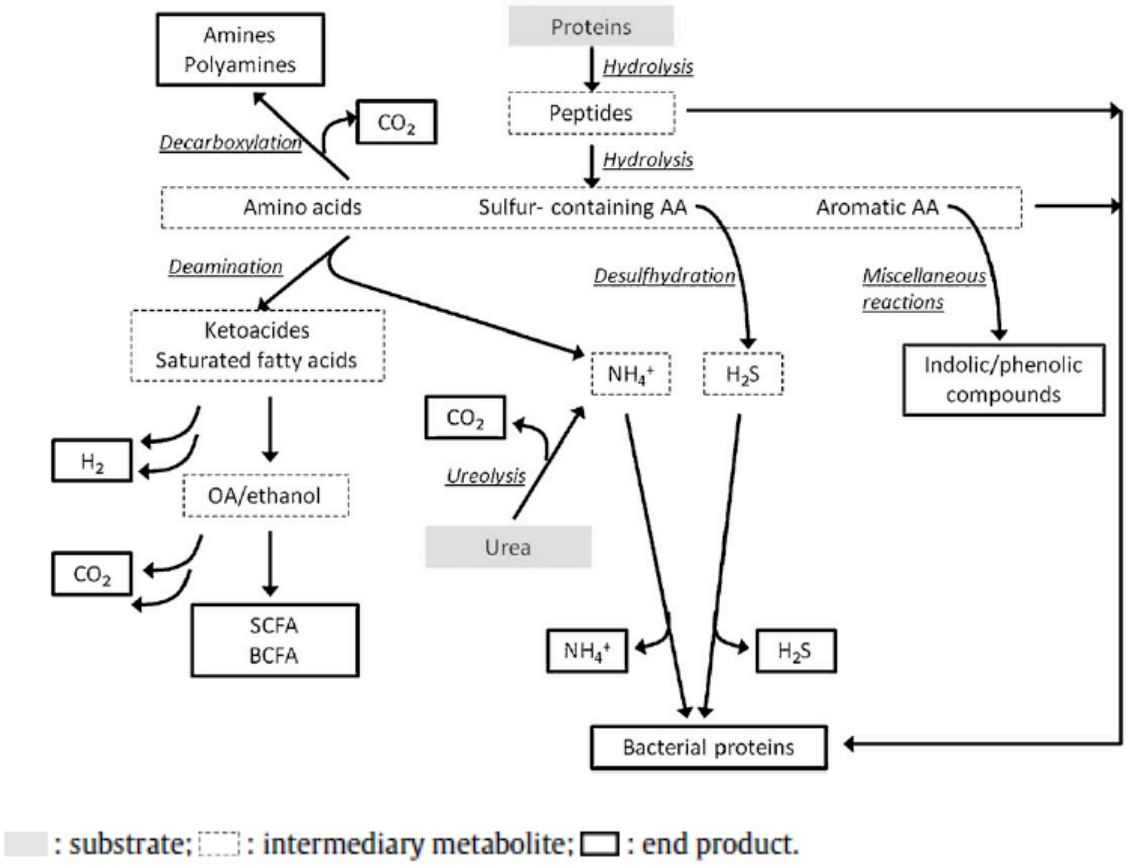
Beaucoup de bactéries du microbiote colique sont capables de dégrader les protéines. Les genres protéolytiques prédominants dans le côlon humain sont *Bacteroides* spp. et *Propionibacterium* spp. ; les genres bactériens protéolytiques moins prédominants sont *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* et *Staphylococcus* (Macfarlane et al., 1986). D'autres bactéries comme *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus* et *Peptostreptococcus* sont également capables de fermenter les protéines (Salminen et al., 1998). Les composés azotés, essentiellement des protéines et des peptides, sont dégradés par ces bactéries protéolytiques afin de les utiliser comme sources de carbone, d'azote et d'énergie.

L'activité protéolytique des bactéries mène à la libération des acides aminés et à la production d'une multitude de métabolites bactériens via diverses voies métaboliques, dont les principales sont schématisées dans la Figure 9.

3.2.2 Produits du métabolisme bactérien protéolytique

Dans le gros intestin, les acides aminés libérés par l'hydrolyse bactérienne des protéines et des peptides peuvent être incorporés directement dans les cellules bactériennes pour synthétiser des protéines. Ils peuvent aussi rentrer dans des différentes voies cataboliques (Figure 9). Une des voies majeures est la désamination ou la transamination qui peut être oxydative, réduite ou couplée (réaction de Stickland). Dans la plupart des cas, ces réactions produisent des acides cétoniques correspondants ou les acides gras saturés qui sont métabolisés par beaucoup de bactéries anaérobies et conduisent à la production des acides organiques (essentiellement formate, lactate et succinate), éthanol, H_2, CO_2, et des acides gras à chaîne courte (AGCC). Normalement, les acides organiques sont des métabolites intermédiaires qui sont rapidement transformés en AGCC, donc ne s'accumulent pas. (Davila et al., 2013; Macfarlane and Macfarlane, 2012). Les bactéries productrices d'AGCC et des acides organiques sont présentées dans le Tableau 3.

Figure 9. Schéma des voies de métabolisme des protéines par les bactéries.



Selon Davila AM et al. Pharmacological Research 68 (2013) 95– 107.

Tableau 3. Bactéries, leurs substrats et leurs produits dans le gros intestin (Salminen et al., 1998)

Bacteria	Description	Concentration (log_{10}/g dry wt faeces) Mean	Range	Substrate	Fermentation products
Bacteroides	G− rods	11·3	9·2–13·5	Saccharolytic	A, P, S
Eubacteria	G+ rods	10·7	5·0–13·3	Saccharolytic, some amino acid fermenting species	A, B, L
Bifidobacteria	G+ rods	10·2	4·9–13·4	Saccharolytic	A, L, f, e
Clostridia	G+ rods	9·8	3·3–13·1	Saccharolytic and amino acid fermenting species	A, P, B, L, e
Lactobacilli	G+ rods	9·6	3·6–12·5	Saccharolytic	L
Ruminococci	G+ cocci	10·2	4·6–12·8	Saccharolytic	A
Peptostreptococci	G+ cocci	10·1	3·8–12·6	As for the clostridia	A, L
Peptococci	G+ cocci	10·0	5·1–12·9	Amino acid fermenters	A, B, L
Methanobrevibacter	G+ cocco bacilli	8·8	7·0–10·5	Chemolithotrophic	CH_4
Desulfovibrios	G− rods	8·4	5·2–10·9	Various	A
Propionibacteria	G+ rods	9·4	4·3–12·0	Saccharolytic, lactate fermenting	A, P
Actinomyces	G+ rods	9·2	5·7–11·1	Saccharolytic	A, L, S
Streptococci	G+ cocci	8·9	3·9–12·9	Carbohydrate and amino acid fermenting	L, A
Fusobacteria	G− rods	8·4	5·1–11·0	Amino acid fermentation, carbohydrate also assimilated	B, A, L
Escherichia	G− rods	8·6	3·9–12·3	As for streptococci	Mixed acids

G+, Gram-positive; G−, Gram-negative; A, acetate; P, propionate; B, butyrate; L, lactate; S, succinate; f, formate; e, ethanol.

Les AGCC, essentiellement acétate, propionate et butyrate, et les acides gras à chaîne branchée (AGCB), essentiellement isobutyrate, 2-methylbutyrate, isovalérate et minoritairement isocaproate, sont des produits finaux majeurs du métabolisme bactérien des protéines et des acides aminés (Smith and Macfarlane, 1997). Les AGCB sont présents en quantité moins grande dans le contenu luminal du gros intestin que les AGCC (Cummings et al., 1987; Mortensen and Clausen, 1996). Contrairement aux AGCC, qui peuvent être formés à partir des glucides et des protéines, les AGCB sont produits uniquement à partir des acides aminés ; leur formation par le microbiote colique est donc un bon marqueur de la dégradation des protéines dans le gros intestin (Nordgaard et al., 1995; Rasmussen et al., 1988). Les AGCC et les AGCB produits dépendent des acides aminés précurseurs comme indiqué dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4. Les AGCC, AGCB, acides organiques et leurs acides aminés précurseurs (Blachier et al., 2007; Davila et al., 2013; Macfarlane and Macfarlane, 2012)

Acides aminés précurseurs	**Métabolites bactériens produits**
Alanine, aspartate, glutamate, glycine, thréonine	Acétate
Alanine, thréonine	Propionate
Glutamate, lysine	Butyrate
Valine	Isobutyrate
Isoleucine	2-methylbutyrate
Leucine	Isovalérate
Leucine	Isocaproate
Aspartate, désamination d'un acide aminé quelconque	Succinate
Désamination d'un acide aminé quelconque	Lactate, formate

D'autres métabolites bactériens sont produits à partir des acides aminés précurseurs spécifiques. Les amines et les polyamines peuvent être produits à partir de tous les acides aminés via décarboxylation, alors que les composés indoliques et phénoliques ne sont produits qu'à partir des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane). Le sulfure d'hydrogène (H_2S) est produit à partir des acides aminés soufrés, comme la méthionine et la cystéine. L'ammoniaque (NH_4+) est produite à partir de la désamination des acides aminés, mais aussi de l'urée. (Davila et al., 2013; Macfarlane and Macfarlane, 2012; Nyangale et al., 2012).

3.3 Utilisation des métabolites bactériens par l'hôte et ses effets physiologiques

Les effets de la putréfaction, c'est-à-dire la dégradation des protéines par les bactéries protéolytiques, dans le côlon sur la santé et la physiologie intestinale de l'hôte sont essentiellement liés aux métabolites bactériens produits.

3.3.1 Les acides gras

AGCC

Les AGCC exercent divers effets physiologiques sur le métabolisme de l'hôte. Ces effets métaboliques et physiologiques des AGCC, sur les cellules épithéliales coliques en particulier, contribuent en grande partie aux importantes interactions entre le microbiote et l'hôte.

Les AGCC sont des acides faibles (pKa ≈ 4,8) ; ils se trouvent donc principalement sous forme dissociée ionique dans la lumière du gros intestin où le pH varie entre 5 – 6 au niveau proximal mais est proche de la neutralité au niveau distal. Les colonocytes peuvent absorber ces acides organiques à travers la membrane apicale selon plusieurs mécanismes :

- La diffusion passive de la forme non dissociée, liposoluble ;
- L'échange AGCC-HCO_3^- (Kawamata et al., 2007; McNeil et al., 1979);
- Le transport actif de la forme dissociée (> 90%) par les transporteurs d'AGCC.

Deux transporteurs d'AGCC sur la membrane apicale des colonocytes ont été documentés (Cuff et al., 2005; Gupta et al., 2006; Ritzhaupt et al., 1998b) : le monocarboxylate transporter isoform 1 (MCT1) et le Na^+-coupled monocarboxylate transporter (SMCT1). Le MCT1 est couplé à un gradient H^+ transmembranaire et le SMCT1 est couplé à ion Na^+. La protéine CD147 est associée à MCT1 pour le transport du butyrate (Buyse et al., 2002).

Les études *in vitro* utilisant des cellules issues de lignées cellulaires coliques humaines (C2/bbe) et *in vivo* chez le rat, montrent que les AGCC interviennent dans l'absorption du sodium en stimulant l'activité et l'expression des échangeurs Na^+/H^+ de la membrane apicale, en particulier l'échangeur

NHE3 (Diener et al., 1993; Musch et al., 2001). Les AGCC inhibent la sécrétion du Cl^-, cette inhibition est médiée par l'AMPc et la GMPc (Charney et al., 1999; Dagher et al., 1996; Zaharia et al., 2001).

L'absorption des AGCC est très efficace dans le gros intestin, avec seulement moins de 5% excrétés dans les fèces. Une fois que les AGCC sont captés par les colonocytes, ces composés sont oxydés (acétate, propionate et butyrate) fournissant ainsi de l'énergie à ces cellules, mais à des degrés différents. En terme de préférence métabolique, l'ordre est butyrate > acétate > propionate (Fleming et al., 1991). Le butyrate exerce une action d'épargne vis-à-vis de la glutamine dans les colonocytes. En d'autres termes, ce substrat luminal peut se substituer à l'utilisation de la glutamine d'apport sanguin, expliquant ainsi pourquoi le butyrate ne provoque dans la plupart des études qu'une augmentation modeste de la consommation d'oxygène par les cellules épithéliales coliques. Les AGCC sont oxydés en CO_2 et corps cétoniques, qui servent de précurseurs pour la synthèse lipidique. Des études post mortem sur les victimes de mort subite indiquent une importante utilisation « first pass » par la muqueuse intestinale, surtout pour le butyrate, dont le ratio relatif passe de 22% dans la lumière colique à 8% dans le sang de la veine porte, soit une clairance d'environ 65% (Cummings et al., 1987). Les AGCC non métabolisés par la muqueuse passent ensuite dans la veine porte, qui conduit le sang des organes splanchniques, i.e. le gros intestin, l'intestin grêle, l'estomac, les reins et la rate vers le foie, où le propionate est essentiellement métabolisé : son ratio molaire relatif passe de 21% dans la veine porte à 12% dans la veine hépatique (Cummings et al., 1987). Le reste des AGCC est transporté du foie par la circulation sanguine vers d'autres organes périphériques qui sont capables de les métaboliser, comme par exemple les muscles qui métabolisent en grande quantité l'acétate.

Butyrate

Le butyrate est l'AGCC qui suscite le plus d'intérêt scientifique, du fait qu'il est considéré comme étant le substrat oxydatif préférentiel des colonocytes comparé avec le propionate et l'acétate ; 70% de la consommation d'oxygène de ces cellules est due au métabolisme du butyrate (Roediger, 1980). De plus, et en accord avec ce qui a été dit précédemment, en présence de glucose et de glutamine, qui sont des substrats présents dans la circulation sanguine, le butyrate reste toujours le substrat oxydé préférentiellement par les colonocytes (Roediger, 1982). Il a été rapporté d'ailleurs que le butyrate est capable de réguler à la hausse l'expression d'ARNm et l'abondance en protéine du transporteur MCT1 ; ce qui n'est pas le cas pour l'acétate et le propionate (Cuff et al., 2002).

En plus d'être le substrat énergétique majeur des colonocytes, le butyrate exerce un effet trophique sur la muqueuse intestinale *in vivo* mais inhibe la prolifération des cellules coliques néoplasiques *in vitro*. En effet, une inhibition dose-dépendante, par le butyrate, de la prolifération des cellules issues de plusieurs lignées coliques tumorales a été observée (Gamet et al., 1992; Siavoshian et al., 1997). Le propionate et le valérate exercent également ces effets d'inhibition, d'une manière moins importante, mais ce n'est pas le cas des autres AGCC (acétate et caproate) et BCFA (isobutyrate et isovalérate). Cependant, à l'opposé de son effet inhibiteur sur la prolifération des cellules tumorales, le butyrate stimule la croissance cellulaire d'une manière significative ou non selon les études quand il

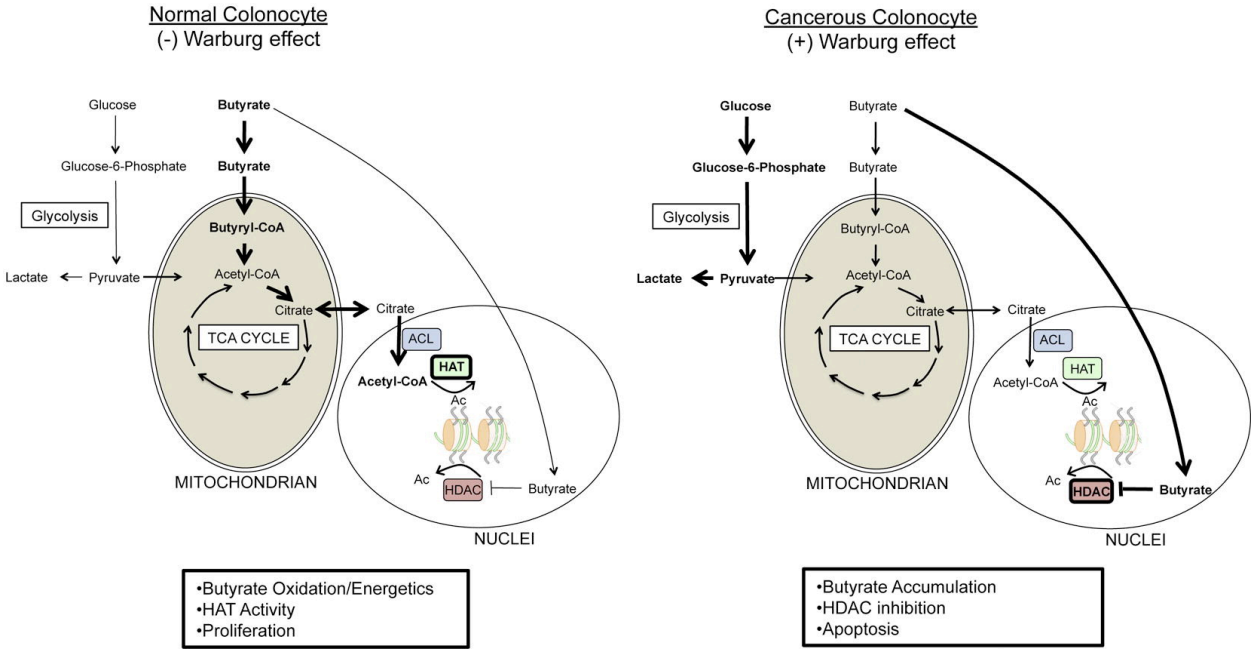
est délivré sur l'épithélium sain *in vivo* ou sur des cellules non tumorales (Lupton, 2004). Une étude chez le rat impliquant l'ingestion de différentes quantités de son de blé a montré une corrélation inverse entre la concentration de butyrate dans le contenu colique luminal et l'index de prolifération des cellules épithéliales coliques (Boffa et al., 1992). Une autre étude *in vivo* a indiqué que l'effet stimulant sur la prolifération cellulaire est effectif seulement en bas des cryptes du côlon (Velazquez et al., 1997).

En plus des effets décrits ci-dessus le butyrate est connu en tant qu'inhibiteur de l'activité des enzymes histone déacetylases (HDAC) provoquant en conséquence une hyperacétylation des histones (Riggs et al., 1977; Sealy and Chalkley, 1978). Ainsi, l'effet du butyrate inhibant la croissance des cellules tumorales a été attribué à son effet inhibiteur des HDAC, qui modifie l'expression de gènes en rapport avec diverses fonctions, incluant la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules (Archer et al., 1998; Chopin et al., 2002; Velcich et al., 1995). Une des fonctions de l'acétylation des histones est d'altérer la compression des chromatines (Garcia-Ramirez et al., 1995), et par conséquent, de faciliter la transcription par les ARN polymérases (Nightingale et al., 1998; Tse et al., 1998). L'état de l'acétylation des histones est le résultat net des activités des enzymes histone acétyltransférase (HAT), qui augmente l'acétylation des histones, et des HDAC (Grunstein, 1997).

Il est intéressant de noter que l'oxydation du butyrate dans la mitochondrie génère l'acétyl-CoA et d'autres métabolites intermédiaires via la voie de β-oxydation. Cette oxydation du butyrate dans la mitochondrie réduit en parallèle sa concentration intracellulaire et intranucléaire (Andriamihaja et al., 2009), le rendant moins disponible au niveau du noyau pour l'inhibition de l'activité des HDAC. Une étude très récente (Donohoe et al., 2012) a proposé un mécanisme expliquant le double effet du butyrate, c'est-à-dire qu'il inhibe la prolifération des cellules tumorales mais stimule la croissance des cellules saines. Les auteurs montrent que butyrate stimule l'acétylation des histones via 2 mécanismes différents (Figure 10). A faible concentration, le butyrate est métabolisé en grande partie dans la mitochondrie et produit de l'acétyl-CoA, qui fournit des groupements acétyl à HAT. A forte concentration, la capacité d'oxydation du butyrate est dépassée, ce qui implique une accumulation du butyrate intracellulaire et intranucléaire, conduisant à l'inhibition des HDAC. Dans le cas des cellules cancéreuses, à cause de l'effet Warburg, elles privilégient le glucose comme substrat énergétique, ce qui entraîne une accumulation en butyrate. Les 2 mécanismes conduisent à l'hyperacétylation des histones, mais impliquent des profils de transcription distincts : le 1er mécanisme stimule la transcription des gènes de la prolifération cellulaire et le 2ème stimule plutôt des gènes d'apoptose.

Le butyrate régule également l'homéostasie énergétique, en raison de rôle important en tant que substrat oxydatif des colonocytes (Donohoe et al., 2011). En effet, lorsque présent dans le milieu d'incubation des colonocytes provenant de souris axénique (« germ-free »), il corrige leur déficit de respiration mitochondriale et les empêche de subir l'autophagie.

Figure 10. Acétylation des histones par le butyrate selon 2 mécanismes distincts.



Selon Donohoe, D. R., et al. Mol Cell 2012, 48(4): 612-626.

AGCB

Le métabolisme des AGCB et ses effets sur les colonocytes ont été beaucoup moins étudiés. Les AGCB sont des donneurs d'azote pour la biosynthèse *de novo* des autres acides aminés par le microbiote, comme la glutamine et l'alanine, qui sont des sources énergétiques des colonocytes. Quelques études existantes sur les AGCB ont porté sur l'isobutyrate. Il a été rapporté que l'isobutyrate régule l'absorption et la sécrétion des électrolytes, comme font les AGCC, via l'activité et l'expression des canaux d'échange Na^+/H^+ et via l'inhibition de la sécrétion de Cl^- (Charney et al., 1999; Dagher et al., 1996; Diener et al., 1993; Musch et al., 2001; Zaharia et al., 2001).

3.3.2 Les acides organiques

Les acides organiques, lactate, succinate et formate sont des métabolites intermédiaires produits au cours de la fermentation des protéines et des acides aminés par le microbiote (Figure 9). Ils ne sont normalement pas ou peu accumulés dans la lumière colique et sont rapidement métabolisés en AGCC ; on peut néanmoins les détecter en quantités plus ou moins grandes dans la lumière du gros intestin en situation normale.

Les 2 stérioisomères L- et D-lactate sont produits tous les 2 par le microbiote colique ; cependant, peu de bactéries sont capables de produire du D-lactate (Macfarlane and Macfarlane, 2012). L'étude post-mortem chez les personnes victimes de mort subite a montré que les concentrations en lactate dans l'intestin sont de l'ordre du mM. Les isomères du lactate sont absorbés rapidement par la muqueuse intestinale comme les AGCC (Ritzhaupt et al., 1998b). Le L-lactate est un substrat oxydatif des colonocytes. Le D-lactate est un produit mineur de la fermentation et une fois absorbé par la muqueuse, il est métabolisé dans le foie et les reins. Sa présence dans le corps humain est originaire presque exclusivement du gros intestin, il peut être un marqueur de fermentation d'un substrat fermentable par le microbiote (Macfarlane and Macfarlane, 2012).

Le succinate peut être transporté dans la muqueuse colique (Wolffram et al., 1994) et il est capable d'augmenter la consommation d'oxygène des colonocytes (Goubern et al., 2007). On peut supposer qu'il est un substrat oxydatif de ces cellules, même s'il n'a pas été testé directement.

3.3.3 Les autres métabolites

D'autres produits finaux issus de la putréfaction bactérienne des protéines et des acides aminés, comme l'ammonium (NH_4^+) / l'ammoniac (NH_3), le sulfure d'hydrogène (H_2S), les polyamines et les composés phénoliques et indoliques, sont également présents en quantités non négligeables dans la lumière du gros intestin (Blachier et al., 2007; Davila et al., 2013). Les précurseurs et leurs effets principaux sont résumés dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5. Les métabolites bactériens présumés délétères et leurs précurseurs.

Métabolites bactériens produits		Réactions métaboliques	Acides aminés précurseurs	Principaux effets physiologiques sur l'hôte
Ammonium/ammoniac		Désamination	Acides aminés	- Désorganisations histologiques de la muqueuse colique (Lin and Visek, 1991) ; - Inhibition de la prolifération des cellules HT-29 (Mouille et al., 2003) ; - Augmentation du nombre de mitoses par crypte (Ichikawa and Sakata, 1998) ; - Inhibition de l'oxydation des AGCC par les colonocytes (Darcy-Vrillon et al., 1996) ; - Augmentation de la perméabilité paracellulaire (Hughes et al., 2008).
Sulfure d'hydrogène		Désulfhydration	Méthionine, cystéine	- Perturbations des fonctions du poumon et du cerveau (Grieshaber and Volkel, 1998; Nicholson et al., 1998); - Rôles éventuels dans la pathogénèse de la recto-colite hémorragique (Pitcher and Cummings, 1996); - Altérations génomiques (Attene-Ramos et al., 2010) ; - Perturbation de l'oxydation des AGCC et de la respiration des colonocytes (Leschelle et al., 2005).
Polyamines	Putrescine	Décarboxylation	Ornithine/arginine	- Peu de données scientifiques ; - Putrescine est strictement nécessaires pour la mitose des cellules épithéliales cancéreuses (Ray et al., 2001); - Agmatine est capable de ralentir la mitose des colonocytes cancéreux (Mayeur et al., 2005).
	Agmatine		Arginine	
	Cadavérine		Lysine	
	Tyramine		Tyrosine	
	Histamine		Histidine	
Composés phénoliques et indoliqués	Composés phénoliques[#]	Réactions diverses	Phénylalanine	- Peu de données scientifiques ; - Phénol : mutagène (Kikugawa and Kato, 1988) ; altération de la perméabilité cellulaire (Hughes et al., 2008); - Altération de la viabilité des cellules épithéliales coliques (Pedersen et al., 2002).
			Tyrosine	
	Composés indoliques[##]		Tryptophane	

Les composés phénoliques sont les phénols, p-crésol, 4-éthylphénol, les composés avec des groupements phényls (phénylpyruvate, phényllactate, phénylacétate, phénylpropionate) et les

composés avec des groupements hydroxyphényls (hydroxyphénylpyruvate, hydroxyphényllactate, hydroxyphénylacétate, hydroxyphénylpropionate).

Les composé indoliques sont l'indole, le skatole (3-méthyl indole), l'indole acétate et l'indole propionate.

Messages clé:

- ✓ Le microbiote est composé de 10 fois plus de cellules que le corps humain.
- ✓ Les techniques moléculaires à haute résolution ont donné accès au classement phylogénique des bactéries du microbiote (cultivables ou non).
- ✓ L'activité métabolique principale du microbiote est liée à la digestion des glucides et des protéines.
- ✓ La composition du microbiote peut être influencée par l'alimentation.
- ✓ Une quantité importante de protéines peut arriver dans le côlon pour y être dégradées par le microbiote.
- ✓ La dégradation des protéines donne lieu à divers métabolites bactériens qui influencent la santé de l'hôte.
- ✓ Les AGCC (acetate, propionate et butyrate) sont des principaux métabolites finaux.
- ✓ Le butyrate est le substrat majeur des colonocytes et contrôle l'expression de gènes notamment liés à la prolifération/apoptose des cellules.

4 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

La maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH) sont les 2 formes principales des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Il existe néanmoins des formes minoritaires de MICI non classifiées. Ces maladies, comme leur nom l'indique, provoquent l'inflammation de la muqueuse du tractus gastro-intestinal. A cause de l'absence de traitement curatif, les MICI sont caractérisées par l'alternance d'épisodes de poussées inflammatoires et d'épisodes de rémission plus ou moins longue dans la plupart des cas.

La MC et la RCH sont définies et distinguées empiriquement par les caractéristiques cliniques, pathologiques, endoscopiques et radiologiques (Podolsky, 2002). Ci-dessous sont décrits brièvement quelques éléments qui distinguent la RCH de la MC.

RCH

La RCH implique le rectum et le côlon et s'étend dans un mode rétrograde continu. Le rectum est toujours impliqué chez les adultes. Les lésions sont en général dispersées et superficielles. Les ulcérations profondes ne sont observées que dans les cas sévères. L'activité de la maladie tend à diminuer avec le temps. Histologiquement, on peut observer l'augmentation du nombre des neutrophiles dans le lamina propria et les cryptes, où elles forment des micro-abcès.

MC

Contrairement à la RCH, la MC peut impliquer un site quelconque du tube digestif, de la bouche à l'anus, pendant la progression de la maladie. Les sites impliqués sont en discontinu et segmentés. Les principaux sites impliqués sont l'iléum et le côlon. La classification segmente la maladie en trois catégories : seulement iléale, seulement colique et iléocolique (Silverberg et al., 2005). Le site impliqué tend à être stable avec le temps. Les lésions ulcératives sont profondes et atteignent la sous-muqueuse (inflammation transmurale). On peut observer histologiquement des agrégations des macrophages qui forment fréquemment des granulomes.

Mortalité et risque de cancer

La mortalité des patients avec la RCH n'est pas plus élevée que celle de la population générale ; alors que les patients avec la MC ont une mortalité plus importante par rapport à la population générale (Cosnes et al., 2011).

Le risque de cancer colorectal est considéré traditionnellement plus élevé chez les patients avec la RCH (Gupta et al., 2007; Rutter et al., 2004a; Rutter et al., 2004b). Une étude sur une cohorte suédoise (Soderlund et al., 2010) a montré que les patients atteints d'une des deux formes majeures de MICI ont un risque plus important de cancer colorectal, mais le risque est différent selon le sexe. Cependant, une autre étude publiée plus récemment sur une cohorte danoise (Jess et al., 2012b) montre que le risque du cancer colorectal n'est pas plus élevé dans les deux formes de MICI que dans la population générale, à l'exception de certains sous-groupes de la RCH (ex. patients avec la

RCH diagnostiquée depuis l'enfance). Ces résultats contradictoires ont fait l'objet d'une méta-analyse récente (Jess et al., 2012a), qui montre qu'en se basant sur des cohortes de populations de différents pays, la RCH augmente le risque du cancer colorectal de 2,4 fois et que les facteurs comme le sexe masculin, le jeune âge de diagnostic de la RCH et la colite extensive augmentent ce risque.

4.1 Epidémiologie descriptive

L'incidence est le nombre de nouveaux cas apparus au cours d'un intervalle de temps donné. L'incidence des MICI est souvent donnée par 100 000 personnes-années. De nombreux articles scientifiques décrivent l'incidence des MICI dans différentes régions du monde. Ces données ont fait l'objet d'une revue par un médecin américain il y a une dizaine d'années (Loftus, 2004) et ont été revues récemment par des cliniciens français en 2011 (Cosnes et al., 2011). Les taux d'incidence et de prévalences les plus élevés sont généralement rapportés en Europe du nord, au Royaume-Uni et en Amérique du nord. Ce sont les régions géographiques qui ont été traditionnellement associées aux très fortes incidences des MICI.

En Europe

En Europe, un gradient décroissant d'incidences du nord vers le sud de l'Europe a été constaté. L'incidence en Europe central et du sud est en forte augmentation. L'étude collaborative européenne multicentrique (EC-IBD) a rapporté des taux d'incidence confondus de 8,7 – 11,8 cas/100 000 personnes-années pour la RCH et 3,9 – 7,0 cas/100 000 personnes-années pour la MC (Shivananda et al., 1996). Cette étude EC-IBD a également indiqué que le gradient nord-sud des incidences devient moins important qu'espéré, puisque le taux d'incidence est en hausse dans les pays du sud alors qu'il est stabilisé dans les pays du nord. En extrapolant à la population de la communauté européenne (490 millions), il est estimé que 2,4 millions de personnes souffrent de MICI en Europe, dont 1 million avec MC et 1,4 millions avec RCH (Cosnes et al., 2011).

En France

En France, l'étude EPIMAD (Gower-Rousseau et al., 2013) qui a commencé un grand registre des patients atteints de MICI dans le nord de la France depuis 1988 a récemment publié ses résultats. Pendant les 20 dernières années (1988 – 2008), le taux d'incidence de la MC a significativement augmenté de 5,3 à 7,6 par 100 000 personnes-année, alors que celui de la RCH est resté stable à 4,4 par 100 000 personnes-année. A l'opposé de la plupart des pays, l'incidence de la MC est supérieure à celle de la RCH dans les régions au nord de la France. Un autre résultat est que l'incidence de la MC chez les jeunes de moins de 20 ans a presque doublé en 20 ans.

D'autres régions du monde

Actuellement, les incidences et les prévalences des MICI dans d'autres régions du monde où les MICI sont traditionnellement rares, tels que l'Asie et l'Europe de l'est, sont en augmentation. L'étude récente sur l'Asie pacifique (Ng et al., 2013) a rapporté les taux d'incidence des MICI de 1,37 en Asie et de 23,67 en Australie, par 100 000 personnes-année. La Chine a le taux d'incidence le plus élevé

en Asie : il est de 3,44 par 100 000 personnes-année. Les nouvelles données des pays de l'Europe de l'est (Lovasz et al., 2013) constatent que l'incidence et la prévalence des MICI sont en train d'augmenter rapidement dans certains pays, atteignant des taux d'incidences presque aussi élevés que dans les pays de l'Europe de l'ouest.

Le fait que l'incidence des MICI était basse dans les pays émergeants et est en hausse actuellement dans une société de plus en plus occidentalisée, suppose que les changements de style de vie, de l'alimentation et d'autres facteurs environnementaux contribuent à la hausse des incidences des MICI dans ces pays, ce qui nous amène à voir l'étiologie et la pathogenèse des MICI.

4.2 Etiologie et pathogenèse

Malgré tous les efforts de recherche et des progrès pour comprendre les MICI, l'étiologie de ces maladies reste toujours non élucidée. L'hypothèse actuelle la plus acceptée est la combinaison de la prédisposition génétique, des facteurs environnementaux et la réponse anormale immunitaire vis-à-vis du microbiote intestinal.

4.2.1 Génétique

Les facteurs génétiques découverts jusqu'à aujourd'hui influencent surtout la fonction barrière et l'immunité (innée et adaptative) de l'hôte. Le premier gène découvert associé avec les MICI est *NOD2* (désigné aussi comme *CARD15* et *IBD1*) (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). D'autres gènes comme par exemple *IL23R*, *ATG16L1* et *IRGM* ont été découverts par la suite (Duerr et al., 2006; Hampe et al., 2007; McCarroll et al., 2008; Rioux et al., 2007; Silverberg et al., 2007). NOD2 reconnaît un motif du peptidoglycane à travers le muramyl dipeptide (MDP) ; et module les réponses immunitaires innée et adaptative (Girardin et al., 2003). Le variant *IL23R* est associé à la protection contre les MICI (Dubinsky et al., 2007). Les *ATG16L1* et *IRGM* sont des gènes qui jouent un rôle essentiel pour toutes les formes d'autophagie. Ils sont impliqués dans l'homéostasie intracellulaire et la résistance à l'infection et l'élimination des bactéries intracellulaires.

Les études sur l'architecture génétique (genome-wide association studies, GWAS) ont récemment mis en évidence que 71 loci à risque pour la MC (Franke et al., 2010) et 47 loci à risque pour la RCH (Anderson et al., 2011). Ainsi le nombre total de loci à risque pour les MICI sont de 99, dont au moins 28 loci sont partagés entre la MC et la RCH.

4.2.2 Fonction barrière

La fonction barrière joue un rôle important dans les MICI : i) la perméabilité anormale de l'intestin a été retrouvée dans une étape précoce de la pathogenèse de la MC (Irvine and Marshall, 2000). Elle augmente la pénétration des macromolécules et des bactéries intactes. ii) la couche de mucus est une barrière de protection importante de la muqueuse intestinale. Il a été rapporté que l'expression du gène *MUC2* est différente chez les patients atteints de MICI. En effet, une perte d'expression de

MUC2 a été mesurée dans les muqueuses atteintes par rapport aux muqueuses saines (Buisine et al., 2001). En adéquation avec cette observation, les souris *Muc2*$^{-/-}$, déficientes en cellules à mucus, développent plus rapidement une colite plus sévère quand elles sont exposées à un agent chimique induisant la colite (Van der Sluis et al., 2006). Les travaux du Velcich et al. (2002) ont montré que les souris déficientes en Muc2 développaient un cancer colorectal (Velcich et al., 2002). Chez les patients atteints de cancer colorectal, la perte d'expression de la protéine MUC2 était corrélée significativement avec le faible taux de survie (Kang et al., 2011). iii) l'activation de la cascade de signalisation NF-κB dans les cellules épithéliales intestinales est supposée jouer un rôle clé dans la réponse immunitaire, réseau activé entre autre par NOD2 (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001) et par les cytokines pro-inflammatoires comme TNF et IL-1 (Al-Sadi and Ma, 2007).

4.2.3 Microbiote

L'idée que le microbiote est un facteur intervenant dans les MICI vient d'abord des observations sur les bénéfices du traitement antibiotique chez certains patients (Borody et al., 2007; Prantera et al., 1994; Sutherland et al., 1991). Cette idée est renforcée par des études chez les souris « germ-free ». La colite se développe spontanément chez les souris déficientes en IL-2 dans les conditions « specific-pathogen-free », mais la sévérité est beaucoup moins importante quand elles sont maintenues dans les conditions « germ-free » (Contractor et al., 1998; Schultz et al., 1999). Une autre étude chez les souris déficientes en IL-10 (Sellon et al., 1998) a montré que les bactéries entériques résidentes sont nécessaires pour le développement spontané de la colite chez ces souris. En effet, les souris déficientes en IL-10 et maintenues dans les conditions « specific-pathogen-free » développent de la colite, alors que ce n'est pas le cas pour celles maintenues dans les conditions « germ-free ».

Les analyses du microbiote des patients atteints de MICI ont révélé que le microbiote est moins diversifié chez ces patients, surtout en ce qui concerne les deux principaux groupes du phylum *Firmicutes*: *C. leptum et C. coccoides* (Sokol et al., 2008; Sokol et al., 2009). L'espèce dominante du groupe *C. leptum*, *F. prausnitzii* a été particulièrement diminuée chez ces patients (Sokol et al., 2009; Willing et al., 2009). De plus, l'absence de cette dernière au niveau terminal de l'iléum a été associée à un risque élevé de récidive après la chirurgie. Une étude très récente utilisant l'analyse phylogénétique du microbiote intestinal des patients atteints de MICI, des australiens autochtones et des australiens non autochtones montre que le microbiote des patients atteints de MICI a une abondance plus élevée en *Firmicutes*, alors que celui des sujets sains (australiens non autochtones) a une abondance plus élevée en *Bacteroidetes*, et que les australiens autochtones ont un microbiote abondant en *Betaproteobacteria* (Lyngkaran et al., 2013).

Il y a également été rapporté qu'un type particulier d'*Escherichia coli* adhérant et invasif (AIEC) est retrouvé en nombre important chez les patients atteints de MICI (Darfeuille-Michaud et al., 1998). Les AIEC ont la capacité de stimuler la libération de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 (Martin et al., 2004; Subramanian et al., 2008) et ont la capacité de se développer à l'intérieur des macrophages (Bringer et al., 2006). Les macrophages infectés par les AIEC libèrent alors la cytokine pro-inflammatoire TNFα et se transforment en granulomes *in vitro* (Glasser et al., 2001; Rolhion and Darfeuille-Michaud, 2007).

A ce jour, les mécanismes mis en jeu dans les interactions microbiote-hôte atteint de MICI ne sont pas élucidés. L'avancée de la recherche dans un futur proche sur le microbiome pourra aider considérablement sur la compréhension et la diversité fonctionnelle du microbiote dans le contexte des MICI.

4.2.4 Réponse immunitaire

Les réponses immunitaires sont aberrantes chez les patients atteints de MICI. Les mécanismes par lesquels les réponses du système immunitaire dérégulé initient et entretiennent les atteintes inflammatoires sur l'intestin ne sont toujours pas totalement clairs. Même si la réponse immunitaire innée semble être un prérequis pour l'activation excessive de l'immunité adaptative, cette dernière est en grande partie responsable des dégâts tissulaires chez les patients atteints de MICI. Les réponses adaptatives sont affectées au niveau de populations cellulaires résidentes et recrutées. Ce sont les cellules lymphocytes B sécrétant des IgA et des IgG, les cellules lymphocytes T qui sont dominées par un phénotype T_H1, T_H17 ou T_H2 et les cellules T/B régulatrices (Xavier and Podolsky, 2007).

En termes simplistes, la RCH semble manifester un profil du type T_H2 et la MC, un profil du type T_H1. En réalité, la distinction entre les 2 formes majeures de MICI n'est cependant pas si claire, les travaux récents montrent des chevauchements plus complexes. De plus, les cellules T_H17 ont été récemment découvertes et leurs rôles dans les MICI sont en train d'être éclairés activement (Caprioli et al., 2008).

Les cellules T_{reg} semblent être impliquées dans la suppression des réponses immunitaires vis-à-vis des bactéries commensales (Allez et al., 2002) et sont présentes dans les segments coliques enflammés ou non de la RCH (Yu et al., 2007). Les cellules B_{reg} jouent un rôle régulateur dans l'inflammation intestinale, mais sont présentes uniquement en état d'inflammation (Mizoguchi and Bhan, 2006). La fonction régulatrice des cellules B_{reg} peut être accomplie directement par la production des cytokines régulatrices IL-10 et TGFβ, et aussi d'interagir avec des cellules T pathogéniques pour réduire les réponses immunitaires nocives.

4.2.5 Environnement

Les études chez les jumeaux monozygotes ont trouvé 50 – 60% de concordance pour la MC montrant l'importance du facteur génétique (Halfvarson et al., 2003; Orholm et al., 2000). Une étude plus récente montre 30 – 35% de concordance pour la MC et seulement 10 – 15% pour la RCH (Spehlmann et al., 2008). Ceci étant, le revers de la médaille, la grande proportion restante de discordance sur les individus ayant le même fond génétique indique l'importance des facteurs environnementaux, particulièrement dans le cas de la RCH. Un résultat intéressant de l'étude épidémiologique en Asie pacifique a montré que l'histoire familiale est moins commune en Asie qu'en Australie : 3% vs 17% (Ng et al., 2013), ce qui indique la part faible du facteur génétique, et la part très importante des facteurs non génétiques dans l'étiologie des MICI dans les nouveaux cas des pays en voie de développement.

Il semble que le mode de vie et l'alimentation dans les pays industrialisés ait un impact sur le profil de la colonisation des bactéries ainsi que leur composition dans l'intestin. Dans les pays émergeants, le style de vie et l'alimentation sont de plus en plus occidentalisés, et le taux d'incidence des MICI augmente en parallèle. Les lésions intestinales des MICI sont engendrées par une réponse immunitaire exagérée et dérégulée vis-à-vis des bactéries commensales dans l'intestin. Ainsi le changement des facteurs environnementaux (style de vie, alimentation, etc.) altère le microbiote, qui à son tour interagit anormalement avec le système immunitaire de l'hôte, semblerait être l'origine de cette dérégulation conduisant aux MICI.

4.3 Etat inflammatoire dans la muqueuse

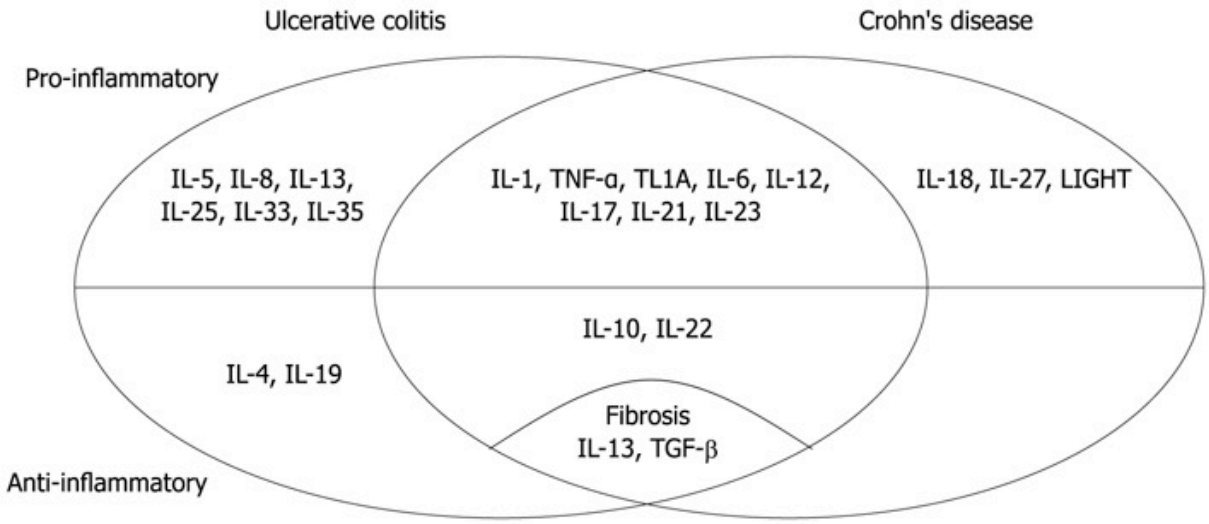
L'inflammation normale de bas niveau est limitée par son autocontrôle, grâce à la production des cytokines anti-inflammatoires qui suit étroitement celle des cytokines pro-inflammatoires. Dans les cas des MICI, l'état chronique de l'inflammation semble imputable à une défaillance des mécanismes nécessaires pour maintenir les réponses inflammatoires à un bas niveau.

4.3.1 Cytokines impliquées dans les MICI

Comme présenté plus tôt dans la partie 4.2.4, la MC est souvent décrite comme une maladie associée aux cellules T_H1, parce que les cytokines servant de médiatrices de l'inflammation sont des cytokines T_H1, telles que IFNγ, TNFα et IL-12 ; alors que la RCH est souvent considérée comme une maladie associée aux cellules T_H2, à cause de l'augmentation de l'expression des cytokines T_H2, telles que IL-5 et IL-13, même si l'association claire avec la cytokine T_H2 IL-4 n'a pas été établie (Fuss et al., 1996). Mais la distinction des 2 formes de MICI en cytokines produites n'est pas si claire, surtout avec l'identification récente des cellules T_H17 et leur rôle important dans diverses maladies (Wilke et al., 2011). Ainsi, les MICI ont été, elles aussi, associées avec les cellules T_H17, qui sont liées avec des cytokines IL-17, IL-21, IL-22 et IL-23 (Ahern et al., 2008).

Les cytokines impliquées dans les MICI peuvent être classées en 2 catégories : les pro- et les anti-inflammatoires. L'équilibre entre les 2 catégories de cytokines est essentiel pour l'homéostasie de l'intestin, et les patients souffrant de MICI ont une surproduction des cytokines pro-inflammatoires (Figure 11). Les cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-23, IFNγ et TNFα, jouent un rôle dans l'initiation et la progression des MICI, alors que les cytokines anti-inflammatoires, telles que IL-4, IL-10 et IL-13 contribuent également à l'état inflammatoire dans les MICI, puisqu'elles régulent la production des cytokines pro-inflammatoires à la baisse (Muzes et al., 2012). TGFβ en particulier jour un rôle régulateur dans les MICI. Cette cytokine influence les processus d'inflammation négativement et la synthèse du collagène positivement (Moustakas et al., 2002; Muzes et al., 2012).

Figure 11. Les cytokines impliquées dans les MICI.



Selon Műzes G. et al. World J Gastroenterol. 2012 November 7; 18(41): 5848–5861.

De plus, le blocage des cytokines pro-inflammatoires est la cible thérapeutique des études cliniques et certains présentent un effet bénéfique (Perrier and Rutgeerts, 2011). Des agents anti-TNFα sont actuellement utilisés pour le traitement de la MC et la RCH et ont pu améliorer considérablement l'état des patients (Pineton de Chambrun et al., 2010).

4.3.2 Stress oxydatif lié à l'état inflammatoire des MICI

Les MICI sont considérées comme des maladies avec des « surcharges oxydatives ». L'inflammation crée des radicaux libres, tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme par exemple le radical superoxyde (O_2°-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et les espèces réactives de l'azote (RNS) tels que le peroxynitrite ONOO° et le monoxyde d'azote NO°.

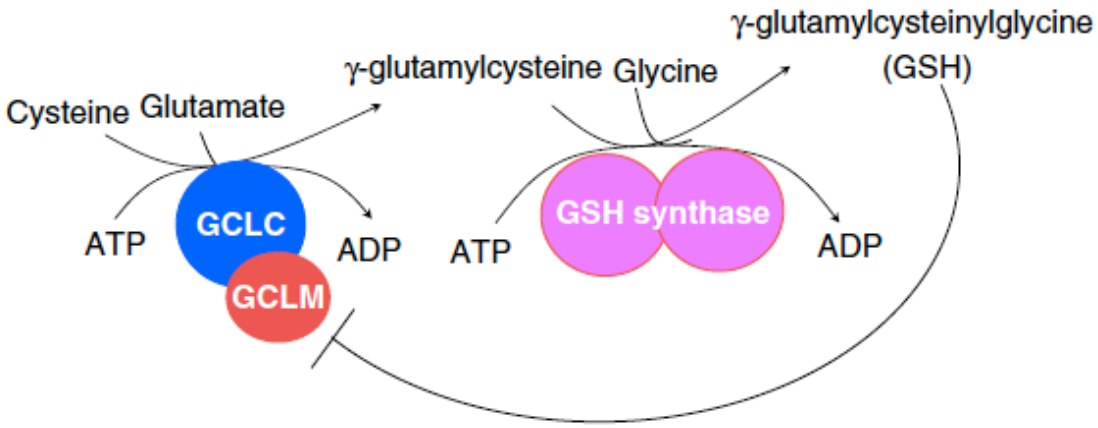
L'activation des cellules inflammatoires donne lieu à la production de quantités importantes de superoxyde et de monoxyde d'azote, qui est catalysée par les enzymes NADPH oxydase (NOX2) et monoxyde d'azote synthase inductible (iNOS) respectivement. De plus, la réaction entre le superoxyde et le monoxyde d'azote forme un puissant oxydant, le peroxynitrite (Radi et al., 1991). En outre, NOX1 et iNOS sont aussi inductibles dans les cellules épithéliales intestinales en présence de cytokines pro-inflammatoires (Suh et al., 1999).

Il existe des arguments suggérant que l'inflammation chronique de l'intestin est associée avec une production accrue des ROS et RNS, qui conduit à un état de stress oxydatif. Le radical libre le plus étudié chez les MICI est le NO. En mesurant la production de citrulline (qui est produite en même temps que le NO par l'iNOS de façon équimolaire) sur les biopsies des patients présentant une MICI active, il a été montré que la quantité de NO générée et l'activité de l'iNOS sont augmentées dans la muqueuse colique dans les cas de RCH et de MC (Guihot et al., 2000; Kimura et al., 1998; Middleton et al., 1993; Rachmilewitz et al., 1995). L'iNOS a été retrouvée non seulement dans la lamina propria, mais aussi dans l'épithélium de surface (Kimura et al., 1998). Cependant, l'activité de l'iNOS dans la muqueuse colique et donc la production du NO au cours de la MC est controversée (Boughton-Smith et al., 1993). En mesurant la concentration du NO par des électrodes (au cours d'une biopsie) directement, *in situ*, dans la muqueuse des patients atteints de RCH, il a été rapporté que la concentration du NO est augmentée dans la muqueuse colique avec ou sans signe d'inflammation (Iwashita, 1998). De plus, un autre composé, le H_2O_2 a été retrouvé également augmenté dans la muqueuse colique dans le cas de RCH (Cao et al., 2004). Dans le même sens, des auteurs ont rapporté une hausse de l'expression de l'enzyme NOX1 dans le tissu colique de patients souffrant de RCH et de MC (Szanto et al., 2005).

GSH

Pour neutraliser les radicaux libres et maintenir l'homéostasie redox, l'organisme met en place des systèmes d'antioxydants. Parmi les systèmes enzymatiques impliqués dans la balance redox intracellulaire, le glutathion joue un rôle très important. Le glutathion est un tripeptide (γ-L-glutamyl-L-cysteinylglycine) formé par le glutamate, la cystéine et la glycine (Figure 12). La synthèse du glutathion peut être limitée par la disponibilité de cystéine intracellulaire (Lu, 1999). La source de la

Figure 12. La biosynthèse du glutathion.



Selon Lu, S. C. Biochim Biophys Acta 2013,1830(5): 3143-3153.

GCL : glutamate-cystéine ligase, qui est composée de sousunités catalytique (GCLC) et modificateur (GCLM).

cystéine peut être alimentaire, ou via la transsulfuration à partir de la méthionine (Shoveller et al., 2005) (Figure 4).

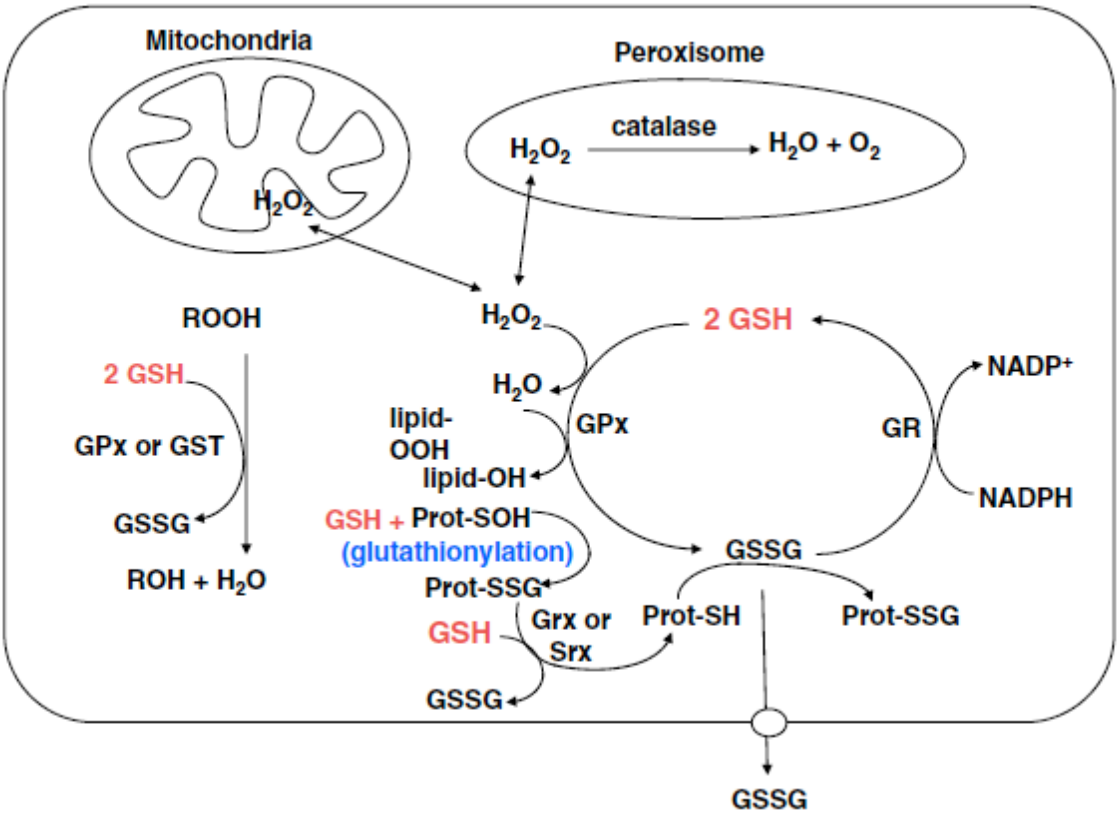
Il y a 2 formes de glutathion: le glutathion sous forme réduite (GSH), qui est la forme prédominante (>98%), et sous forme oxydée (GSSG). Le GSH réduit le H_2O_2 et le peroxyde lipidique par des réactions catalysées par l'enzyme glutathion peroxydase (GPx), et est ainsi oxydé en GSSG (Figure 13). Le GSSG est à son tour réduit en GSH par la glutathion réductase (GR), formant ainsi un cycle redox (Lu, 2013). Le ratio GSH/GSSG détermine par conséquent le potentiel redox intracellulaire. Dans le cas du stress oxydant, la capacité de la cellule de réduire le GSSG en GSH est dépassée. De plus, comme le GSSG peut être exporté à l'extérieur de la cellule ou peut réagir avec les groupes sulfhydriles des protéines, cela peut conduire à une perte de GSSG. Dans ce cas, la concentration intracellulaire du GSH est donc très réduite.

La teneur en glutathion dans la muqueuse intestinale des patients présentant une MICI a été mesurée, mais a donné des résultats contradictoires. Dans une étude, la teneur en GSH a été trouvée réduite avec l'augmentation de la teneur en GSSG dans les biopsies coliques de RCH (Tsunada et al., 2003), alors que d'autres études n'ont pas montré de différence en glutathion dans les tissus coliques des malades de MC et de RCH (Kruidenier et al., 2003; Szanto et al., 2005).

Myéloperoxidase (MPO)

En plus des radicaux libres et de la machinerie enzymatique contrôlant leurs concentrations intracellulaires, les neutrophiles activés dans la muqueuse intestinale produisent également l'enzyme myéloperoxidase (Schultz and Kaminker, 1962). En effet, la MPO est contenue dans les granules des neutrophiles. Ces derniers sont libérées dans le phagosome pendant le processus de dégranulation qui permet de détruire les microorganismes phagocytés dans le phagosome intracellulaire (Klebanoff, 1968). Pour ce faire, en présence de H_2O_2, la MPO oxyde les halogénures, le plus souvent le Cl^- en raison de sa concentration dans les fluides biologiques, en l'acide hypohalogéneux correspondant dans un premier temps. L'acide hypochloreux (HOCl) est un oxydant puissant qui peut provoquer des dommages aux tissus. Ce composé est produit pour détruire les microorganismes phagocytés (Domigan et al., 1995; Klebanoff, 1968). Cependant, dans un deuxième temps, des composés toxiques, comme la chlorine, les chloramines et l'ozone, sont produits et peuvent être relâchés à l'extérieur de la cellule, où ils peuvent attaquer les tissus sains et contribuent à la pathogénèse de certaines maladies, comme par exemple les maladies rénales (Malle et al., 2003). La MPO peut aussi être libérée à l'extérieur de la cellule pour détruire une cible extracellulaire. L'activité de la MPO est souvent utilisée comme marqueur de l'inflammation et du stress oxydant dans des travaux scientifiques (Naito et al., 2007; Zhu and Li, 2012).

Figure 13. Le cycle redox GSH/GSSG.



Selon Lu, S. C. Biochim Biophys Acta 2013,1830(5): 3143-3153.

4.4 Cicatrisation de la muqueuse

La réponse de l'organisme vis-à-vis d'une lésion de la muqueuse intestinale (ex. ulcération) implique la migration des cellules épithéliales autour de la lésion pour couvrir la zone dénudée, c'est le phénomène de restitution de la muqueuse, ou appelée également en français la ré-épithélialisation. On parle de régénération quant à la prolifération subséquente des cellules pour repeupler la zone lésée et restaurer l'architecture et la densité cellulaire.

Il y a *grosso modo* 2 types de lésions de la muqueuse intestinale : i) les lésions superficielles qui ne concerne que la partie la plus externe de la muqueuse et ne s'accompagne pas de phénomènes hémorragiques ; ii) les lésions profondes avec hémorragie (Lacy, 1988). Pour les lésions superficielles, les phases de restitution et de repopulation de courte durée peuvent être suffisantes pour restaurer la couche monocellulaire de l'épithélium (Argenzio et al., 1988; Feil et al., 1989; Lacy, 1988). En fonction de la largeur et de la profondeur, les lésions plus importantes peuvent avoir besoin d'une prolifération très importante des cellules épithéliales pour couvrir complètement la zoné lésée. Les réponses immunologiques et le dépôt du tissu de granulation protecteur peuvent également être nécessaires pour restaurer la continuité de la muqueuse quand la lésion est très importante.

4.4.1 Processus de cicatrisation

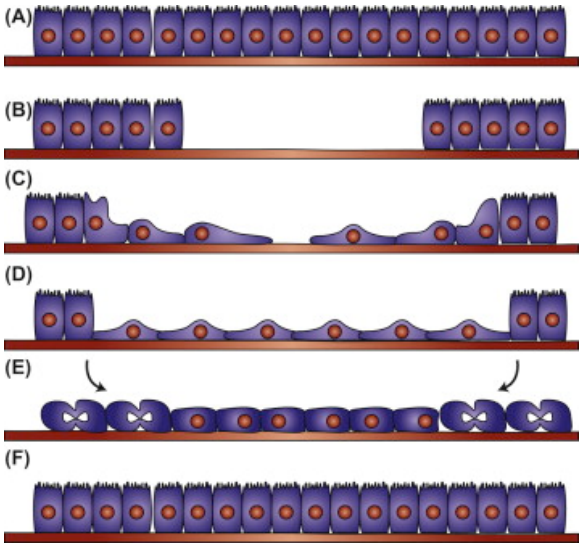
La cicatrisation de la muqueuse intestinale implique plusieurs processus (Figure 14) qui sont plus ou moins indépendants (D. Brent Polk and Frey, 2012). Lors que la muqueuse non endommagée (Figure 14A) subit une lésion qui desquame les cellules épithéliales (Figure 14B), le processus de la cicatrisation commence par la dépolarisation des cellules au bord de la lésion et la conversion en un phénotype migratoire (Figure 14C). Ensuite, les cellules s'aplatissent et migrent pour couvrir la zone dénudée afin de rétablir la barrière protectrice. Cette étape dure de plusieurs minutes à plusieurs heures en fonction de l'ampleur de la lésion (Figure 14D). Les cellules « leader » et « follower » migrent souvent ensemble comme une feuille, en maintenant les contacts rudimentaires pendant ce processus de restitution. La prolifération cellulaire repeuple ensuite l'épithélium (Figure 14E), permettant aux nouvelles cellules de reformer des jonctions serrées et de restituer le phénotype cylindrique typique des cellules de l'épithélium (Figure 14F).

4.4.2 Mécanismes de la migration cellulaire

La migration des cellules au bord de la lésion pour couvrir la zone lésée est une étape cruciale pendant le processus de la cicatrisation. La restitution ou la ré-épithélialisation rapide de la lésion permet de rétablir la barrière intestinale pour protéger l'organisme contre l'environnement extérieur.

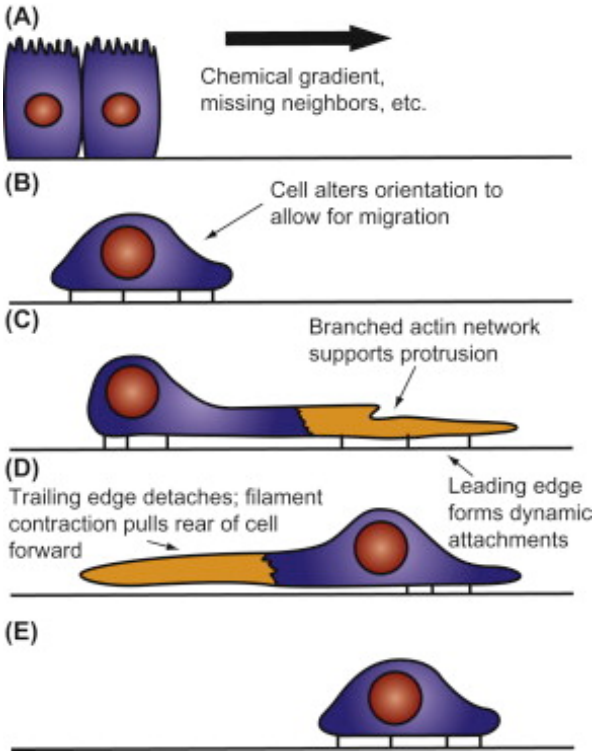
Suite à la perte des jonctions serrées entre les cellules épithéliales dans la zone de lésion (Figure 15A), les cellules autour des zones de lésion subissent une transformation rapide en perdant leur phénotype traditionnel. Pour ce faire, les cellules réorganisent leur cytosquelette en actine (Figure 15B), perdent leur bordure en brosse et l'orientation apicale/basolatérale, et montrent à la place une

Figure 14. Processus de la cicatrisation de la muqueuse intestinale.



Selon Polk, D.B. et Frey, M.R., Physiology of the Gastrointestinal Tract. 2012,(1):1147-1168.

Figure 15. Reptation lamellipode des cellules épithéliales.



Selon Polk, D.B. et Frey, M.R., Physiology of the Gastrointestinal Tract. 2012,(1):1147-1168.

apparence aplatie et plus large avec un nouveau type de polarisation (Buck, 1986; Feil et al., 1987; Lacy, 1988). Ce changement morphologique a été décrit comme la dédifférenciation ou la transition épithéliale – mésenchymateuse (EMT). Cependant, il serait plus précis de décrire ce phénomène comme un changement réversible de phénotype fonctionnel puisque les cellules regagnent leur morphologie épithéliale une fois que la lésion est recouverte. De fait, dans une étude récente (Znalesniak et al., 2009), les caractéristiques de la EMT ne sont pas clairement retrouvées lors que l'on compare le profil d'ARNm des cellules IEC-18 (cellules épithéliales issues de l'iléum de rat) en restitution migratoires à celui des cellules stationnaires (cellules témoin). Cette réorganisation intracellulaire est réalisée grâce à la modification de l'assemblage des filaments en actine du cytosquelette par les enzymes de la sous-famille Rho des petites GTPases : Rac, Rho et Cdc42 (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Fenteany et al., 2000).

La réorganisation du réseau d'actine permet dans un second temps l'apparition d'extensions de type lamellipode (Figure 15C), du bord de la lésion vers la zone dénudée. Ensuite, l'extension s'attache à la couche sous-jacente, permettant donc l'ancrage de l'extension lamellipode. Puis, la perte d'adhésion à l'arrière de la cellule (Figure 15D) permet la contraction et donc à la cellule de se rétracter, permettant à la cellule de se déplacer (Figure 15E). Un cycle de mouvement dit de reptation cellulaire est ainsi accompli. En d'autres termes, les cellules rampent vers la zone lésée afin de la refermer à l'aide de la répétition de ce cycle de mouvement (D. Brent Polk and Frey, 2012).

La reptation lamellipode n'est pas le seul mécanisme permettant la migration cellulaire. Le mécanisme « purse-string » a aussi été suggéré. Selon ce modèle, les cellules au bord de la lésion développent un faisceau d'actine, et la contraction des cellules permet la couverture de la lésion. Ce mécanisme a été rapporté pour la cicatrisation des cellules cancéreuse colorectales Caco-2BBe *in vitro* (Bement et al., 1993) et sur la cicatrisation de la cornée *in vivo* (Danjo and Gipson, 1998).

Différents mécanismes peuvent intervenir lors de la cicatrisation de l'épithélium intestinal. Les mécanismes semblent partiellement différents selon que l'on étudie l'intestin grêle ou le gros intestin. Les mécanismes précis impliqués en fonction des différentes situations physiopathologiques sont encore obscurs et il est probable que différents mécanismes puissent être actifs en fonction de la phase de cicatrisation d'une lésion donnée.

4.4.3 Phase de régénération

La restitution est suivie par une vague de prolifération cellulaire afin de repeupler la zone lésée et de permettre aux cellules aplaties de retrouver leur phénotype épithélial cylindrique. En effet, la phase de régénération est distincte de la phase de ré-épithélialisation en termes de temps et d'espace. *In vitro*, ces deux phases (ré-épithélialisation et régénération) semblent être contrôlées par des voies de signalisation différents en termes de facteurs de croissance et de protéines de matrice extracellulaire (Basson et al., 1992). La distinction en 2 phases est en accord avec les différents types de morphologie cellulaire observés pour chaque phase. De fait, les cellules arrondies typiques de la mitose sont peu à même d'être mobiles. De plus, les profils d'activation de kinases et d'expression de

gènes impliqués dans la migration et de la prolifération pourraient bien être incompatibles. En effet, il a été rapporté que les kinases ERK et p38 MAPK, stimulées par le facteur de croissance EGF, promeuvent la prolifération et la migration respectivement, et que l'activité de l'une des deux contrecarre celle de l'autre (Frey et al., 2004). Un autre facteur de croissance, le TGF-β, a également été décrit comme capable de stimuler la migration et d'inhiber la prolifération dans le modèle des cellules épithéliales iléales IEC-6 (Dignass and Podolsky, 1993; Ko et al., 1998). Il convient toutefois de souligner que ces résultats ont été observés sur les modèles *in vitro*, alors que la situation de cicatrisation *in vivo* est en réalité beaucoup plus compliquée. Toutefois, des études *in vivo* à la fin des années 80 montrent la migration rapide des cellules épithéliales intestinales suite à une lésion suivie par une vague de prolifération tardive ce qui confirme bien la dissociation entre la migration et la prolifération (Feil et al., 1989; Feil et al., 1987). Enfin, une étude *in vivo* beaucoup plus récente (Seno et al., 2009) utilisant un système de lésion aiguë de la muqueuse du côlon analogue à la technique de biopsie cutanée a montré également l'existence de deux phases distinctes lors de la cicatrisation ; la phase proliférative survenant seulement à partir du jour 2 post-lésion.

4.4.4 Réponses immunitaires

En réponse à une lésion tissulaire, un réseau de signalisations initie et maintient la réponse impliquée dans la réparation du tissu atteint. Cela implique l'activation et la migration dirigée des leucocytes : neutrophiles, monocytes et éosinophiles depuis le système sanguin vers les sites de lésion. Les mastocytes du tissu jouent aussi un rôle important en libérant des médiateurs nouvellement synthétisés et stockés (Coussens and Werb, 2002).

Les polynucléaires neutrophiles sont en général les premiers recrutés en réponse à l'inflammation aiguë. Ces cellules initient la cicatrisation de la lésion (Feiken et al., 1995; Hubner et al., 1996).

En réponse à la lésion tissulaire, les phagocytes mononucléaires (les progéniteurs des macrophages), migrent depuis le système sanguin et se différencient en macrophages dans le tissu. Ils migrent ensuite vers le site d'inflammation. Cette migration est guidée par de nombreux facteurs chimiotactiques, comme par exemple TGFβ, MIP1, TNFα et IL-1β. Le nombre de neutrophiles diminue lorsque la population de monocytes/macrophages se déploie dans la zone lésée. Une fois activés, les macrophages sont la source principale des facteurs de croissance et des cytokines (TGF-β1, PDGF, bFGF, TGFα, IGF-I et -II, TNFα et IL-1), qui modulent la cicatrisation tissulaire (Coussens and Werb, 2002).

4.4.5 Cicatrisation de la muqueuse et bénéfice thérapeutique

L'importance de la cicatrisation de la muqueuse est de plus en plus reconnue et considérée comme une cible thérapeutique majeure que ce soit dans la pratique clinique des MICI ou dans les études cliniques pour évaluer l'efficacité des nouveaux traitements (Dave and Loftus, 2012; Pineton de Chambrun et al., 2010)

Encore récemment, le but du traitement des MICI était d'induire et de maintenir l'amélioration des symptômes ou de la rémission dans le meilleur des cas. Cependant, ces traitements ne modifient pas l'évolution et l'issue naturelle à long-terme des MICI (Rutgeerts et al., 2007). Les publications récentes ont montré une corrélation entre le degré de cicatrisation de la muqueuse et une évolution plus favorable des MICI (Froslie et al., 2007; Peyrin-Biroulet et al., 2011; Pineton de Chambrun et al., 2010). De fait, chez les patients atteints de MC et de RCH, la cicatrisation de la muqueuse est associée avec moins de rechutes, d'hospitalisations, de recours à la chirurgie et de lésions intestinales graves (fistules) pour la MC ; et réduit le risque du cancer colorectal chez les malades atteints de la RCH (Peyrin-Biroulet et al., 2011).

Définition de la cicatrisation de la muqueuse

En théorie, la cicatrisation de la muqueuse peut être définie comme la cicatrisation endoscopique complète de toute lésion inflammatoire et ulcérative de la muqueuse intestinale dans le cadre de la MC et de la RCH (Pineton de Chambrun et al., 2010).

En pratique, il n'y a pas encore de définition validée sur ce que constitue véritablement la cicatrisation de la muqueuse pour les MICI (D'Haens et al., 2007; Sandborn et al., 2002). Une conférence de consensus international a proposé en 2007 la définition de la cicatrisation de la muqueuse pour la RCH comme l'absence de friabilité, de sang, d'érosions et d'ulcères dans tous les segments visualisés de la muqueuse de l'intestin (D'Haens et al., 2007). Pour la MC, il a aussi été proposé une définition de la cicatrisation de la muqueuse qui inclut l'absence d'ulcères. En terme simple, la cicatrisation de la muqueuse est l'absence de lésions visibles. Cependant, les experts ont considéré ces définitions comme des « prises de position » qui nécessitent d'être validées et standardisées (D'Haens et al., 2009).

4.5 Modèle expérimental : colite induite par le DSS

Afin d'étudier la pathogénèse et la physio-pathologie des MICI et tester l'efficacité d'agents thérapeutiques et/ou nutritionnels dans les études précliniques, il existe une dizaine de modèles de MICI expérimentales sur animaux, dont la colite induite par le DSS (Dextran Sodium Sulfate). Chez les rongeurs, c'est un modèle largement utilisé (plus de 1500 références sur Pubmed) en raison de ses similarités avec les MICI humaines, sa simplicité d'utilisation et la relativement bonne reproductibilité des lésions coliques (Elson et al., 1995).

Le premier article qui rapporte l'utilisation du DSS date de 1985 chez le Hamster (Ohkusa, 1985). Le DSS est actuellement beaucoup utilisé chez la souris ou le rat. Le DSS est un polysaccharide sulfaté, qui est administré aux animaux dans l'eau de boisson. Le poids moléculaire du DSS, qui varie beaucoup selon le fournisseur, est un facteur important pour induire la colite (Kitajima et al., 2000). Les souris traitées par du DSS de 40 kDa développent une colite dans le côlon médian et distal, alors

qu'avec le DSS de 5 kDa, les souris développent des lésions dans le caecum et le côlon proximal (Kitajima et al., 2000).

En plus du poids moléculaire, la concentration, la durée et la fréquence d'administration (cyclique ou pas) peuvent beaucoup influencer la colite induite, qui peut être aiguë ou chronique, voire dysplasique. En plus des facteurs liés au DSS, d'autres facteurs comme la susceptibilité génétique de l'animal (sexe, espèce, souche) (Melgar et al., 2005), le microbiote intestinal (Sellon et al., 1998) et les conditions d'hébergement sont susceptibles d'influencer l'induction de la colite. Le stress joue également un rôle (Melgar et al., 2008).

Les caractéristiques cliniques et histologiques de la colite induite par le DSS ressemblent à celles des MICI observées chez les humains. Les signes cliniques sont : la perte de poids, la diarrhée, la présence de sang dans les fèces, l'anémie, voire la mort. Les caractéristiques histologiques dans la phase aiguë de la colite sont : la perte de l'architecture des cryptes, l'infiltration des neutrophiles dans la lamina propria et la sous-muqueuse, la cryptite, l'abcès de crypte, les œdèmes, et l'apparition d'ulcération voir d'érosion (Cooper et al., 1993; Kullmann et al., 2001).

Le mécanisme par lequel l'administration du DSS induit la colite est supposé être lié à son effet sur l'osmolarité du contenu luminal colique, à sa toxicité vis-à-vis des cellules épithéliales coliques et à ses effets délétères sur l'intégrité de la barrière intestinale. Il a été rapporté que dans ce modèle, l'expression de protéines des jonctions serrées est diminuée (Poritz et al., 2007) et que la perméabilité colique est augmentée par le DSS (Yan et al., 2009). Une étude très récente a trouvé que le DSS peut former des nano-vésicules avec les acides gras à chaîne moyenne qui sont présents dans la lumière colique et ce nano-lipocomplexe est capable de fusionner avec la membrane cellulaire des colonocytes, et donc de pénétrer dans le cytoplasme, induisant ainsi l'activation des voies de signalisation inflammatoires (Laroui et al., 2012). Il est également possible que le DSS puisse être un précurseur de sulfure d'hydrogène dans le contenu colique.

La colite induite par le DSS est associée avec une augmentation de différentes cytokines et chemokines. En effet, les expressions de gènes des cytokines TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, IFNγ et des chemokines KC et MIP-2 sont augmentées chez la souris C57BL/6 ayant été traitées avec du DSS à 3,5% pendant 5 jours (Yan et al., 2009). Leurs expressions diminuent progressivement après l'arrêt du DSS, mais restent à un niveau élevé. L'activité de la MPO, qui est utilisée comme marqueur de l'inflammation, est également augmentée et reste à un niveau élevé 9 jours après l'arrêt du DSS (Yan et al., 2009). Il a été rapporté que le modèle DSS est caractérisé, sur la base de la mesure des cytokines, par des profils T_H1 et T_H2 (Dieleman et al., 1998). Une autre étude plus récente montre que le modèle de colite induite par le DSS présente un profil de réponse immunitaire du type T_H1 (IFNγ), mais ne présente pas de profil du type T_H17 (Kim et al., 2011).

Messages clé:

- ✓ Les MICI ont une incidence relativement élevée dans les pays industrialisés mais aussi une incidence croissante dans les pays émergents.
- ✓ La génétique, l'environnement et l'interaction microbiote-immunité semblent être des facteurs qui participent au déclenchement de ces maladies.
- ✓ La MC et la RCH sont les 2 formes majeures de MICI.
- ✓ Il n'y a pas de traitement curatif des MICI, qui sont caractérisées par une alternance entre les rémissions et les rechutes, mais des traitements symptomatiques.
- ✓ La cicatrisation de la muqueuse intestinale émerge et s'impose de plus en plus comme une cible dans le traitement et les études cliniques.
- ✓ Le modèle de colite induite par le DSS sur les murins est largement utilisé pour sa simplicité, sa reproductibilité et une certaine homologie avec les MICI humaines.

Travaux personnels

5 Article 1 : Un régime riche en protéines modifie le microbiote colique et l'environnement luminal mais pas le métabolisme des colonocytes dans le modèle rat: la connection [#]

[#]***Article soumis au American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology le 21 novembre 2013.***

Une alimentation riche en protéines par rapport aux apports nutritionnels conseillés est largement répandue dans les pays industrialisés. Avec le développement économique, les populations des pays émergents adoptent un mode de vie de plus en plus occidentalisé. Cependant, la limite maximale non délétère de l'apport en protéines reste encore inconnue. La consommation de régimes riches en protéines augmente les quantités de protéines et peptides qui passent la jonction iléo-caecale et fournit donc des substrats supplémentaires aux milliards de bactéries faisant partie de notre microbiote colique.

La manière dont les facteurs environnementaux, comme l'alimentation, modulent le microbiote intestinal chez l'Homme reste obscure. Les études nutritionnelles chez l'animal sont susceptibles de nous éclairer sur cette problématique. Au moment où cette thèse a été entreprise, il existait très peu de données à propos des effets d'un régime hyperprotéique sur l'écosystème colique (microbiote, colonocytes) et peu de données sur les conséquences au niveau intestinal de la consommation de tels régimes.

L'utilisation de ces protéines et acides aminés par le microbiote conduit à la production des métabolites bactériens, tels que les AGCC, acétate, propionate et butyrate principalement ; mais aussi les iso-acides gras à chaîne courte (ou acides gras à chaîne branchée) qui sont produits par les bactéries du microbiote exclusivement à partir de certains acides aminés. Le butyrate est un substrat énergétique préférentiel des colonocytes, et a de nombreux effets sur ces cellules et la physiologie colique. Cependant, les transporteurs des AGCC au niveau des colonocytes ont été encore relativement peu étudiés en situation d'interventions nutritionnelles.

La présente étude a pour objectif d'évaluer l'influence d'un régime riche en protéines sur la composition et la biodiversité du microbiote et sur le métabolisme des colonocytes.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons utilisé le rat mâle de souche Wistar comme modèle animal. Les animaux ont été nourris soit avec un régime hyperprotéique (53% de protéines), soit avec un régime témoin isocalorique normoprotéique (14% de protéines) pendant 15 jours. Au moment du sacrifice, le contenu luminal du gros intestin (caecum et côlon) a été récupéré pour mesurer la composition du microbiote, la teneur en acides organiques et en acides gras à chaîne courte (AGCC) ;

ensuite, les colonocytes ont été isolés à partir du côlon pour mesurer l'expression des transporteurs d'AGCC et l'oxydation de butyrate.

Les résultats que nous avons obtenus montrent des changements dans la composition et dans la diversité du microbiote du gros intestin des rats après l'ingestion du régime hyperprotéique, ainsi que des modifications marquées des quantités d'acides organiques et d'AGCC produits par le microbiote. Cependant, l'expression des transporteurs d'AGCC dans les colonocytes n'est pas modifiée, ni la capacité d'oxydation du butyrate par ces derniers. Comme attendu, les animaux ayant suivi le régime hyperprotéique ont pris moins de poids par rapport aux animaux contrôle, mais leur perte en AGCC dans les fèces est deux fois plus importante.

En conclusion, nous pouvons suggérer que dans le cas du régime hyperprotéique, il y a un transfert de protéines et peptides de l'intestin grêle vers le gros intestin où ces composés sont dégradés et fermentés par le microbiote avec au bout de chaîne plus de production d'AGCC, métabolites terminaux. La composition et la diversité du microbiote sont modifiées par le régime hyperprotéique mais les concentrations d'AGCC sont maintenues dans le contenu luminal du gros intestin ; ceci en raison d'une augmentation quasi proportionnelle de la masse des contenus coliques. Il en résulte une homéostasie du métabolisme du butyrate dans les colonocytes. Cet acide gras à chaîne courte est connu pour jouer un rôle central dans le renouvellement de l'épithélium du gros intestin.

High protein diet modifies colonic microbiota and luminal environment but not colonocyte metabolism in the rat model: The increased luminal bulk connection

Xinxin Liu[1], Jean-Marc Blouin[1], Arlette Santacruz[2], Annaïg Lan[1], Mireille Andriamihaja[1], Sabina Wilkanowicz[2], Pierre-Henri Benetti[1], Daniel Tomé[1], Yolanda Sanz[2], François Blachier[1]* and Anne-Marie Davila[1]*

[1]UMR914 INRA/AgroParisTech, Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, Paris, France.

[2]Microbial Ecophysiology and Nutrition Research Group, Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA), Spanish National Research Council (CSIC), Valencia, Spain.

*Corresponding authors: davila@agroparistech.fr; francois.blachier@agroparistech.fr; Tel. +33144088676/+33144088675; Fax. +33144081858.

Running Title

High protein diet and large bowel

Abstract

High-protein diets are used for body weight reduction but consequences on luminal environment and on colonocyte metabolism are poorly known. Here, rats were fed for 15 days with either a normoproteic diet (NP, 14% protein) or a hyperproteic isocaloric diet (HP, 53% protein). Cecum and colon were recovered for analysis. Short- and branched-chain fatty acids, as well as lactate, succinate, formate and ethanol contents were markedly increased in the colonic luminal content of HP rats ($p<0.05$ or less) but to a lower extent in the cecal luminal content. This was associated with reduced concentrations of the *C.coccoides* and *C.leptum* groups and *F.prausnitzii* in both the cecum and colon ($p<0.05$ or less). In addition, the microbiota diversity was found to be higher in the cecum of HP rats while this parameter was lower in the HP colon when compared with NP rats. In HP rats, the colonic and cecal luminal content weights were markedly higher than in NP rats ($p<0.001$). Thus similar butyrate, acetate and propionate concentrations were calculated in the colonic luminal content. Accordingly, the expression of MCT1 and SMCT (which is increased by higher butyrate concentration) as well as the colonocyte capacity for butyrate oxidation were not modified by the HP diet; while the amount of butyrate in feces was increased ($p<0.01$). The lost of energy in feces allowing homeostasis of butyrate metabolism in colonic epithelial cells despite modified luminal environment following HP diet consumption is discussed.

Keywords

High protein diet, microbiota, short chain fatty acids, transport, metabolism.

Introduction

High-protein (HP) diets are commonly used for body weight loss (35, 37). In fact, such diets have been shown to increase satiety, to modify lipid metabolism and to facilitate short- and middle-term weight reduction (24, 57, 67). However, the consequences on gut microbiota composition, on microbial-derived metabolites in the large intestine luminal content, and on colonocyte epithelial cell metabolic capacities have been little studied.

Increasing protein intake induces an increase in the proportion of nitrogenous compounds – mainly protein, peptides and to a lesser extent amino acids - entering the large intestine (13, 23, 25, 48, 60). They are subjected to luminal proteolysis and subsequent metabolism by the large number of microorganisms of the large intestine microbiota (about 10^{11} to 10^{12} viable bacteria per g content) (29) leading to the production of numerous amino acid-derived metabolites (8, 26, 32) including phenols, indoles, amines, sulfide, ammonia and monocarboxylic acids. Monocarboxylic acids include short-chain fatty acids (SCFA), branched-chain fatty acids (BCFA) and several other organic acids. In contrast to SCFA which are produced from indigestible carbohydrates, other metabolites such as BCFA are produced by the microbiota exclusively from amino acids (51). Changes in diet composition may affect the composition and metabolic activities of the microbiota that adapts to the new colonic luminal environment and substrate availability. Phyla composing the microbiota are known to be quite stable over the life, but the dietary composition influences the repartition of species and functional groups (65). This has been particularly documented for carbohydrates, fibers and more recently for fat-rich diets (27, 28, 47). In contrast few studies have addressed the influence of protein-rich diet on the composition and activity of the gut microbiota (8).

The colonic luminal environment may influence colonic epithelial cell metabolic capacities. SCFA and other monocarboxylic acids like lactate are absorbed from the lumen to the colonocyte cytosol by transport processes involving the monocarboxylate transporter 1 (MCT1), the protein CD147 (that participates to the apical expression of MCT1), and the sodium monocarboxylate transporter 1 (SMCT1) (11, 53). The absorbed components are partly metabolized mainly through oxidation pathways and used as energy substrates by colonic epithelial cells, the unmetabolized fractions being recovered in the portal blood plasma and used by other tissues (3, 18). These bacterial metabolites, and particularly butyrate, are involved in numerous processes regarding colonocytes metabolism and physiology including expression of MCT1 (10, 16), sodium-dependent fluid absorption (6), cell

proliferation (20), histone acetylation and gene expression (1, 20). Indeed, butyrate is considered as the preferential oxidative substrate for colonocytes (19, 54). In contrast with butyrate and propionate, which are mainly metabolized by the intestinal mucosa and liver, acetate is recovered in significant amount in the systemic blood (18).

The present study aims at evaluating the influence of HP diet on the composition of the intestinal microbiota, on the composition of SCFA, BCFA and other organic acids in cecal and colonic contents and on putative modifications of energy metabolism in colonic epithelial cells. The central role of butyrate on colonocyte physiology suggests the necessity of an exquisite regulation of butyrate availability for both energy production and gene expression in these cells (1, 2, 34, 58, 61). Thus, we evaluated if the modifications of the gut ecosystem following high protein diet ingestion is associated with metabolic changes towards butyrate (and other energy substrates) in isolated colonic epithelial cells, or if conversely, metabolic homeostasis is maintained in these cells after such a dietary modification.

Materials and Methods

Animals, diets and colonocyte isolation

Wistar male rats (150g) were acclimatized for 6 days to receive a standard rodent diet containing 16% (w/w) protein. Then they were randomly allocated to either NP diet containing 14% (w/w) protein or HP isocaloric diet (by decreasing digestible carbohydrates) containing 53% (w/w) protein (Table 1). After 15 days of experimental diet, animals were anesthetized with pentobarbital sodium (40 mg/kg body weight) and total cecal and colonic luminal contents were collected by expulsion. Luminal contents (0.2 g) were taken after homogenization for bacterial DNA extraction and the remaining was frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C for subsequent analysis. The whole colon was used for colonocyte isolation using the perfusion method with EDTA as described (49). The present protocol received written agreement from the local animal ethical committee (COMETHEA at Jouy-en-Josas, France, N° 11/042 and N°12/090).

Bacterial DNA extraction

Bacterial DNA extraction of fresh cecal and colonic luminal contents was performed with QIAamp® DNA Stool Mini kit (Qiagen). The DNA concentration and purity were measured with Nanodrop®. The

DNA integrity was confirmed by electrophoresis on agarose gel with Gelred™ staining. Extracted bacterial DNA was normalized to 30 ng/µl for subsequent real-time qPCR assay.

Analysis of microbiota composition by real-time qPCR

The main bacterial groups of the intestinal microbiota were quantified by real-time qPCR using specific primers (Table 2A) and SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics) in a LightCycler® 480 instrument (Roche Diagnostics) as previously described (55*)*. The bacterial groups included total bacteria, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* group*, Bacteroides fragilis* group, *C. coccoides* group, *C.leptum* group, *Enterobacteriaceae*, *Desulfovibrio* spp. and *F. prausnitzii*. Standard curves of each bacterial group were generated from serial dilutions of a known copy number of the target gene cloned into a plasmid vector. For each reference strain, the 16S rRNA gene was cloned into a pGEM-T Easy Vector System (Promega). An *E. coli* strain was transformed with the recombinant plasmid and plasmid DNA was extracted from *E. coli* by the miniprep method.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

PCR amplifications with universal primers and DGGE analysis were performed as described (56). Renyi's entropy (diversity profile) was used to explore differences in bacterial species detected by DGGE and DNA sequencing between the different diets. The formula of Renyi's entropy is:

$$H\alpha = \frac{\ln(\sum_{i=1}^{S} P_i^{\alpha})}{1-\alpha}$$

where S is the number of species in the sample and P_i is the proportion of the species i in the sample. Diversity profiles are calculated by changing the value of α from 0 to infinity. Their graphical display provides diversity ordering of samples. A sample profile always above the profile of another sample indicates a higher diversity. The shape of the profile is an indication of evenness. The flatter the curve is, the higher the evenness is. Renyi's entropy also provides information on three further diversity index values: species richness (S) for α=0, Shannon index (H´) for α=1 and Simpson index (1-D) for α=2. (64).

Analysis of SCFA, BCFA and other organic acids in luminal contents and in feces

Cecal and colonic contents recovered at the sacrifice were immediately weighted. The feces were recovered during the 3 days before sacrifice. All the organic acids and ethanol were extracted from contents and feces by vigorous homogenization with diluted ultra-pure water followed by centrifugation

(14 000 g, 15 min at 4°C). The SCFA and BCFA in the supernatants were then derivatized by esterification and analyzed with a gas chromatograph equipped with a capillary column (30 m, 0.32 mm ID, RestekRtx 502.2) and fitted with a flame ionization detector using a modification of the method of Kristensen et al. (38). The amounts of SCFA and BCFA were determined by external standards with reference to internal standards. Formate, L- and D-lactate, succinate and ethanol were measured in cecal and colonic samples using the Megazyme® biochemical assay kits (Megazyme) according to manufacturer's instructions. To calculate the percentages of ingested energy lost in feces as SCFA, we used the corresponding values as defined by Livesey and Elia (41) with acetate representing 3.48 kcal/g, propionate representing 4.93 kcal/g and butyrate representing 5.92 kcal/g.

Metabolic assays in isolated colonocytes

Isolated colonocytes were resuspended in Krebs–Henseleit bicarbonate buffered medium (pH 7.4), enriched with 10 mg/mL BSA. The incubation medium was equilibrated against a mixture of O_2/CO_2 (19/1, v/v). D-glucose, L-glutamine, n-butyrate and L-lactate oxidation by isolated colonocytes was carried out at 37°C in the incubation medium containing 5 mM D-glucose containing tracer amounts of D-(1-^{14}C)-glucose or 1 mM L-glutamine containing tracer amount of L-(U-^{14}C) glutamine or 2 mM sodium butyrate containing tracer amount of n-(1-^{14}C) butyrate (sodium salt) or 2 mM L-lactate containing tracer amount of L-(U-^{14}C)-lactate. The incubation was stopped with perchloric acid (3% final concentration) and radioactive CO_2 was measured by liquid scintillation after trapping in methylbenzethonium hydroxide. Lactate production by colonocytes from 5mM D-glucose was determined in the incubation medium using a colorimetric system as described by the manufacturer instructions (Biovision/Clinisciences, France).

Gene expression analysis in colonocytes

Total RNA was extracted from isolated colonocytes using Trizol extraction derived from the method of Chomczynski and Sacchi (14). A subsequent step of DNase and purification was done with the RNeasy Mini Kit and DNase I (Qiagen). Then sample quality was controlled by 260/280 nm absorption ratio measured with Nanodrop® (between 1.8 and 2.0) and checked on 1% agarose gel. For real-time RT-PCR analyses, 1 µg total RNA was first reverse transcribed using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems). Reverse transcribed RNA (5 ng of cDNA) were amplified on a thermal cycler (ABI prism 7900 HT, Applied Biosystems) using the SYBR green fluorescence method and specific primers (Table 2B). Results were analyzed with the SDS 2.1 real time detection system software.

157 Quantification of RNA was carried out by comparison of the number of cycles required to reach
158 reference and target threshold values (δ-δCt method) and was normalized using Ribosomal Protein
159 L13a (*Rpl13a*) mRNA.

160 **Western blot analysis of MCT1 and SMCT1 in colonocytes**

161 The cell surface expression of MCT1 and SMCT1 was achieved using the cell surface protein isolation
162 kit (Pierce Biotechnology). Briefly, surface proteins of isolated colonocytes were biotinylated with the
163 membrane-impermeant reagent Sulfo-NHS-LC-Biotin during 30 min at 4°C. The reaction was
164 quenched and after a washing step, membrane proteins were solubilized by incubation in Triton X-100
165 containing buffer. Biotinylated proteins were bound to ImmunoPure immobilized streptavidin (Pierce),
166 washed 3 times, and then dissolved in Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8 with 50 mM DTT.
167 Equal amounts of protein were loaded onto 4–12% NuPAGENovexBis-Tris gel (Invitrogen) and run
168 using 1x NuPage MES buffer. The XCellSureLock Mini Cell (Invitrogen) was used for electrophoresis.
169 Protein was then transferred to Hybond ECL membranes which were blocked for 2 h at room
170 temperature using 1x TBS (pH 7.5), 0.05% Tween 20, and 5% [w/v] non-fat dry milk and incubated
171 overnight (4°C) with polyclonal antisera raised against rat MCT1 (Millipore, 1:5000) or rat SMCT1
172 (Santa Cruz Biotechnologies, 1:500) diluted in 1x TBS (pH 7.5), 0.05% Tween 20 and 5% [w/v] BSA.
173 Nitrocellulose membranes were then washed with 1x TBS, 0.05% Tween 20 and incubated for 1h at
174 room temperature with horseradish peroxidase–linked secondary antibody anti-chicken IgG to reveal
175 MCT1 or anti-goat to reveal SMCT1. Bound antibody was visualized using ECL (Enhanced
176 ChemiLuminescence) system according to the manufacturer instructions (Pierce Biotechnology).

177 **Immunofluorescence analysis of MCT1 and SMCT1 in colon**

178 For immunohistochemical studies, segments of colon were immediately fixed in 4% paraformaldehyde
179 and embedded in paraffin. Four micrometer tissue sections were subjected to deparaffinization and
180 washed with TBS plus 0.025% Triton X-100. Non-specific binding sites were then blocked for 2h at
181 room temperature with TBS plus 1% BSA and 10% normal serum. Then the sections were incubated
182 with MCT1 antibody (1:500) and SMCT1 antibody (1:100) diluted in TBS plus 1% BSA in a humidified
183 chamber at 4 °C overnight. Subsequently, the sections were washed 2 times in TBS plus 0.025% and
184 exposed for 1 hour to AlexaFluor 488 conjugated secondary antibodies diluted in TBS plus 1% BSA.
185 After washing in TBS, sections were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Lab).
186

Statistical analysis

The results are expressed as mean values ± SEM. Statistical analyses were performed by using SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Rats' body weight and food intake analysis were performed using the mixed model for repeated-measure analysis and the differences between NP and HP groups at each time point are revealed by Tukey post hoc test. The Welch's t-test was used to compare two groups. The difference in microbiota composition was analyzed by Mann-Whitney-Wilcoxon test. The prevalence of bacterial species identified by PCR-DGGE was analyzed by Fisher's test. Differences with p values < 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Body weight gain and weight of the cecal and colonic contents

Differences in rats weight gain of the HP group compared to the NP group was significantly more marked in the 2nd half period of diet intervention (Figure 1A), whereas the differences in their daily food intake were more marked in the 1st half period (Figure 1B). The weight of the cecal and colonic luminal contents was increased by 136% and 172% respectively in HP animals when compared with NP animals (Figures 1C and 1D).

Microbiota composition,biodiversity and species prevalence

The results of the effects of the HP diet on gut microbiota composition determined by real time PCR are shown in Table 3. The total bacterial concentration was slightly but significantly decreased (1.3 fold) in the colon of HP animals when compared to NP animals. However, total bacterial concentrations detected in the cecal luminal content were similar between NP and HP animals. *C. coccoides* group gene copy numbers had a 4.3 fold and 1.6 fold decline in cecum and colon of HP animals, respectively, compared to NP diet. A marked decrease of *C. leptum* group gene copy numbers was also detected in cecum and colon of HP group with respectively 2.2 and 3.4 fold change comparing to NP animals. Finally *F. prausnitzii* gene copy numbers were dramatically decreased in both cecum (2.3 fold) and colon (4.6 fold) after HP diet. The concentrations of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* group, *Bacteroides frafilis* group, *Enterobacteriaceae* and *Desulfovibrio* spp. did not differ significantly between the HP and NP groups.

Bacterial community fingerprint in the cecal and colonic luminal content was analysed by PCR-DGGE. The DNA banding pattern obtained was used to determine the species diversity with the Renyi's entropy (Figure 2). HP diet consumption when compared to NP diet increased diversity, richness and evenness in cecum. By contrast, HP diet consumption decreased diversity and richness in colon, but had no effect on evenness. Whatever the diet, gut microbiota displayed greater diversity and richness in cecal contents than in colonic contents. With NP diet, eveness was lower in cecum than in colon. With HP diet, eveness became similar in cecum and colon.

The assignment of PCR-DGGE bands to bacterial species (Table 4), shows an increased number of different bacterial species identified by PCR-DGGE (> 90% identity in the GenBank using the BLAST algorithm) in cecal content than in colonic content. Several of these bacterial species had significant higher or lower prevalence with the HP diet depending on the bacterial species. *Clostridium* sp. had significantly lower prevalence (0%) in both colonic and cecal contents with the HP diet than with the NP diet. These results are consistent with that obtained by the absolute quantification by real-time PCR, where 2 important groups of *Clostridium* were decreased. *Bacteroides vulgatus* was also identified in both cecal and colonic contents, with an increased prevalence after the HP diet only in cecal content. The prevalences of *Bacteroides dorei* and *Fusobacterium* sp. were different according to the diet, and opposite depending on the large intestine segment considered. Indeed, their prevalences increased significantly in cecal content, whereas in colonic content their prevalence decreased. *Escherichia coli* was identified only in cecal content, where its prevalence was significantly lower in HP than in NP fed animals.

Organic acids in cecal and colonic luminal contents

The total quantity of organic acids in the luminal contents mainly follows the mass of the luminal content. When calculating their quantity in the whole cecal content, the total amount of acetate, isobutyrate, isovalerate, formate and succinate was significantly higher whereas the total amount of L-lactate, D-lactate and ethanol was not significantly different in the HP group compared to the NP group, respectively (Figures 3A, 3B and Table 5). For the quantity in the whole colonic content, the total amount of acetate, propionate, butyrate, valerate, isobutyrate, isovalerate, L-lactate, D-lactate, succinate and ethanol was significantly higher except formate in the HP group compared to the NP group, respectively (Figures 3C, 3D and Table 5). However, when these results were expressed as

concentrations in cecal and colonic luminal contents, the concentrations of SCFA were not significantly different after HP diet comparing to NP diet (Table 6).

In the feces, the total quantity in acetate, propionate and butyrate recovered for the 3 last days was 1.9, 2.6 and 2.1 fold higher for HP animals compared to NP animals, respectively (Figure 3E). In Figure 3F are represented the relative amounts of energy lost as SCFA in feces expressed as percentages of energy intake.

Energy substrate metabolism and expression of monocarboxylic and sodium transporters in isolated colonocytes

As indicated in Figure 4A, the oxidation of butyrate was not significantly different in colonocytes isolated from NP and HP animals, neither the oxidation of the substrates originating from blood, i.e. L-glutamine and D-glucose. Furthermore, the production of L-lactate from D-glucose in isolated colonocytes was similar in NP and HP animals (241±27 and 232±42 nmol/mg protein/30 min respectively, n=9 in each experimental group). Lastly, the oxidation of L-lactate was found to be also similar in colonocytes from NP and HP animals averaging respectively 3.41±0.87 and 4.44±1.87 nmol/mg protein/30 min (n=3 in each experimental group).

As indicated in Figure 4B, the mRNA level of the two monocarboxylic acid transporters *Mct1* and *Smct1*, as well as that of *Cd147* (CD147 involved in the apical expression of MCT1 participating in the transport of monocarboxylic acids in colonic epithelial cells) were not significantly different between NP and HP groups. As shown in Figure 4C, using western blot analysis of cell membrane proteins recovered from colonocytes isolated after NP and HP diet consumption, the amounts of MCT1 and SMCT1 were similar in both groups of animals. Lastly, by visualizing MCT1 and SMCT1 using immunofluorescence technique, our results indicate similar immuno-localization of both monocarboxylic acid transporters in NP and HP colonocytes (Figure 4D).

Discussion

The results obtained in the present study clearly indicate that rats, after the consumption of the HP diet compared to the NP diet, were characterized in the large intestine by an increase in the mass of its luminal content, a shift in microbiota composition, and marked changes in the amount of organic acids particularly in the colon.

Analysis of bacterial biodiversity with PCR-DGGE strongly suggests that the gut microbiota is deeply reshaped following HP diet ingestion. The fluctuations of biodiversity markers (diversity and richness) suggest changes at species level resulting from adaptation of the microbiota to the new intestinal environment created by the HP diet. The large intestine microbiota of rats submitted to HP diet had to cope with the increased proportion of protein while ensuring the energetic stability of the ecosystem. For instance, HP diet increased the prevalence of *Bacteroides vulgatus* in cecum. It is known that *Bacteroides* are one of the gut colonizers that obtain the energy from amino acid fermentation contributing to SCFA generation (30) and the *Bacteroides* enterotype has also been recently associated with increased intake of dietary protein in humans (70). In both segments of the large intestine, gene copy numbers of *C. coccoides* group, *C. leptum* and *F. prausnitzii* (a major member of the *C. leptum* group) were significantly decreased. The HP diet did not change the other bacterial groups analysed, but in colon the gene copy numbers of total bacteria were slightly but significantly decreased under the HP diet. The changes in clostridia are important since these clusters account for more than 90% of *Firmicutes*, which is one of the two main phyla colonizing the human gut (21). Some butyrate-producing bacteria are known to belong to the clostridial cluster XIVa and *C. coccoides* group (4), and *F. prausnitzii* is also considered as a butyrate-producing bacteria (42). The reduction of these bacterial group numbers in response to low carbohydrate diets has also been related to reduction in SCFA generation in humans. More recent studies of the fecal microbiota of human vegetarian and omnivorous have also reported that the butyryl-CoA-transferase gene, which is associated with microbial butyrate production, highly correlated with *Clostridium* cluster XIVa and *Roseburia-E. rectale* abundance and to a lesser extent with *C. leptum* and *F. prausnitzii* abundance and with crude fiber intake (36). The fact that in the present study, these bacteria were decreased after HP diet consumption at expenses of carbohydrates is coherent with previous studies. However, the understanding of the specific microbial groups involved in protein metabolism and their relation to SCFA generation in the large intestine is rather limited, and other taxa and genes may be switched on to take over the role that seems to be played by members of clostridial cluster XIVa under a high carbohydrate diet in the context of a high protein diet. However the enhancement of diversity, richness and evenness (which was found in cecum) is perceived as beneficial for microbial ecosystems while their reduction (which was found in colon) is considered as unfavourable. It is worth to note that the decrease of *C. leptum* and *C. coccoides* groups and *F. prausnitzii* in gut microbiota was previously

associated with active phase of inflammatory bowel diseases (63). In addition, anti-inflammatory effects of *F. prausnitzii* in the TNBS-induced colitis model were also reported (62). Then, it can be hypothesized that HP diet ingestion may create unfavorable luminal condition in terms of microbiota composition in the large intestine in case of subsequent inflammatory episode. Further work, out of the scope of the present study, is necessary to document this new working hypothesis.

HP rats showed a marked increase of the total content of almost all the measured monocarboxylic acids in the colon luminal content. In cecal content, the situation was not vastly different but less marked.

These results are compatible with the view that, despite lower food intake in the HP group, more proteins and then amino acid substrates were available to the microbiota in the large intestine for the synthesis of SCFA (from alanine, aspartate, glutamate, glycine, lysine, threonine), BCFA (from isoleucine, leucine, valine) and other organic acids (from deamination and fermentation of amino acids) (5, 17, 22, 43). This will correspond to a loss of amino acids for the host since the colonic epithelium (except in the neonatal period) cannot absorb a significant amount of amino acids. Among the 10 monocarboxylic acids which were markedly increased in colonic content, some of them (butyrate, acetate, propionate, and L-lactate) have been shown to represent important luminal oxidative substrates providing energy in the form of ATP for the colonic epithelial cells. In the case of succinate, this metabolite has been shown to be transported within the colonic mucosa (69) and to increase oxygen consumption in colonocytes (31). Since the large intestine epithelial layer is renewed within a few days (with important corresponding anabolic ATP-consuming pathways) (50), together with consumption of ATP by colonocytes through the membrane-bound ATPase involved in colonic electrolyte transport (7), ATP has to be synthesized at a rate matching its cellular utilization in order to maintain a constant ATP cell content, a necessary condition to maintain the viability of epithelial cells (40). The other monocarboxylic acids (valerate, isobutyrate, isovalerate, formate, and D-lactate), which have not been yet tested for their capacity to be oxidized in colonocyte, are present in much lower amounts than SCFA and succinate. Interestingly, the amount of ethanol in colonic content recovered from HP animals was markedly increased when compared with NP animals. It remains however to be determined if ethanol is absorbed through the colonic epithelium with or without metabolism during its transfer from the lumen to the bloodstream. Ethanol, succinate, formate, and lactate, as metabolic intermediates in microbiota metabolism, usually do not accumulate to any

substantial extent in the large intestine content. However, the production of these latter compounds can be increased under specific circumstances (33, 44).

Microbiota-derived energy substrates which are absorbed in the process of transfer from the intestinal lumen to the portal vein blood are available firstly for the liver and then, for some of them, for other peripheral tissues. In other words, transport from the lumen inside the colonocytes and further metabolism in these cells will primarily determine the amount of energy substrates available for liver and peripheral tissues in host. From this point of view, our results showing that the expression of the monocarboxylic acid transporters MCT1 and SMCT1 are not significantly modified after HP diet consumption represent strong evidence indicating similar capacities for luminal transport of energy substrates originating from the microbiota by the colonic epithelium. Another evidence in favour of similar transport of monocarboxylic acids in colonocytes from HP and NP animals originate from the calculation of SCFA concentrations in the colonic lumen. Indeed, when we calculate acetate. propionate and butyrate concentrations, they are not significantly different in the colonic lumen of NP and HP animals. Incidentally, the increased weight of the colonic luminal content can be largely explained by increased water retention after HP diet consumption (42). From these results, and the low-affinity Km value of butyrate transport in colonic epithelial cells (39), we can predict that transport of SCFA from the lumen to the colonocyte will be similar between HP and NP animals. In further support of this proposition, we found that colonocytes from HP and NP animals oxidized butyrate and lactate to the same extent. Since we found that, in colonocytes isolated from HP and NP animals, the oxidation of the substrates L-glutamine and D-glucose (originating from the arterial blood) are similar (as well as the conversion of D-glucose to lactate), our results indicate similar energy metabolism capacity of the colonocytes whatever the diet consumed.

The present results strongly suggest that the increase of the bulk of the colonic content induced by the protein-rich diet allows to maintain constant the concentrations of luminal energy substrates. Such a maintenance, in condition of modified luminal environment, is presumably important taking into account that, as suggested by previous studies (9, 59) the profile of luminal energy substrates available to colonic epithelial cells as well as metabolic characteristics of these cells play a major role in the control of processes such as cell proliferation/differentiation which are central for the epithelium renewal and its homeostasis. Since the capacity for SCFA transport and metabolism by the colonic epithelium after HP diet consumption remained unchanged, we predicted that a part of these luminal

362 energy substrates will be lost by the host (45). This was exactly what we observed with a more than
363 two fold increase of the amount recovered in the feces of HP animals when compared with NP
364 animals. However, in HP animals, the part of energy lost in feces as SCFA remains quite modest,
365 averaging approximately 0.1% of the energy ingested. A beneficial counterpart to amino acid and
366 energy wasting is likely related to the physiology of the colonic epithelium. Indeed, among SCFA,
367 butyrate plays a unique role by serving both as an energy substrate in colonocytes, and as a regulator
368 for intracellular gene targets including those involved in colonic epithelial cell proliferation and
369 migration (1, 68). Thus, the same butyrate transport and oxidation in mitochondria of colonocytes
370 recovered from HP and NP animals likely represents a way to maintain butyrate intracellular
371 concentration within a narrow range compatible with its action upon its targets including nuclear ones
372 related to the epigenetic regulation of gene expression (15, 66). Since the expression of the MCT1
373 transporter in the colonocyte brush-border membrane is sensitive to the butyrate concentration (10,
374 16), the maintenance of the luminal concentration of butyrate despite increased protein consumption
375 and butyrate production by the microbiota would thus allow maintaining metabolic homeostasis in the
376 colonic epithelium. Due to the complexity of metabolic reactions and inter-conversions involving
377 microbiota and its environment, further studies are necessary to better explain the taxonomic and
378 functional differences due to the HP diet that contribute to maintain metabolic homeostasis in colonic
379 epithelial cells.

Acknowledgements

The authors wish to warmly acknowledge Patrick Even for helpful discussion and Corine Delteil for technical help.

A.M. Davila and F. Blachier designed research; X. Liu, J.M. Blouin, A. Santacruz, S. Wilkanowicz, A. Lan, P.H. Benetti and M. Andriamihaja conducted research; X. Liu and J.M. Blouin analyzed data and performed statistical analysis; X. Liu, F. Blachier, Y. Sanz, A.M. Davila and D. Tomé wrote the paper. A.M. Davila and F. Blachier had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

388 **Literature cited**

389 1. **Andriamihaja M, Chaumontet C, Tome D, and Blachier F**. Butyrate metabolism in
390 human colon carcinoma cells: implications concerning its growth-inhibitory effect. *Journal of*
391 *cellular physiology* 218: 58-65, 2009.
392 2. **Archer SY JJ, Kim HJ, Ma Q, Mou H, Dasety V, Meng S, Hodin RA.** The histone
393 deacetylase inhibitor butyrate down regulates cyclin B1 gene expression via p21/WAF-1-
394 dependent mechanism in human colon cancer cells. *Am J Physiol* G696-G703, 2004.
395 3. **Bach Knudsen KE, Serena A, Canibe N, and Juntunen KS**. New insight into
396 butyrate metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society* 62: 81-86, 2003.
397 4. **Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, and**
398 **Flint HJ**. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut.
399 *Applied and environmental microbiology* 66: 1654-1661, 2000.
400 5. **Barker HA**. Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annual review of*
401 *biochemistry* 50: 23-40, 1981.
402 6. **Binder HJ**. Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. *Annual review*
403 *of physiology* 72: 297-313, 2010.
404 7. **Binder HJ, Sangan P, and Rajendran VM**. Physiological and molecular studies of
405 colonic H+,K+-ATPase. *Seminars in nephrology* 19: 405-414, 1999.
406 8. **Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, and Tome D**. Effects of amino acid-derived
407 luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino*
408 *acids* 33: 547-562, 2007.
409 9. **Boren J, Lee WN, Bassilian S, Centelles JJ, Lim S, Ahmed S, Boros LG, and**
410 **Cascante M**. The stable isotope-based dynamic metabolic profile of butyrate-induced HT29
411 cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* 278: 28395-28402, 2003.
412 10. **Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, and Dudeja PK**.
413 Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human
414 intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *Journal of cellular*
415 *biochemistry* 103: 1452-1463, 2008.
416 11. **Buyse M, Sitaraman SV, Liu X, Bado A, and Merlin D**. Luminal leptin enhances
417 CD147/MCT-1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco2-BBE. *The*
418 *Journal of biological chemistry* 277: 28182-28190, 2002.
419 12. **Cano PG, Santacruz A, Trejo FM, and Sanz Y**. Bifidobacterium CECT 7765
420 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet fed
421 mice. *Obesity (Silver Spring, Md* 2013.
422 13. **Chacko A, and Cummings JH**. Nitrogen losses from the human small bowel:
423 obligatory losses and the effect of physical form of food. *Gut* 29: 809-815, 1988.
424 14. **Chomczynski P, and Sacchi N**. Single-step method of RNA isolation by acid
425 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162: 156-159,
426 1987.
427 15. **Cuff M, Dyer J, Jones M, and Shirazi-Beechey S**. The human colonic
428 monocarboxylate transporter Isoform 1: its potential importance to colonic tissue homeostasis.
429 *Gastroenterology* 128: 676-686, 2005.
430 16. **Cuff MA, Lambert DW, and Shirazi-Beechey SP**. Substrate-induced regulation of
431 the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *The Journal of physiology* 539: 361-
432 371, 2002.
433 17. **Cummings JH, and Macfarlane GT**. The control and consequences of bacterial
434 fermentation in the human colon. *The Journal of applied bacteriology* 70: 443-459, 1991.
435 18. **Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, and Macfarlane GT**. Short
436 chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28: 1221-
437 1227, 1987.

19. **Darcy-Vrillon B, Morel MT, Cherbuy C, Bernard F, Posho L, Blachier F, Meslin JC, and Duee PH**. Metabolic characteristics of pig colonocytes after adaptation to a high fiber diet. *The Journal of nutrition* 123: 234-243, 1993.
20. **Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, and Bultman SJ**. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular cell* 48: 612-626, 2012.
21. **Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, and Relman DA**. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, NY* 308: 1635-1638, 2005.
22. **Elsden SR, and Hilton MG**. Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by clostridia. *Archives of microbiology* 117: 165-172, 1978.
23. **Evenepoel P, Claus D, Geypens B, Hiele M, Geboes K, Rutgeerts P, and Ghoos Y**. Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. *The American journal of physiology* 277: G935-943, 1999.
24. **Fromentin G, Darcel N, Chaumontet C, Marsset-Baglieri A, Nadkarni N, and Tome D**. Peripheral and central mechanisms involved in the control of food intake by dietary amino acids and proteins. *Nutrition research reviews* 25: 29-39, 2012.
25. **Gaudichon C, Bos C, Morens C, Petzke KJ, Mariotti F, Everwand J, Benamouzig R, Dare S, Tome D, and Metges CC**. Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology* 123: 50-59, 2002.
26. **Genell S, Gustafsson BE, and Ohlsson K**. Quantitation of active pancreatic endopeptidases in the intestinal contents of germfree and conventional rats. *Scand J Gastroenterol* 11: 757-762, 1976.
27. **Gibson GR, and Roberfroid MB**. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition* 125: 1401-1412, 1995.
28. **Gibson GR, Willems A, Reading S, and Collins MD**. Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. *The Proceedings of the Nutrition Society* 55: 899-912, 1996.
29. **Gibson JA, Sladen GE, and Dawson AM**. Protein absorption and ammonia production: the effects of dietary protein and removal of the colon. *The British journal of nutrition* 35: 61-65, 1976.
30. **Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, and Nelson KE**. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York, NY* 312: 1355-1359, 2006.
31. **Goubern M, Andriamihaja M, Nubel T, Blachier F, and Bouillaud F**. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *Faseb J* 21: 1699-1706, 2007.
32. **Gustafsson BE**. The physiological importance of the colonic microflora. *Scandinavian journal of gastroenterology* 77: 117-131, 1982.
33. **He T, Priebe MG, Harmsen HJ, Stellaard F, Sun X, Welling GW, and Vonk RJ**. Colonic fermentation may play a role in lactose intolerance in humans. *The Journal of nutrition* 136: 58-63, 2006.
34. **Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, and Hodin RA**. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *The Journal of nutrition* 132: 1012-1017, 2002.
35. **Johnstone AM**. Safety and efficacy of high-protein diets for weight loss. *The Proceedings of the Nutrition Society* 71: 339-349, 2012.

36. **Kabeerdoss J, Devi RS, Mary RR, and Ramakrishna BS**. Faecal microbiota composition in vegetarians: comparison with omnivores in a cohort of young women in southern India. *The British journal of nutrition* 108: 953-957, 2012.
37. **Klenk J, Nagel G, Ulmer H, Strasak A, Concin H, Diem G, and Rapp K**. Body mass index and mortality: results of a cohort of 184,697 adults in Austria. *European journal of epidemiology* 24: 83-91, 2009.
38. **Kristensen NB, Pierzynowski SG, and Danfaer A**. Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intraruminally infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate. *Journal of animal science* 78: 1372-1379, 2000.
39. **Lecona E, Olmo N, Turnay J, Santiago-Gomez A, Lopez de Silanes I, Gorospe M, and Lizarbe MA**. Kinetic analysis of butyrate transport in human colon adenocarcinoma cells reveals two different carrier-mediated mechanisms. *The Biochemical journal* 409: 311-320, 2008.
40. **Leschelle X, Goubern M, Andriamihaja M, Blottiere HM, Couplan E, Gonzalez-Barroso MD, Petit C, Pagniez A, Chaumontet C, Mignotte B, Bouillaud F, and Blachier F**. Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochimica et biophysica acta* 1725: 201-212, 2005.
41. **Livesey G, and Elia M**. Estimation of energy expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry: evaluation of errors with special reference to the detailed composition of fuels. *The American journal of clinical nutrition* 47: 608-628, 1988.
42. **Louis P, and Flint HJ**. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS microbiology letters* 294: 1-8, 2009.
43. **Macfarlane GT GG**. *Microbiological aspects of the production of short-chain fatty acids in the large bowel.* Cambridge: Cambridge University Press, 1995, p. 87-105.
44. **Macfarlane GT, and Macfarlane S**. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International* 95: 50-60, 2012.
45. **Macfarlane S, and Macfarlane GT**. Regulation of short-chain fatty acid production. *The Proceedings of the Nutrition Society* 62: 67-72, 2003.
46. **Malinen E, Rinttila T, Kajander K, Matto J, Kassinen A, Krogius L, Saarela M, Korpela R, and Palva A**. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *The American journal of gastroenterology* 100: 373-382, 2005.
47. **Martinez-Medina M, Denizot J, Dreux N, Robin F, Billard E, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A, and Barnich N**. Western diet induces dysbiosis with increased E coli in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* 2013.
48. **Miner-Williams W, Deglaire A, Benamouzig R, Fuller MF, Tome D, and Moughan PJ**. Endogenous proteins in terminal ileal digesta of adult subjects fed a casein-based diet. *The American journal of clinical nutrition* 96: 508-515, 2012.
49. **Mouille B, Robert V, and Blachier F**. Adaptative increase of ornithine production and decrease of ammonia metabolism in rat colonocytes after hyperproteic diet ingestion. *American journal of physiology* 287: G344-351, 2004.
50. **Potten CS, and Allen TD**. Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. *Journal of ultrastructure research* 60: 272-277, 1977.
51. **Rasmussen HS, Holtug K, and Mortensen PB**. Degradation of amino acids to short-chain fatty acids in humans. An in vitro study. *Scand J Gastroenterol* 23: 178-182, 1988.
52. **Reeves PG, Nielsen FH, and Fahey GC, Jr.** AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition* 123: 1939-1951, 1993.

53. **Ritzhaupt A, Wood IS, Ellis A, Hosie KB, and Shirazi-Beechey SP**. Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *The Journal of physiology* 513 (Pt 3): 719-732, 1998.
54. **Roediger WE**. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 83: 424-429, 1982.
55. **Santacruz A, Collado MC, Garcia-Valdes L, Segura MT, Martin-Lagos JA, Anjos T, Marti-Romero M, Lopez RM, Florido J, Campoy C, and Sanz Y**. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *The British journal of nutrition* 104: 83-92, 2010.
56. **Sanz Y, Sanchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S, and Dellaglio F**. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS immunology and medical microbiology* 51: 562-568, 2007.
57. **Schwarz J, Tome D, Baars A, Hooiveld GJ, and Muller M**. Dietary protein affects gene expression and prevents lipid accumulation in the liver in mice. *PloS one* 7: e47303, 2012.
58. **Siavoshian S, Blottiere HM, Cherbut C, and Galmiche JP**. Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclin-dependent kinase 2 expression in HT-29 colonic epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 232: 169-172, 1997.
59. **Singh B, Halestrap AP, and Paraskeva C**. Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis* 18: 1265-1270, 1997.
60. **Smiddy FG, Gregory SD, Smith IB, and Goligher JC**. Faecal loss of fluid, electrolytes, and nitrogen in colitis before and after ileostomy. *Lancet* 1: 14-19, 1960.
61. **Smith JG, Yokoyama WH, and German JB**. Butyric acid from the diet: actions at the level of gene expression. *Critical reviews in food science and nutrition* 38: 259-297, 1998.
62. **Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, and Langella P**. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 16731-16736, 2008.
63. **Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, and Dore J**. Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases* 15: 1183-1189, 2009.
64. **Tothmeresz B**. Comparison of different methods for diversity ordering. . *Journal of Vegetation Science* 283-290, 1995.
65. **Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, Brown D, Stares MD, Scott P, Bergerat A, Louis P, McIntosh F, Johnstone AM, Lobley GE, Parkhill J, and Flint HJ**. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME journal* 5: 220-230, 2011.
66. **Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, and Thompson CB**. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science (New York, NY* 324: 1076-1080, 2009.
67. **Westerterp-Plantenga MS, Nieuwenhuizen A, Tome D, Soenen S, and Westerterp KR**. Dietary protein, weight loss, and weight maintenance. *Annual review of nutrition* 29: 21-41, 2009.
68. **Wilson AJ, and Gibson PR**. Short-chain fatty acids promote the migration of colonic epithelial cells in vitro. *Gastroenterology* 113: 487-496, 1997.

69. **Wolffram S, Badertscher M, and Scharrer E**. Carrier-mediated transport is involved in mucosal succinate uptake by rat large intestine. *Experimental physiology* 79: 215-226, 1994.

70. **Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, and Lewis JD**. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York), NY* 334: 105-108, 2011.

595 **Figure Legends**
596
597 **Figure 1.** Characteristics of animals after NP/HP feeding for 15 days.
598 (A) Cumulative body weight gain; (B); Food intake; (C) and (D) Weight of the cecal and colonic
599 luminal contents recovered from rats. The results are obtained from 8 animals in each group,
600 and are expressed as means ± SEM. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.
601
602 **Figure 2.** Renyi's diversity profiles of microbiota in luminal content of rats after NP/HP feeding for 15
603 days.
604 (A) Diversity profiles in the cecal luminal content; (B) Diversity profiles in the colonic luminal content.
605 Results are obtained from 8 animals in each group.
606
607 **Figure 3.** Total amounts of short-chain fatty acids in the large intestine's luminal contents and in feces
608 recovered from rats after NP/HP feeding for 15 days.
609 (A) and (B) short-chain fatty acids (SCFA) and branched-chain fatty acids (BCFA) in the cecal luminal
610 content; (C) and (D) SCFA and BCFA in the colonic luminal content; (E) Total fecal SCFA and (F)
611 Fecal SCFA expressed as percentages of energy loss. The feces were recovered for the last 3 days of
612 diets. To calculate the energy loss as SCFA, total energy in the food ingested is taken as 100%.
613 Results are presented as mean ± SEM and are obtained from 8 animals in each group, *p<0.05 and
614 **p<0.01.
615
616 **Figure 4.** Oxidation of energy substrates and expression of monocarboxylate transporters in isolated
617 colonocytes and colonic sections from rats after NP/HP feeding for 15 days.
618 (A) Oxidation of butyrate (2 mM), L-glutamine (1 mM) and D-glucose (5 mM) by the isolated
619 colonocytes recovered from rats after NP/HP feeding for 15 days. Results are expressed as means ±
620 SEM and obtained from 8-9 animals in each group. (B) Gene expression of *Mct1*, *Smct1* and *Cd147* in
621 isolated colonocytes. The mRNA expression was determined by real-time PCR and the results were
622 normalized with *Rpl13a* mRNA and are obtained from 5-6 animals in each group; (C) Western blot
623 analysis of membrane MCT1 and SMCT1 in isolated colonocytes. Pictures are representative
624 immunoblots of MCT1, SMCT1 and βActin from 5 animals in each group; (D) Immunofluorescence
625 staining of MCT1 and SMCT1 in colonic sections. The immunoblots are representative of results
626 obtained from 5 animals in each group.
627

628 **Table 1. Composition of the experimental diets.**
629

Ingredients (g/kg)	NP	HP
Whole milk proteins	140	530
Sucrose	100	45.7
Corn starch	622.4	287
Mineral mixture AIN 93-M[#]	35	35
Vitamin mixture AIN 93-V[#]	10	10
Soybean oil	40	40
Cellulose	50	50
Choline	2.3	2.3
Energy (kJ/g)	14.6	14.6

NP: normoproteic diet; HP: high protein diet
[#](52)

630

631 **Table 2(A).** Primers used for bacterial DNA amplification for microbiota composition analysis.
632

Target bacterial group/species	Designation	Primers (5' – 3') sequence	Annealing temperature (°C)
Total bacteria	HAD F	TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC	59°C[#]
	HAD R	CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	
Bifidobacterium	g-Bifid F	CTCCTGGAAACGGGTGG	55°C[#]
	g-Bifid R	GGTGTTCTTCCCGATATCTACA	
Lactobacillus group	Lac F	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	61°C[#]
	Lac R	ATTYCACCGCTACACATG	
Bacteroides fragilis group	Bfra 531 F	ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT	50°C[#]
	Bfra 766 R	CCAGTATCAACTGCAATTTTA	
C. coccoides group	Ccoc F	AAATGACGGTACCTGACTAA	50°C[#]
	Ccoc R	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	
C. leptum group	Clep F	GCACAAGCAGTGGAGT	50°C[#]
	Clep R	CTTCCTCCGTTTTGTCAA	
Enterobacteriaceae	Entero F	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	63°C[#]
	Entero R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	
Defulfovibrio spp.	Desulf.spp F	GGTACCTTCAAAGGAAGCAC	58°C*
	Desulf.spp R	GGGATTTCACCCCTGACTTA	
Faecalibacterium prausnitzii	F.praus F F.praus R	CCCTTCAGTGCCGCAGT GTCGCAGGATGTCAAGAC	61°C*

F: forward primer; R: reverse primer. [#](12); *(46).
The program of PCR was as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min; 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at primer-specific temperature for 10 s and extension at 72°C for 30 s; and melting curve at 95°C for 5 s, 65°C for 1 min and 98°C continuous followed by cooling to 40°C.

633
634
635
636 **Table 2(B).** Primers used for gene expression analysis in isolated rat colonocytes.
637

RNA	Accession Number	Forward primer (5'-3') sequence	Reverse primer (5'-3') sequence
Mct1	NM 012716.2	GCAACGACCAGTGAAGTGT	AAGCCCAAGACCTCCAAT
Smct1	NM 001191987.1	CTGGGCTTGTTTTCTTTGG	CGTTGTGCGTGCTGTTAC
Cd147	NM 001109882.1	AGTGAGGGAGAGTTTGTGAAG	TCAGTGCCGTTGGAGATAG
Rpl13a	NM 173340.2	GGATCCCTCCACCCTATGACA	CTGGTACTTCCACCCGACCTC

The program of PCR was as follows: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C.

638

639 **Table 3.** Microbiota composition in the cecal and colonic luminal contents recovered from rats after
640 NP/HP feeding for 15 days determined by real-time qPCR.
641

Bacterial group	NP		HP		p-value
	Median	IQR	Median	IQR	
Cecal luminal content					
Total bacteria	13.3	13.1 - 13.5	13.3	13.2 - 13.4	0.910
Bifidobacterium	6.6	5.6 - 7.9	7.0	6.6 - 7.5	0.307
Lactobacillus group	8.5	8.0 - 8.9	8.3	7.9 - 8.8	0.495
Bacteroides fragilis group	11.1	10.9 - 11.2	11.2	11.2 - 11.3	0.124
C. coccoides group	10.7	10.6 - 10.8	9.2	7.7 - 10.2	**0.028**
C. leptum group	10.9	10.7 - 11.0	10.1	9.8 - 10.3	**0.006**
Desulfovibrio spp.	10.2	10.0 - 10.3	10.1	9.9 - 10.1	0.248
F. prausnitzii	8.5	8.3 - 8.9	7.7	7.4 - 8.0	**<0.001**
Enterobacteriaceae	10.6	10.4 - 10.7	10.6	10.2 - 10.9	0.909
Colonic luminal content					
Total bacteria	12.4	12.4 - 12.5	12.2	12.1 - 12.3	**0.002**
Bifidobacterium	7.4	7.1 - 7.6	7.0	6.9 - 7.2	0.052
Lactobacillus group	9.2	8.7 - 9.5	8.6	8.1 - 9.2	0.218
Bacteroides fragilis group	11.6	11.3 - 11.8	11.4	11.1 - 11.6	0.248
C. coccoides group	11.0	11.0 - 11.1	10.5	10.4 - 10.7	**<0.001**
C. leptum group	11.8	11.7 - 11.8	10.6	10.5 - 11.1	**<0.001**
Desulfovibrio spp.	9.1	8.9 - 9.3	9.1	9.0 - 9.3	0.739
F. prausnitzii	6.7	6.6 - 6.9	5.2	5.1 - 5.5	**0.001**
Enterobacteriaceae	10.7	10.5 - 10.9	10.6	10.2 - 10.8	0.436

Results are expressed as log of gene copy numbers of the different bacterial groups/species per gram of wet luminal content and are obtained from 8 animals in each group.

642

643 **Table 4.** Prevalence of bacterial species identified in the cecal and colonic luminal contents by PCR-
644 DGGE analysis and subsequent DNA sequencing.
645

Bacterial species	Accession Number	% identity	Number of positive cases/total cases (%)		p-value
			NP	HP	
Cecal luminal content					
Actinobacteium sp.	HQ675413	98	4/8 (50)	7/8 (87)	0.282
Alistipes massiliensis	JF824799	95	3/8 (37)	0/8 (0)	0.100
Bacteroides bacterium	GU957728	97	0/8 (0)	4/8 (50)	0.076
Bacteroides chinchilla	AB547637	94	4/8 (50)	8/8 (100)	0.076
Bacteroides dorei	JF 298878	98	3/8 (37)	8/8 (100)	**0.025**
Bacteroides sartorii	AB572597	95	4/8 (50)	1/8 (12)	0.282
Bacteroides uniformis	JF298891	97	2/8 (25)	4/8 (50)	0.363
Bacteroides vulgatus	EFG22256	99	0/8 (0)	7/8 (87)	**0.001**
Blautia luti	AJ133124	99	4/8 (50)	4/8 (50)	1.000
Clostridium sp.	AB610549	96	4/8 (50)	0/8 (0)	**0.025**
Escherichia coli	JQ219679	100	8/8 (100)	3/8 (37)	**0.025**
Fusobacterium sp.	AF342858	99	0/8 (0)	6/8 (75)	**0.006**
Prevotella sp.	DQ273884	98	7/8 (87)	5/8 (62)	0.569
Rhodospirillum sp.	HM998908	91	0/8 (0)	4/8 (50)	0.076
Ruminococcus sp.	DQ882650	98	2/8 (25)	0/8 (0)	0.466
Verrumicrobia bacterium	JN65682	93	1/8 (12)	4/8 (50)	0.282
Colonic luminal content					
Actinobacterium sp.	HQ675413	98	7/8 (87)	8/8 (100)	0.335
Bacteroides bacterium	GU957728	96	0/8 (0)	4/8 (50)	0.076
Bacteroides dorei	EU722737	92	5/8 (62)	0/8 (0)	**0.025**
Bacteroides fibrisolvas	AJ222769	97	3/8 (37)	0/8 (0)	0.100
Bacteroides sartorii	AB572597	95	6/8 (75)	5/8 (62)	0.641
Bacteroides vulgatus	DQ100446	96	3/8 (37)	2/8 (25)	0.641
Clostridium sp.	FJ625862.1	93	5/8 (62)	0/8 (0)	**0.025**
Enterococcus sp.	AY683831	95	1/8 (12)	5/8 (62)	0.118
Fusobacterium sp.	AF342858	98	7/8 (87)	2/8 (25)	**0.040**
Lachnospiraceae	AB186803	91	2/8 (25)	0/8 (0)	0.466
Ruminococcus bromii	DQ882649	94	5/8 (62)	2/8 (25)	0.314

PCR-DGGE of DNA from the luminal contents recovered from rats after NP/HP feeding for 15 days, using the universal primers HAD-F and HAD-R.

646
647

Table 5. Total amounts of organic acids and ethanol in the total cecal and colonic luminal contents recovered from rats after NP/HP feeding for 15 days.

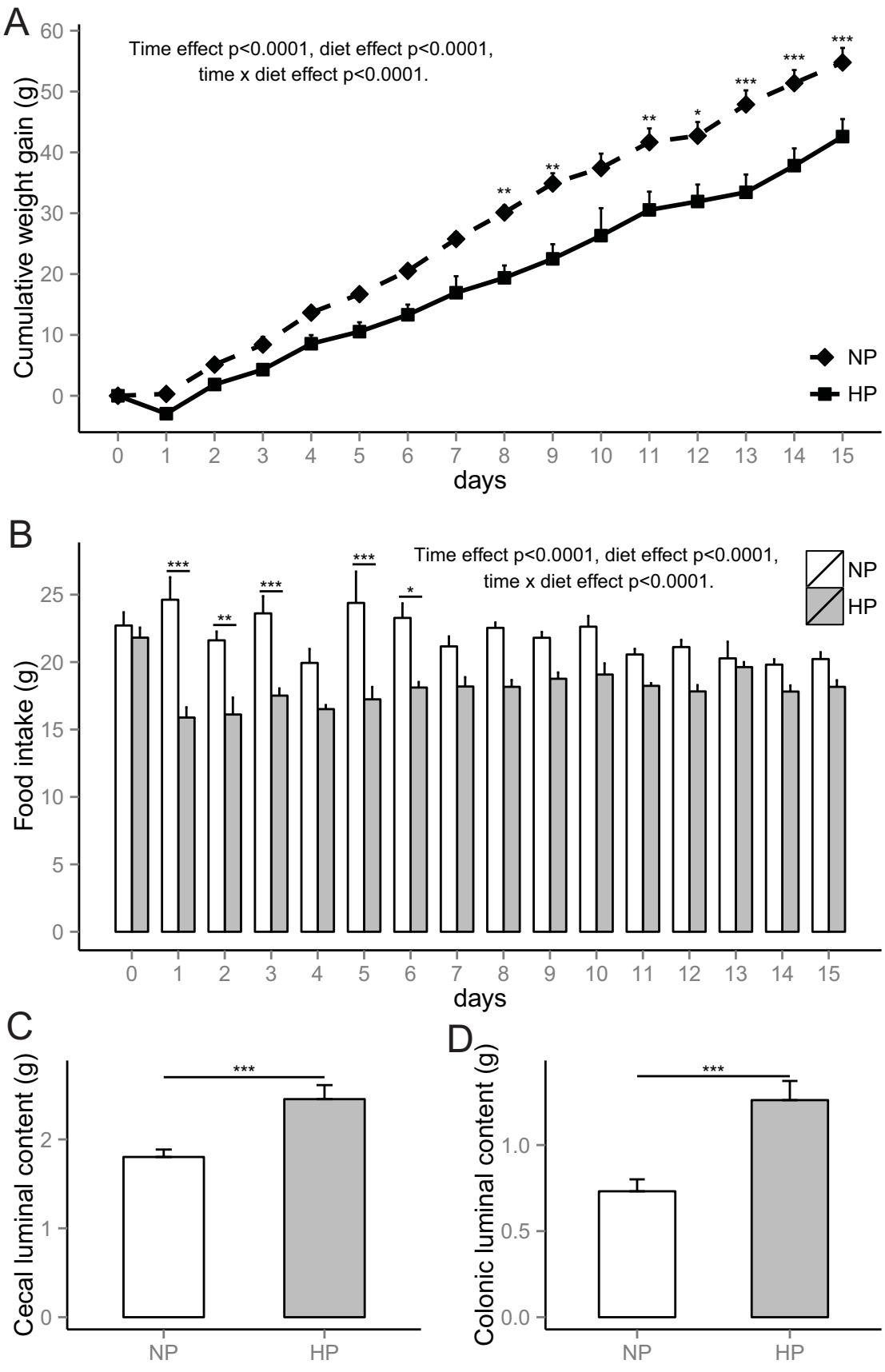
µmol in total luminal content	NP		HP		p-value
	Mean	SEM	Mean	SEM	
Cecal luminal content					
L-lactate	0.214	0.036	0.390	0.088	0.095
D-lactate	0.098	0.014	0.145	0.043	0.325
Succinate	3.452	0.585	7.505	0.845	**0.002**
Formate	0.565	0.027	0.947	0.114	**0.015**
Ethanol	27.590	8.388	23.352	11.821	0.775
Colonic luminal content					
L-lactate	0.053	0.006	0.210	0.029	**< 0.001**
D-lactate	0.004	0.002	0.008	0.002	**0.040**
Succinate	0.905	0.625	7.064	1.066	**< 0.001**
Formate	0.064	0.013	0.177	0.044	0.052
Ethanol	0.796	0.142	1.756	0.340	**0.031**

Results are obtained from 6 to 8 animals in each group.

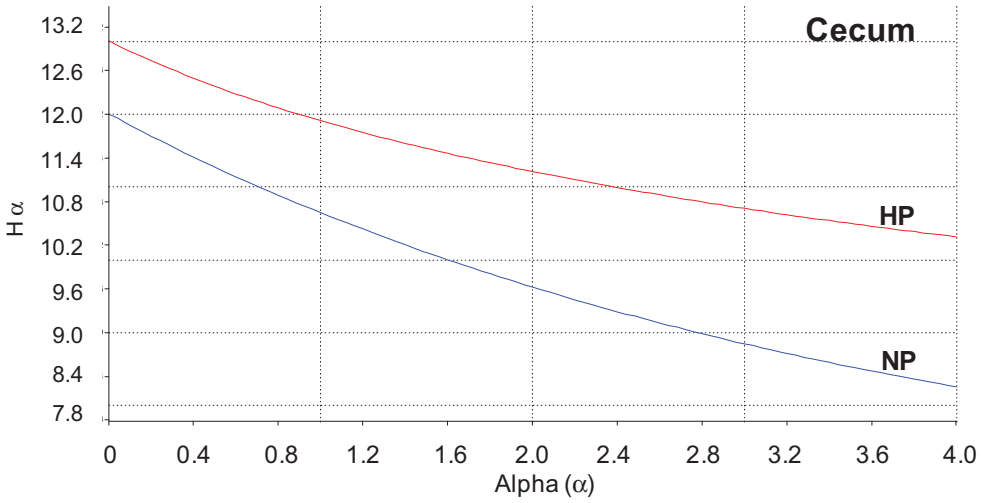
653 **Table 6.** SCFA concentrations in the cecal and colonic luminal contents recovered from rats after
654 NP/HP feeding for 15 days.
655

μmol/g of wet luminal content	NP		HP		p-value
	Mean	SEM	Mean	SEM	
Cecal luminal content					
Acetate	15.186	1.046	16.848	1.636	0.409
Propionate	3.446	0.292	3.282	0.331	0.716
Butyrate	1.886	0.161	1.986	0.288	0.768
Valerate	0.378	0.022	0.399	0.058	0.733
Colonic luminal content					
Acetate	9.714	2.610	10.413	1.430	0.819
Propionate	2.065	0.554	3.291	0.573	0.147
Butyrate	0.905	0.205	1.358	0.274	0.208
Valerate	0.168	0.055	0.436	0.130	0.090
Results are obtained from 8 animals in each group.					

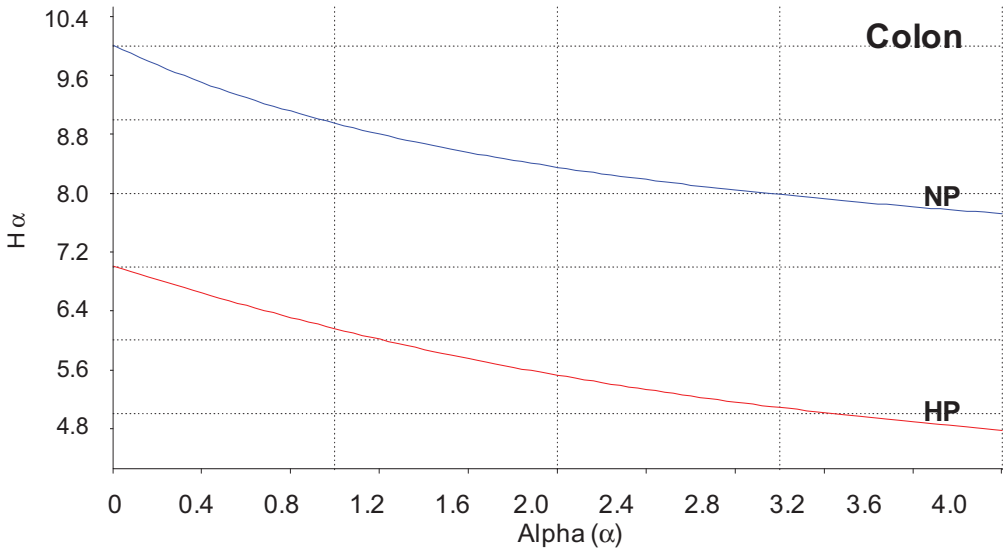
656

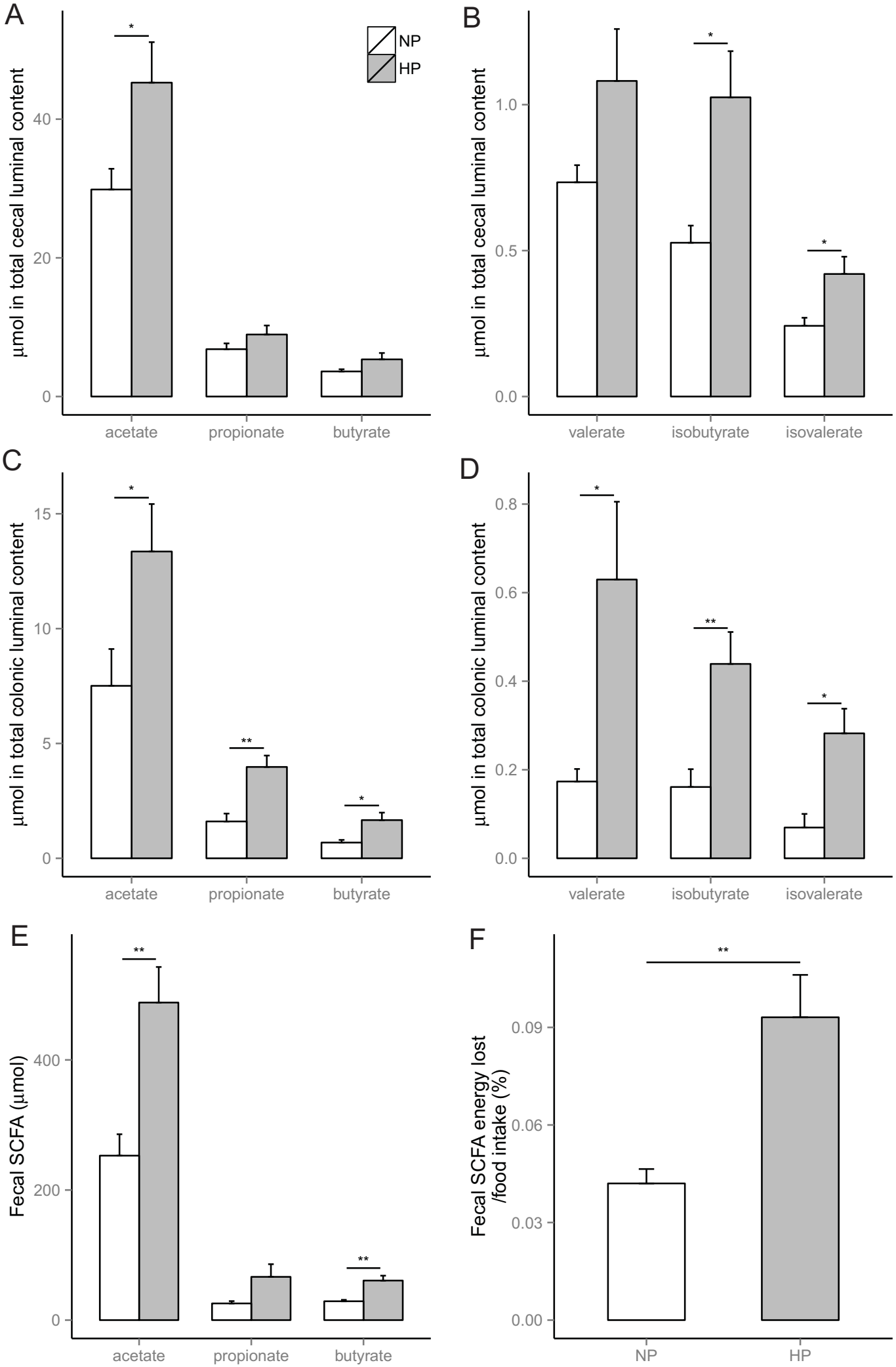

A
Time effect p<0.0001, diet effect p<0.0001,
time x diet effect p<0.0001.
Cumulative weight gain (g)
days
NP
HP
B
Time effect p<0.0001, diet effect p<0.0001,
time x diet effect p<0.0001.
Food intake (g)
days
NP
HP
C
Cecal luminal content (g)
NP
HP
D
Colonic luminal content (g)
NP
HP

A

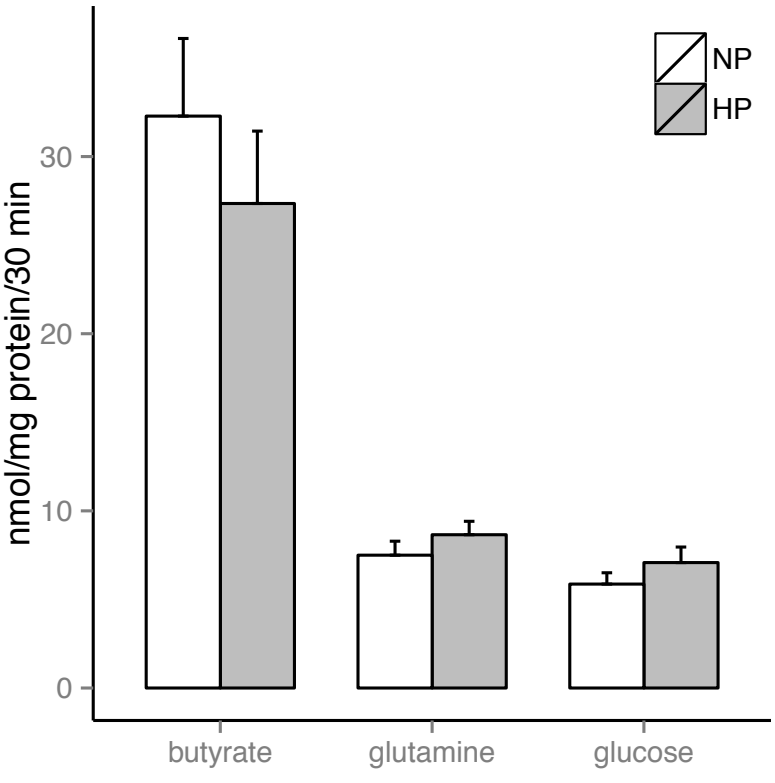

Cecum
HP
NP
H α
13.2
12.6
12.0
11.4
10.8
10.2
9.6
9.0
8.4
7.8
0
0.4
0.8
1.2
1.6
2.0
2.4
2.8
3.2
3.6
4.0
Alpha (α)

B

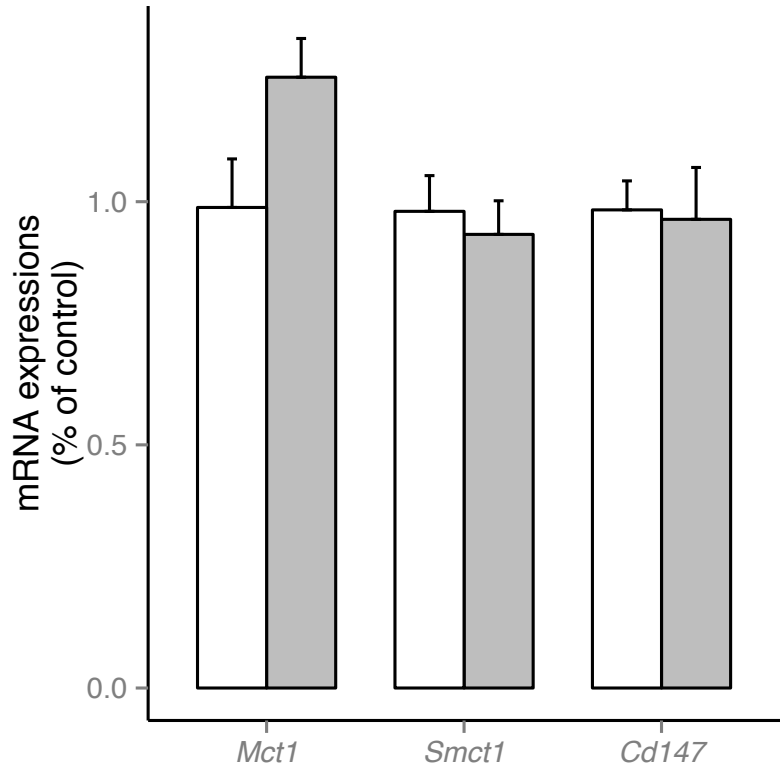

Colon
NP
HP
H α
10.4
9.6
8.8
8.0
7.2
6.4
5.6
4.8
0
0.4
0.8
1.2
1.6
2.0
2.4
2.8
3.2
3.6
4.0
Alpha (α)


A
B
C
D
E
F
NP
HP
µmol in total cecal luminal content
µmol in total colonic luminal content
Fecal SCFA (µmol)
Fecal SCFA energy lost /food intake (%)
acetate
propionate
butyrate
valerate
isobutyrate
isovalerate
NP
HP
0
20
40
0.0
0.5
1.0
5
10
15
0.2
0.4
0.6
0.8
200
400
0.00
0.03
0.06
0.09
*
**

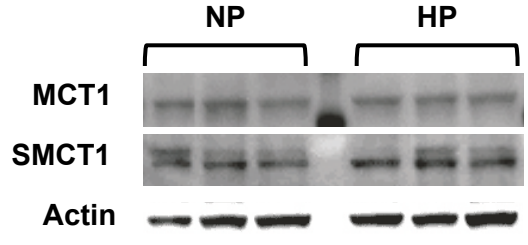
A


NP
HP
nmol/mg protein/30 min
30
20
10
0
butyrate
glutamine
glucose

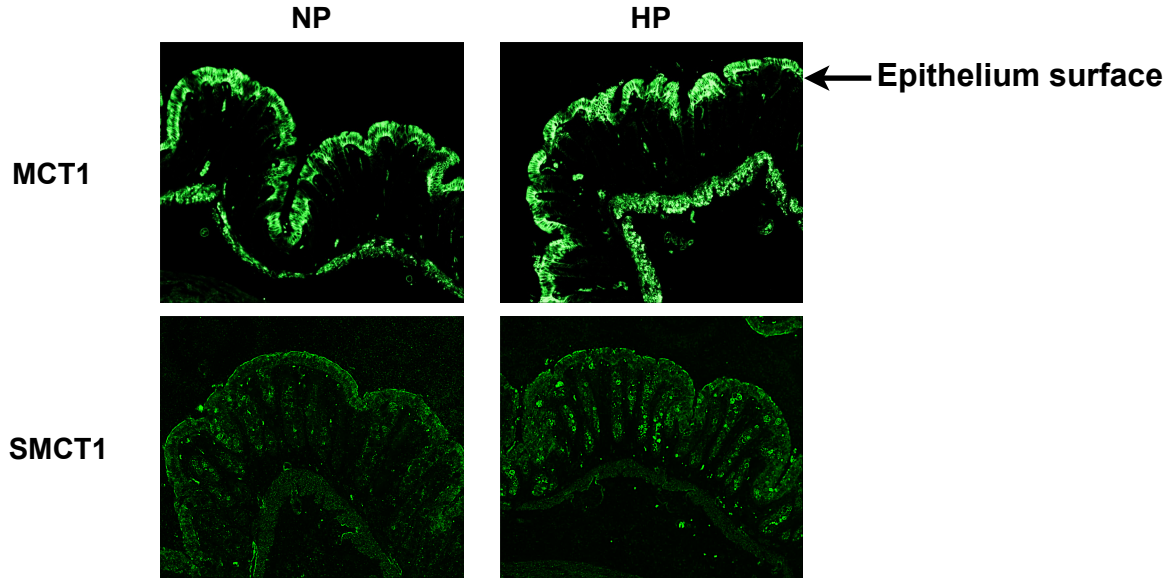
B


mRNA expressions
(% of control)
1.0
0.5
0.0
Mct1
Smct1
Cd147

C


NP
HP
MCT1
SMCT1
Actin

D


NP
HP
Epithelium surface
MCT1
SMCT1

6 Article 2 : Effets bénéfiques d'un mélange d'acides aminés sur la cicatrisation de la muqueuse colique chez le rat[##]

[##]Article publié par le journal Inflammatory Bowel Disease le 13 decembre 2013.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont des maladies très invalidantes qui touchent des millions de personnes dans le monde actuellement. Ces maladies sont caractérisées par des épisodes de poussés inflammatoires suivis par des épisodes de rémission plus ou moins longues, avec une étiologie et une pathogénèse encore non complètement élucidées. Sans traitement curatif à l'heure actuelle, la cicatrisation de la muqueuse intestinale des MICI émerge comme une cible importante dans la pratique thérapeutique et dans les études cliniques.

L'idée que les acides aminés, thréonine, méthionine et glutamate, puissent aider à accélérer le processus de la cicatrisation intestinale provient des données de la littérature montrant leurs effets liés à la biosynthèse des mucines, du glutathion, des protéines et au métabolisme énergétique de l'épithélium intestinal (cf. la partie 2.3 de l'introduction bibliographique). Par exemple, dans un modèle de mini-porcs avec iléite, l'inflammation intestinale augmente la synthèse de mucines intestinales et l'utilisation de la thréonine d'origine sanguine par les organes périphériques. Ce phénomène est associé à une mobilisation des protéines endogènes pour satisfaire la demande en thréonine associée à l'inflammation intestinale aiguë (Remond et al., 2009).

La colite induite par le dextran sulfate sodium (DSS) chez les animaux est un modèle de colite expérimentale couramment utilisé pour étudier les MICI. Nous avons mis en place ce modèle de colite expérimentale de sévérité relativement élevée sur le modèle du rat mâle de souche Wistar dans le laboratoire après des études préliminaires et avons utilisé ce modèle pour étudier l'évolution spontanée de la cicatrisation de muqueuse colique et les effets d'un mélange d'acides aminés (thréonine, méthionine et glutamate) choisis pour leurs effets supposés bénéfiques pour la cicatrisation post-colite.

Les expériences ont été effectuées en deux phases. Dans la première phase, un groupe recevait du DSS à 5% (w/v) dans l'eau de boisson pendant 6 jours (groupe DSS) et un groupe témoin qui recevait de l'eau sans DSS (groupe Contrôle). Par la suite, dans la deuxième phase, tous les animaux ont reçu du DSS pendant 6 jours et ensuite à l'arrêt du DSS, ils ont été divisés en deux groupes au hasard: un groupe recevait du mélange d'acides aminés (groupe DSS-AA mixture) et l'autre recevait de l'alanine comme témoin iso-azoté (groupe DSS-Ala), pendant 3, 7 ou 10 jours.

Lors du sacrifice, après avoir récupéré le contenu luminal colique pour analyse du contenu en eau et en acides gras à chaîne courte, le côlon des animaux a été récupéré pour mesurer son poids et sa longueur, ainsi que pour différentes analyses : aspect histopathologique, teneur en glutathion et en myéloperoxidase, expression des cytokines pro-inflammatoires et régulatrices.

Enfin lors de la deuxième phase, afin de mesurer le taux de synthèse protéique dans le côlon, en plus des deux groupes DSS-Ala et DSS-AA mixture, un troisième groupe de contrôle sain n'ayant pas reçu du DSS pendant la première phase, mais ayant reçu de l'alanine dans la deuxième phase a été ajouté (groupe Water-Ala).

Nos résultats montrent que les paramètres liés à la colite s'améliorent naturellement après l'arrêt de DSS. Cependant, la cicatrisation est déjà observable 3 jours post-colite alors que l'inflammation reste à un niveau élevée. La supplémentation pendant 10 jours avec le mélange d'acides aminés accélère la cicatrisation avec un taux de synthèse protéique modifié. Cependant, cette supplémentation ne modifie pas la vitesse de la résolution naturelle de l'inflammation.

Beneficial Effects of an Amino Acid Mixture on Colonic Mucosal Healing in Rats

Xinxin Liu, MS, Martin Beaumont, MS,* Francine Walker, MD, PhD,[†,‡] Catherine Chaumontet, MS,* Mireille Andriamihaja, PhD,* Hideki Matsumoto, PhD,[§] Nadezda Khodorova, PhD,* Annaïg Lan, PhD,* Claire Gaudichon, PhD,* Robert Benamouzig, MD, PhD,[‖] Daniel Tomé, PhD,* Anne-Marie Davila, PhD,* Jean-Claude Marie, PhD,[‡] and François Blachier, PhD**

Background: Mucosal healing (MH) decreases the relapse risk in patients with inflammatory bowel disease, but the role of dietary supplementation in this process has been poorly investigated. Here, we investigated the effect of an amino acid mixture supplement on rat MH.

Methods: Colitis was induced using 5% of dextran sodium sulfate for 6 days. Then, rats received a mixture of threonine (0.50 g/d), methionine (0.31 g/d), and monosodium glutamate (0.57 g/d) or an isonitrogenous amount of alanine (control group). Colons were recovered after colitis induction and after dietary supplementation for measuring colon characteristics, myeloperoxidase, cytokine gene expression, glutathione content, protein synthesis rate, and for histological analysis. Short-chain fatty acids were measured in the colonic content.

Results: Colitis induction resulted in anorexia, thickening and shortening of the colon, and ulceration. Colonic cytokine expression and neutrophil infiltration were increased. An increased amount of water and a decreased amount of butyrate, propionate, and acetate were measured in the colonic content. Supplementation with the amino acid mixture coincided with a reduced protein synthesis rate in the colon compatible with the observed increased colonic MH. Mucosal regeneration/re-epithelialization was visible within 3 days after colitis induction at a time when mucosal inflammation was severe. Histological analysis revealed an increased regeneration/re-epithelialization after 10-day supplementation. In contrast, the spontaneous resolution of inflammation was not affected by the supplementation.

Conclusions: Amino acid supplementation ameliorates colonic MH but not mucosal inflammatory status. Our data sustain the use of adjuvant dietary intervention on initiated intestinal MH.

(Inflamm Bowel Dis 2013;19:2895–2905)

Key Words: intestinal mucosal healing, amino acid supplementation, experimental colitis, mucosal re-epithelialization

Inflammatory bowel diseases (IBD), which include ulcerative colitis and Crohn's disease, display alteration of the intestinal mucosa associated with exacerbated immune functions of still unclear etiology.[1–3] IBD are characterized by chronic inflammation of the mucosa with alternation of relapsing and remitting episodes. In Crohn's disease remission, the inflamed mucosa has the possibility to progressively heal, leading to the total disappearance of all mucosal ulcerations, although in clinical practice, this endpoint may be difficult to achieve.[4] For patients with ulcerative colitis, based on endoscopic and histological observations, mucosal healing (MH) is described as the absence of friability, blood, erosion, and ulceration in all visualized segments of the gut mucosa.[5] According to recent evidence, it appears that an advanced MH coincides with a sustained clinical remission and reduced rates of hospitalization and surgical resection explaining why MH can be considered as a full therapeutic goal and an endpoint for clinical trials.[6–9] Indeed, a recent consensus report of experts concluded that MH is both a relevant and achievable goal in the treatment of Crohn's disease and a predictive parameter for the long-term disease course.[10]

There is a paucity of information regarding the possible role of nutritional supplement for improving MH in IBD. Few studies, using animal models of experimental enteritis, have suggested that some specific individual amino acids used in nutritional supplements can improve the intestinal MH. Provision of oral glutamine has been shown to improve the healing of small intestine mucosa after radiation-induced enteritis.[11] Accordingly, early enteral feeding with supplemental glutamine was found to improve the microscopic aspect of the healing in a model of anastomosis in rats.[12] Glutamate, an amino acid whose metabolism is tightly related to glutamine metabolism in intestinal epithelial cells,[13] has been

Received for publication August 29, 2013; Accepted September 18, 2013.

From the *UMR 914 PNCA INRA, AgroParisTech Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Paris, France; [†]Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, Hôpital Xavier Bichat, Paris, France; [‡]INSERM U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon/Université Paris 7, Paris, France; [§]Frontier Research Laboratory, Institute for Innovation, Ajinomoto Co. Inc., Kawasaki, Japan; and [‖]Departement de Gastroentérologie, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Reprints: François Blachier, PhD, UMR 914 PNCA INRA, AgroParisTech Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 16 Rue Claude Bernard, Paris 75005, France (e-mail: francois.blachier@agroparistech.fr).

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1097/01.MIB.0000435849.17263.c5

Published online 4 November 2013.

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

reported to promote small intestine MH after chemically induced enteropathy in rats.[14] Glutamate and glutamine are well known to be major fuels from the arterial origin for colonic epithelial cells. They are intensely oxidized by these cells[15,16] in a context of high energy requirement for the colonic epithelium renewal, thus requiring intense anabolic metabolism.[17,18] In addition, enteral glutamate is a precursor for the synthesis of the tripeptide glutathione in the intestinal mucosa,[19,20] such a tripeptide being involved in determining the intracellular redox status and the control of intracellular concentration of both oxygen reactive and nitrogen reactive species.[21,22] Finally, glutamine and glutamate have been shown to stimulate protein synthesis in intestinal epithelial cells.[23,24] The essential amino acid threonine is known to be highly metabolized by the gut[25] with major utilization for protein synthesis in the intestinal mucosa[26] particularly for mucin synthesis.[27–29] Threonine deficiency has been shown to provoke an alteration of the intestinal functionality in terms of paracellular permeability[30,31] and to reduce intestinal protein synthesis.[32] The metabolism of threonine can be relevant to IBD, which is associated with a decreased number of goblet cells and mucus synthesis.[33] In a pig model of ileitis, it has been demonstrated that intestinal inflammation increases the gastrointestinal threonine uptake and mucin synthesis.[34] Methionine is an essential amino acid, which is largely metabolized by the intestine.[25,35,36] Interestingly, a study has shown that in the pig model, sulfur-containing amino acid deficiency results in intestinal atrophy with lower goblet cells and lower glutathione content. The latter characteristic can be because of the role of methionine as a precursor for the sequential synthesis of cysteine and glutathione.[37,38]

In this overall context, we made the working hypothesis that a mixture of threonine, methionine, and monosodium glutamate (as compared with the isonitrogenous control alanine[27]), may exert beneficial effects on rat MH after colitis induction. After dextran sodium sulfate (DSS) colitis induction, rats received for 10 days during the MH phase the mixture of amino acids or an isonitrogenous alanine supplement (control). Analysis of histological and biochemical parameters of the rat colonic mucosa revealed an enhancing effect of the amino acid mixture on the MH.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Study Design

Experiments were approved by the local Animal Care and Ethics Committee (COMETHEA, No. 11-040, Jouy-en-Josas, France). Male Wistar rats weighing 150 g were housed individually with a 12–h light/12-h dark cycle (lights from 8:00 to 20:00 hours) and fed for 4 days with a standard rodent solid diet containing 16% protein by weight. Then, in study 1, rats were randomly assigned to the experimental group (DSS group; 8 rats receiving drinking water with 5% DSS ad libitum for 6 d; DSS, Molecular weight, 36,000–50,000; MP Biomedicals, Illkirch, France) or control group (Control; 6 rats receiving water without DSS ad libitum for 6 d). During this period, rats were fed ad libitum with the same standard rodent solid diet. Then animals were anesthetized by intraperitoneal injection of 45 mg/kg of pentobarbital (Sanofi-Synthélabo Santé Animale, Libourne, France). The whole colonic luminal content was collected by expulsion and immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at −80°C for water and short-chain fatty acids (SCFA) content analysis. Then the colon was flushed by gentle washing with ice-cold phosphate-buffered saline 2 times before measuring its length and weight. Distal segments of colon were sampled for histopathological studies (the last 2 cm), and adjacent segments of colon were taken for the measurement of myeloperoxidase activity (MPO), gene expression analysis, and glutathione content. Segments of colon were immerged in Trizol and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at −80°C for gene expression assessment. Histological samples were fixed immediately in formalin. The other samples were frozen immediately in liquid nitrogen and kept at −80°C until analysis.

In study 2, to evaluate the effect of amino acid supplementation on the MH after chemically induced colitis (as detailed above), rats with DSS-induced colitis were randomly assigned to 2 different groups at the end of the 6-day DSS treatment. Rats in the experimental group (DSS-AA mixture group) received 15 mL of drinking water with the amino acids mixture (threonine 0.50 g/d, methionine 0.31 g/d, and monosodium glutamate 0.57 g/d), whereas rats in the control group received alanine (0.86 g/d) as isonitrogenous control (DSS-Ala group) for 3, 7, or 10 days ($n = 6$ for each time point). In a preliminary pilot study, we performed a histological examination of the colonic mucosa 15 days after the end of DSS treatment. The supplemental doses of threonine and methionine were determined with reference to the supplemental doses of threonine and cysteine used by Faure et al[39] for increasing intestinal mucin synthesis in DSS-treated rats, whereas the dose of monosodium glutamate was determined with reference to the supplemental safe dose used in rats in a previous work.[40] All animals were fed ad libitum with the same standard rodent solid diet. It was duly verified that DSS consumption was similar in the experimental and control groups during the 6 days of colitis induction. Samples were collected exactly as described above at each time point for further analysis.

The study of protein synthesis rate in colon (study 3) included a third group of animals, i.e., healthy rats that had received normal drinking water for 6 days instead of DSS and then drinking water containing alanine for 7 days (Water-Ala group), in addition to the DSS-AA mixture group and DSS-Ala group. The night before being killed, the animals' food intakes were restricted to the half of their usual food intakes. On the day of being killed, ^{13}C-valine (150 μmol per 100 g of body weight) was injected into the tail lateral vein of rats under isoflurane anesthesia. Thirty minutes after the ^{13}C-valine injection, rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital before colon recovery. The weight of the colon was measured after expulsion of the luminal content and 2 gentle rinses by ice-cold phosphate-buffered saline. Segments from the distal colon (the last 1 cm) and the median colon (1 cm in the middle of the colon) were recovered. Samples were frozen immediately in liquid

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

nitrogen and kept at −80°C until analysis. The ^{13}C-valine enrichments in free and protein-bound amino acids of colonic tissues were measured as described previously.[41] Briefly, distal and median segments of colon were pooled and homogenized in liquid nitrogen. The subsequent homogenates were separated into 2 samples. One was lyophilized and analyzed for total nitrogen content by elemental analyzer (Vario EL III; Elementar, Lyon, France) with atropine as standard. The other sample was treated with 10% of 5-sulfosalicylic acid to precipitate the proteins, as described previously.[42] ^{13}C-valine enrichment in free and protein-bound amino acids, respectively, was determined as described previously.[42,43] Fractional synthesis rate (FSR, %/d) of colon protein was calculated as FSR = Ebound val/(Efree val × t) × 100, where Ebound val and Efree val are the protein-bound and free ^{13}C-valine enrichments in the colon. Absolute synthesis rates (ASR, g/d) were calculated as ASR = FSR × P, where P is colon protein content.

Water and SCFA Measurement in the Colonic Luminal Content

The relative amount of water in the colonic luminal content was determined by the difference of weight before and after desiccation. The quantities of SCFA in the colonic luminal content were measured by gas chromatography. Briefly, the contents were homogenized in phosphoric acid before centrifugation (14 000*g*, 15 min, 4°C) and recovery of the supernatants. SCFA were then derivatized by esterification and analyzed by gas chromatography using an apparatus equipped with a capillary column (30 m, 0.32 mm ID, RestekRtx 502.2) and fitted with a flame ionization detector using a modification of the method of Kristensen et al.[44] The amount of SCFA was determined by external standards with reference to internal standards.

Histopathology of the Distal colon

For histopathological studies, distal segments of colon were collected and cut longitudinally, fixed in formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (3 μm) were rehydrated and then stained with H&P-Saffron. The percentages of lesions were evaluated by a semi-morphoquantitative method described by Otsuni et al.[45]

Immunohistochemistry (Ki67)

The paraffin-embedded tissue blocks used for histopathology analysis were cut into 3-μm-thick sections. Subsequent sections were used for immunohistochemistry analysis with Ki67 antibody, as an indicator of cell proliferation. Immunostaining was performed using Menarini Bond Max automat (Menarini, Rungis, France). Sections were first incubated with a primary antibody (rabbit monoclonal antibody anti Ki67; CliniSciences, Nanterre, France), and then with the corresponding biotinylated secondary antibody, followed by a polymer detection kit (Menarini). Immunoreactivity was detected with diaminobenzidine, and nuclei were counterstained with hematoxylin. The specificity of immunostaining was checked by omitting the primary antibodies and by using positive controls recommended by supplier.

MPO Activity in the Colonic Tissue

Colonic segments were homogenized in phosphate buffer (50 mM, pH 6) with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma Aldrich, St Louis, MO). The homogenized tissues were centrifuged at 10,000*g* for 30 minutes at 4°C. The resulting supernatants were collected and the pellets were frozen in liquid nitrogen and then thawed at 37°C. This cycle was repeated 3 times. MPO was assayed spectrophotometrically: 50 μL of the supernatant was mixed with 238 μL of 50 mM phosphate buffer (pH 6) containing 6 μL of a 20-mg/mL o-dianisidine dihydrochloride solution (Sigma Aldrich) and 6 μL of a 20-mM hydrogen peroxide solution (Sigma Aldrich), and absorbance was read at 450 nm after 10 minutes incubation when the increase of absorbance is proportional with time. MPO activity was expressed as arbitrary unit per milligram protein by calculating the difference between the absorbance measured after 10 minutes incubation and the absorbance at the onset of incubation. Protein in samples was assayed using the Bio-Rad DC Protein assay kit according to the manufacturer's instructions.

Glutathione Content in the Colonic Tissue

Colonic segments were homogenized in 10 volumes (wt/vol) of ice-cold HEPES-Tris 10 mM buffer containing 1 mM EDTA (pH 7) before centrifugation for 5 minutes at 10,000*g* at 4°C. The reduced and oxidized glutathione was assayed in the supernatants using the GT40 kit from Oxford Biomedical Research (Oxford, MI) according to the manufacturer's instructions. Briefly, in that assay, samples are untreated or treated with a thiol scavenger before adding glutathione reductase to reduce the oxidized form of glutathione (GSSG) to 2 GSH (reduced form of glutathione). GSH reacts with 5,5′-dithiobis-2-nitrobenzoic acid to form a compound that is detected by spectrophotometry. Untreated sample measured total GSH content, whereas treated sample measured GSSG content. Reduced GSH content is then calculated by difference.

Gene Expression Analysis in the Colonic Tissue

Total RNA was extracted from colonic segments by using Trizol Reagents (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The concentration and purity of RNAs were determined by measuring the absorbance at 260 nm and 280 nm using Nanodrop (Labtech, Palaiseau, France). The quality and integrality of RNAs were checked on 1% agarose gel containing ethidium bromide. Because DSS inhibits the polymerase activity,[46] mRNAs were extracted from the total RNA using Dynabeads mRNA purification kit (Invitrogen). Complementary DNA was synthesized from 1 μg of mRNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time PCR was performed subsequently on 5 μL of cDNA using the power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) and 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Two reference genes were selected following the criteria proposed by de Jonge et al[47]: *β-actin* and *Rpl4*. For the calculation of the relative gene expression, we chose the reference gene *Rpl4* that gave more homogenous results.

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Gene expression of cytokines TNF-α, MIP-2, IL-1β, IL-6, IL-10, and TGF-β and of mucins MUC2 and MUC3 were determined using the $2^{-\Delta CT}$ formula, where ΔCT = (CT target gene − CT reference gene). The sequences of primers and PCR program used were detailed in the Table 1.

Statistics

The results are expressed as mean ± SEM. Differences between the DSS and control groups were revealed by Welch's 2 sample *t* test. The evolution of the measured parameters, i.e., MPO activity and colon wet weight/length ratio, during the period of the AA mixture supplementation period was analyzed by 2-way analysis of variance with the treatment and the time as independent fixed factors using R Core Team (2012; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The animal body weight gain and food intake were analyzed using mixed model for repeated measures with the treatment and the time as fixed factors and subject as a random factor. Tukey's post hoc test was used to compare the differences at each time point. For protein synthesis analysis, to compare the differences among the 3 groups (DSS-AA mixture, DSS-Ala, and Water-Ala), *t* test with pooled SD with Bonferroni adjustment method was used. Differences with P value < 0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Experimental Colitis Induction

Effects of DSS on the Animals' Food Intake and Body Weight and on the Colon Luminal Content

As shown on Figure 1A, the rats receiving DSS (DSS group) in their drinking water were characterized by a marked alteration of their weight gain when compared with control animals (Control group). The DSS-treated rats ingested significantly less food 2 days after the beginning of treatment and thereafter up to the end of DSS treatment (i.e., day 6) (Fig. 1B). The weight of the colonic luminal content was nearly 2-fold smaller in DSS-treated than in control healthy animals (1.24 ± 0.26 g, n = 6, and 2.26 ± 0.21 g, n = 10, respectively, $P < 0.01$). In addition, the relative water content in the colonic content recovered from DSS-treated animals was higher than in control healthy animals (76.5 ± 1.6%, n = 10, and 64.5 ± 1.1%, n = 12, respectively, $P < 0.001$), corresponding to the slightly loose aspect of the colonic luminal content after colitis induction. Finally, the amounts of the SCFA, i.e., acetate, propionate, and butyrate, in the colonic luminal content were considerably diminished in animals with colitis induced by DSS (DSS group) when compared with untreated control animals (Control group) (Fig. 1C). After DSS treatment, the amount of propionate in the colonic content was higher than the amount of butyrate, at difference with the situation recorded in the control group.

Effects of DSS on the Colon's Histopathological Aspect and Inflammatory Indicators

The macroscopic aspect of the colonic mucosa at the end of the chemical induction of colitis was characterized by edema with ulceration observed particularly in the distal part of the large intestine with visible presence of blood in the colonic luminal content and feces (data not shown). Accordingly, as illustrated in Figures 2A, B, different anatomopathological situations were observed in animals' distal colonic mucosa. In the control healthy group, only normal/healthy colonic mucosa was observed, as shown by Figure 2A (N) with insert illustrating the Ki67 immunohistochemical analysis, indicating cell proliferation in the lower part of the colonic crypts of healthy rats. At the end of the DSS treatment, 58% ± 7% of the colonic mucosa was ulcerated/eroded (Fig. 2C), as shown by Figure 2A (E) illustrating erosion,

TABLE 1. Primers Sequences Used for Real-time PCR Analysis of Gene Expression

	Forward Sequence (5′–3′)	Reverse Sequence (5′–3′)
Rpl4	CCCGCCATGGCTTGTG	CAGATGACTCCCCCTTTTCAGA
β-*actin*	TCAGGAGGAGCAATGATCTTGA	GACAGGATGCAGAAGGAGATCAC
Tnf-α	CGTGTTCATCCGTTCTCTAC	CAGCGTCTCGTGTGTTTC
Mip-2	AAGATACTGAACAAAGGCAAGGCTAA	TTGAGGTACAGGAGCCCATGT
Il-1β	GCACCTTCTTTTCCTTCATC	GCCGTCTTTCATCACACA
Il-6	AAGTCGGAGGCTTAATTACATATGTTC	TCATCGCTGTTCATACAATCAGAA
Il-10	CGGGGTGACAATAACTGC	CCTGGGGCATCACTTCTAC
Tgf-β	CTGACCCCCACTGATACG	GTGTTGAGCCCTTTCCAG
Muc2	TGCTGTGTTGTGGATGAGA	AGGATGTTGGTGTTGTTGG
Muc3	CTACCACTCCTGCTGTCACTAC	CTCTACGCTCTCCATCACTTC

The program of PCR was as follows: 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. The primers were designed using Oligo Explorer 1.1.0 software. Gene expression was determined using the $2^{-\Delta CT}$ formula, where ΔCT = (CT target gene − CT reference gene). *RPL4* and *β-actin* were used as reference genes.

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

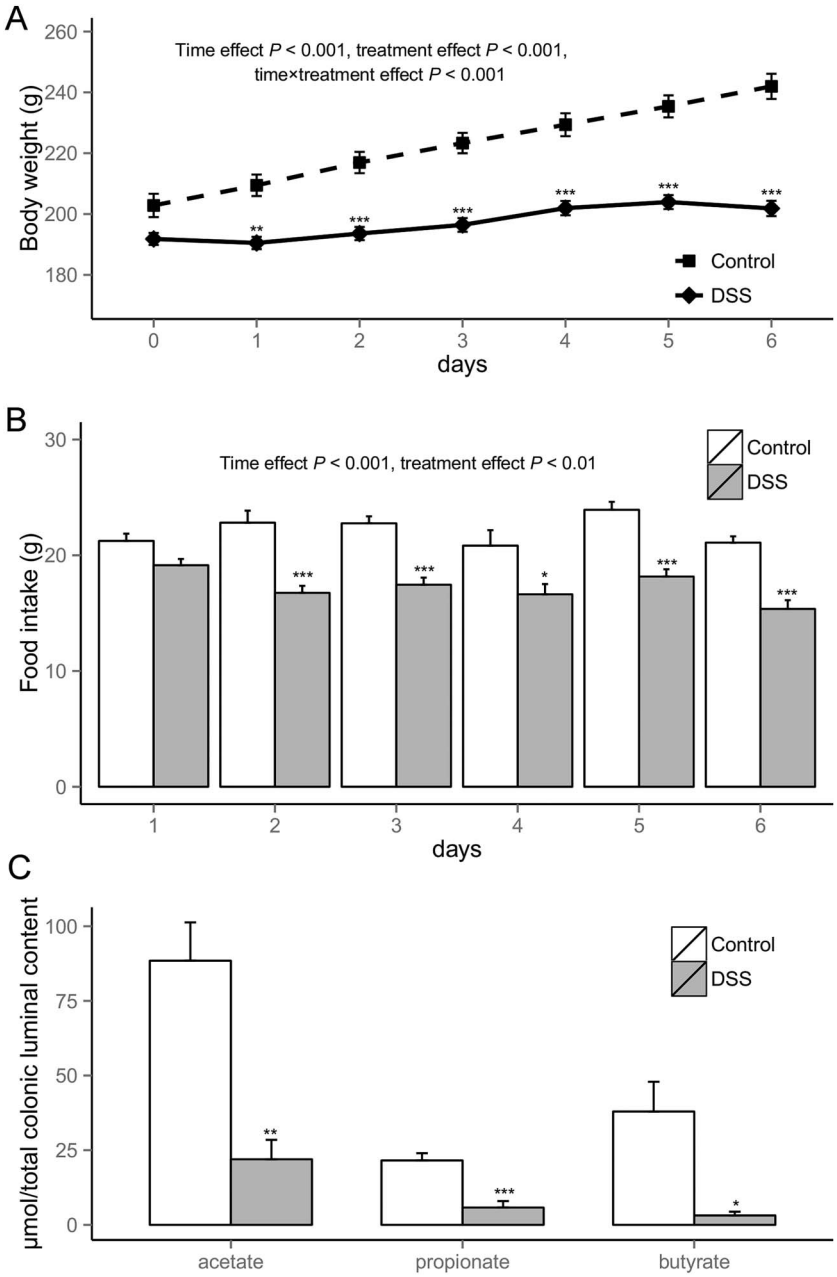


FIGURE 1. Effects of DSS on the animals' body weight and food intake and on the SCFAs in colonic luminal content. DSS was added in the drinking water of rats at day 0 up to day 6, whereas control rats received drinking water without DSS. Animals' body weight (A) and food intake (B) were measured daily. C, SCFA quantity at the end of the DSS treatment. Values are mean ± SEM of data obtained from 6 to 12 animals. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, and ***$P < 0.001$.

i.e., superficial mucosal epithelial cellular necrosis, Figure 2A (U) illustrating ulceration, i.e., extensive cellular mucosal necrosis with loss of normal crypt, and Figure 2B illustrating acute ulceration of colonic mucosa. After DSS treatment, 42% ± 7% of colonic mucosa was inflamed with the DSS treatment (Fig. 2C), as shown by Figure 2A (I) illustrating inflamed mucosa with infiltration of inflammatory cells, visible epithelium, and with or without edema.

When the colon wet weight/colon length ratio, used as an indicator of inflammation,[48] was determined in the control and the DSS groups, it revealed that this ratio was accordingly higher in DSS-treated rats (DSS group) than in untreated animals (Control group) (Fig. 2D), corresponding to the apparent thickening and shortening of colon after colitis induction (data not shown). The content of reduced glutathione GSH and of oxidized GSSG in the whole colon recovered from animals with colitis was not

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

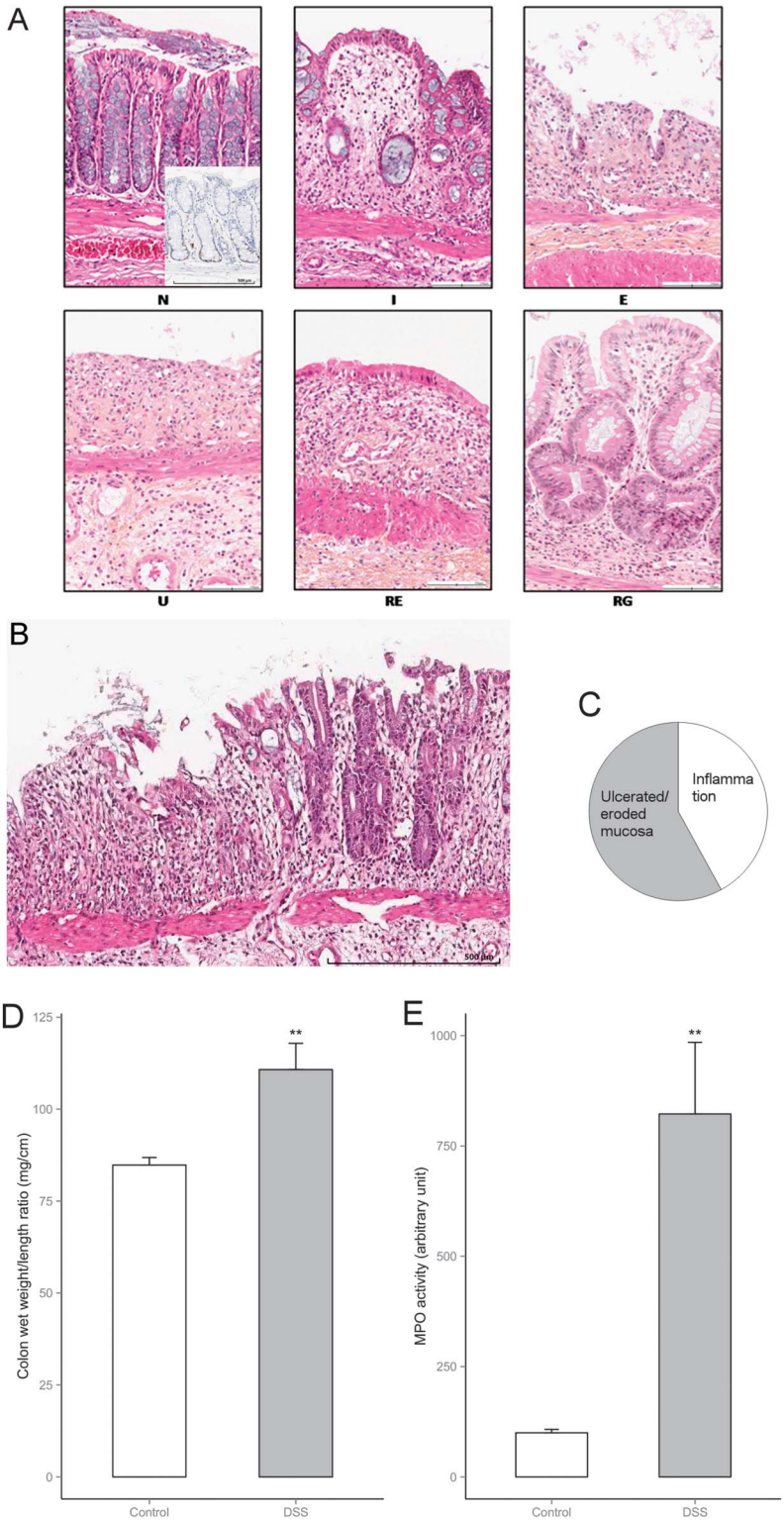


FIGURE 2. Effects of DSS on colonic mucosa histology and inflammatory indicators. A, Anatomopathological illustrations for colonic mucosa: E, erosion; I, inflammation; RE, re-epithelialization; RG, regeneration; N, normal/healthy; U, ulceration; the insert in N shows the Ki67 immunohistochemical labeling indicating cell proliferation activity in normal/healthy mucosa in the lower part of the crypt. B, Acute ulceration of colonic mucosa after DSS treatment. C, Proportion of colonic mucosa with inflammation or ulceration/erosion after DSS treatment. D, Colon wet weight/length ratio. E, Colon MPO activity. DSS was added in the drinking water of rats for 6 days, whereas control rats received drinking water without DSS. Values in (C) and (D) are mean ± SEM of data obtained from 6 to 10 animals. $^{**}P < 0.01$.

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

significantly modified when compared with healthy animals. Indeed, the GSH colonic content in control and DSS-treated animals was averaging, respectively, 23.8 ± 2.6 and 19.2 ± 4.9 μmol/g protein, whereas the GSSG colonic content was averaging 0.6 ± 0.1 and 0.9 ± 0.2 μmol/g protein in control and DSS-treated animals, respectively. Finally, the MPO activity measured in the colon tissue at the end of the DSS treatment was more than 8-fold higher than the control activity (Fig. 2E).

In the colon recovered from DSS-treated animals, the relative mRNA expression of the proinflammatory cytokines *Il-1β*, *Tnf-α*, and *Mip-2*, rat homolog of IL-8, were all markedly increased and the regulatory cytokines *Il-10* and *Tgf-β* when compared with control animals (Table 2). However, the proinflammatory cytokines' genes were overexpressed to a much higher extent than the regulatory cytokines' genes. The expression of the genes corresponding to *Muc2* and *Muc3* was, however, not significantly modified between control and DSS animals (Table 2).

Effects of an Amino Acid Mixture on MH After Colitis Induction

Effects of the Amino Acid Supplementation on Animals' Body Weight and on Colon's Luminal Content and Histopathological Aspect

After 6 days of colitis induction by DSS, rats then received drinking water without DSS but with threonine, methionine, and monosodium glutamate supplementation (DSS-AA mixture group) or with an isonitrogenous amount of alanine (DSS-Ala group). During the first 3 days of supplementation, irrespective of the supplementation received, all animals were found to diminish their body weight. Then, the body weight of animals was found to be stabilized during the next 4 days in both the experimental and control groups, before a slight increase of their body weight from day 7 to day 10 after DSS induction (data not shown). However, because of the great individual differences of body weight between animals, no significant difference was recorded between DSS-AA mixture and DSS-Ala groups.

When measured at the intermediate time after DSS induction (i.e., at day 7), the relative amount of water in the colonic luminal content after supplementation with the amino acid mixture (DSS-AA mixture group) was slightly but significantly lower (71.5 ± 1.7%, n = 8, $P < 0.05$) when compared with the value recorded in the DSS-Ala group (77.4 ± 1.2%, n = 7). The luminal colonic content weight was however similar in the DSS-AA mixture group (1.70 ± 0.20 g, n = 6) and in the DSS-Ala group (1.58 ± 0.08 g, n = 6). At day 7, the supplementation with the amino acid mixture did not increase significantly the colonic luminal content in SCFA, i.e., butyrate, acetate, and propionate, when compared with the alanine-control group (data not shown).

After 15 days, after the end of DSS treatment, the colonic mucosa was found to be fully repaired with no visible macroscopic lesions as assessed by histological examination (data not shown). Figures 3A and B illustrate typical colonic mucosa after 10-day supplementation in the DSS-Ala group (control experiment, Fig. 3A) and in the DSS-AA mixture group (Fig. 3B). The insert of Figure 3B shows the typical aspect of Ki67 immunohistochemical analysis in the colonic epithelium 10 days after colitis induction, illustrating the cellular proliferative activity not only in the lower part of the colonic crypts as in normal/healthy situation but also on the surface epithelium indicating the on-going re-epithelialization. Indeed, to repair the ulcerated/eroded mucosa, regeneration and re-epithelialization of the injury were observed during the post-DSS period, as shown by Figure 2A (RE) illustrating re-epithelialized colonic mucosa, i.e., ulceration surface colonized by epithelial cells and Figure 2A (RG) illustrating regenerated mucosa, i.e., mucosal repair neighboring ulceration with gland hyperplasia and numerous mitotic cells. As shown in Figure 3C–E, after 10-day supplementation with the amino acid mixture following colitis induction by DSS (DSS-AA mixture group), the relative length of colon mucosa with regeneration/re-epithelialization was significantly higher when compared with the control group receiving alanine (DSS-Ala group). For shorter periods of amino acid supplementation (that are 3- and 7-d supplementation period), no significant effect of supplementation with the amino acid mixture (DSS-AA mixture group) was observed on colonic mucosa histological characteristics when compared with the DSS-Ala group (data not shown). However, 3 and 7 days after colitis induction, we observed in the DSS-Ala group parts of colonic mucosa with typical regeneration/re-epithelialization, these parts averaging respectively 23% ± 7% and 55% ± 7% of the total mucosa length.

TABLE 2. Effect of DSS Treatment on Gene Expression in the Colon

	Control (n = 6)	DSS (n = 10)
Tnf-α	2.67 ± 0.6	14.61 ± 1.5[a]
Mip-2	0.38 ± 0.22	33.37 ± 12.96[b]
Il-1β	0.32 ± 0.09	5.06 ± 0.95[a]
Il-6	1.08 ± 0.25	21.88 ± 5.98[a]
Il-10	2.16 ± 0.75	4.11 ± 0.36[b]
Tgf-β	3.19 ± 0.48	6.78 ± 1.23[b]
Muc2	3.72 ± 0.6	5.49 ± 0.68
Muc3	7.04 ± 1.38	10.02 ± 1.52

The animals received drinking water containing either 5% DSS or no DSS (Control) for 6 days. The mRNA expression was determined by real-time PCR and the results were normalized with *Rpl4* mRNA. Data are expressed as mean ± SEM.
[a] $P < 0.01$.
[b] $P < 0.05$.

Effects of the Amino Acid Supplementation on the Inflammatory Indicators of the Colon

When the activity of MPO was measured at different times after DSS induction in the colon recovered from control animals

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

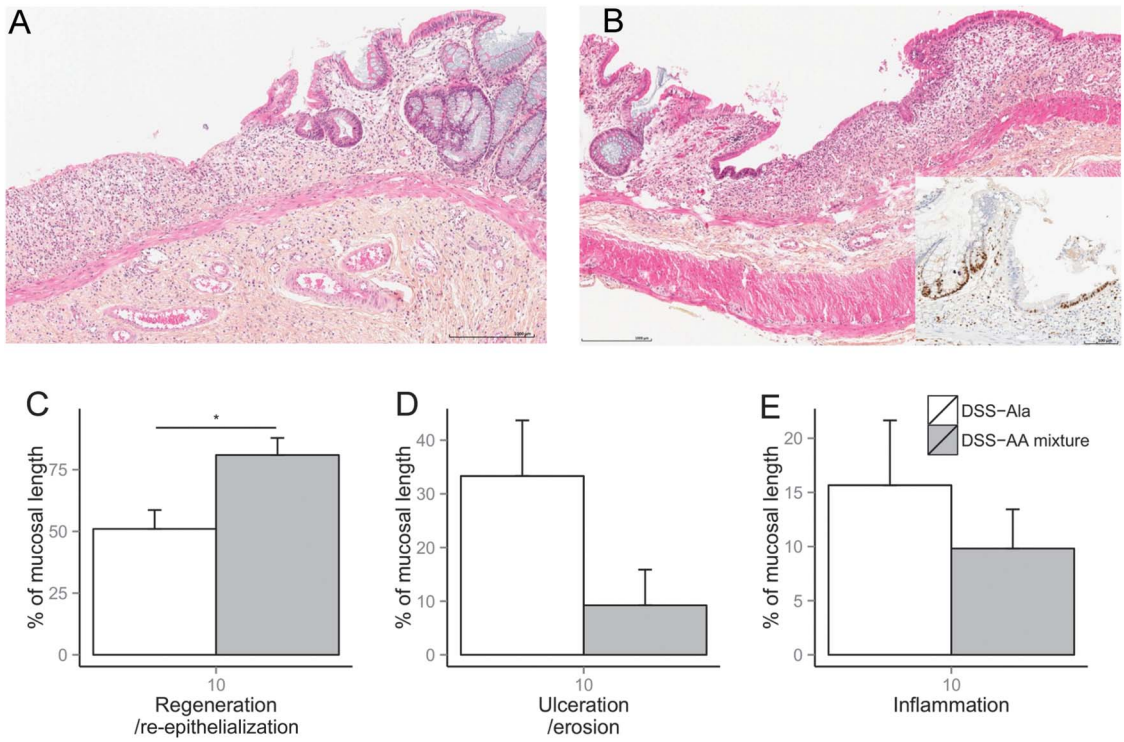


FIGURE 3. Effects of amino acid mixture supplementation 10 days after DSS induced colitis. Colitis was induced in rats by adding DSS in the drinking water for 6 days. Then, the animals received drinking water without DSS and with either a mixture of threonine, methionine, and monosodium glutamate (DSS-AA mixture) or a control isonitrogenous amount of alanine (DSS-Ala) for up to 10 days. A, Histopathological illustration of the control DSS-Ala group. B, Histopathological illustration of the control DSS-AA mixture group; the insert shows Ki67 immunohistochemical labeling indicating cell proliferation activity in colonic mucosa not only in the lower part of the crypt but also on the surface epithelium. C–E, Percentages of the colonic mucosa length are indicated with regeneration/re-epithelialization, ulceration/erosion, and inflammation, respectively. Values in (C), (D), and (E) are means ± SEM of data obtained from at least 6 animals. *$P < 0.05$.

receiving alanine, it was found that this activity was relatively high 3 days after cessation of the DSS treatment (Fig. 4A). This value was found to progressively decrease between day 3 and 10 after DSS induction. The supplementation with the amino acid mixture did not modify the evolution of MPO activity. When the colon wet weight/colon length ratio (used as an indicator of inflammation) was determined after colitis induction, it was found that this parameter progressively diminished between days 3 and 10 after DSS treatment in rats (Fig. 4B). Supplementation with the amino acid mixture (DSS-AA mixture group) did not modify the evolution of this parameter when compared with the control experiments (DSS-Ala group). Finally, cytokines' gene expression that was elevated at the time of cessation of DSS treatment was measured at different time points in the colon during the supplementation phase with the amino acid mixture or with alanine. No effect of supplementation with the amino acid mixture was observed at any time point studied (i.e., day 3, 7, and 10 after DSS induction), when compared with values obtained for the alanine-control group for *Tnf-α*, *Mip-2*, *Il-1β*, *Il-6*, *Il-10*, *Muc2*, and *Muc3* (data not shown). The only significant difference observed between the DSS-AA mixture and control DSS-Ala groups was a marked decreased (2.5-fold decrease, n = 5 in each group, $P < 0.05$) in the expression of *Tgf-β* at day 3 after supplementation with the amino acid mixture when compared with alanine supplementation.

Effects of the Amino Acid Supplementation on Protein Synthesis in Colonic Tissues After Colitis Induction

The protein FSR measured in the colonic tissues of the group DSS-Ala was doubled compared with the FSR in colonic tissues of control healthy group (Water-Ala), which had received for 6 days drinking water without DSS and then alanine for 7 days (Fig. 4C), indicating increased protein synthesis in colonic tissues in the phase of MH after colitis induction. The nutritional supplementation with the amino acid mixture after colitis induction (DSS-AA mixture group) allowed reaching a value of FSR intermediate between the values measured in healthy animals (Water-Ala) and animals with colitis receiving alanine in the MH phase after colitis induction (DSS-Ala) (Fig 4C). Accordingly, the colonic protein ASR was much higher, 7 days after colitis induction in the group DSS-Ala (121 ± 11 mg protein/d, n = 7), than in healthy control group, Water-Ala (64 ± 21 mg protein per day, n = 6). The ASR of animals receiving for 7 days after colitis induction the mixture of

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

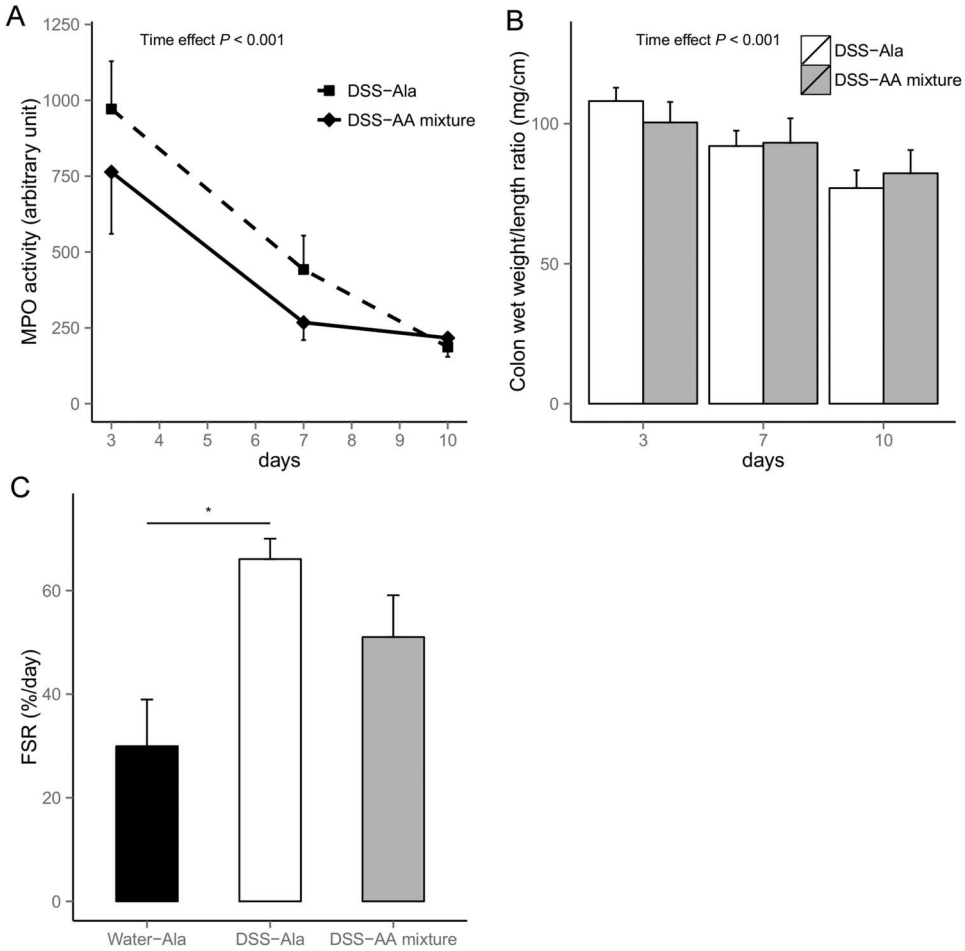


FIGURE 4. Effects of amino acid mixture supplementation after DSS induced colitis. A, Colon MPO activity. B, Colon wet weight/length ratio. C, FSR in colonic tissues. In (A) and (B), colitis was induced in rats by adding DSS in the drinking water for 6 days. Then, the animals received drinking water without DSS but with either a mixture of threonine, methionine, and monosodium glutamate (DSS-AA mixture) or a control isonitrogenous amount of alanine (DSS-Ala) for 3, 7, and 10 days. In (C), FSR was measured in colonic tissues obtained from healthy rats receiving drinking water without DSS for 6 days and then alanine supplementation for 7 days (Water-Ala group), from rats receiving DSS in their drinking water for colitis induction and then receiving alanine supplementation for 7 days in the phase of MH (DSS-Ala group), or from rats receiving DSS for colitis induction and then the amino acid mixture for 7 days in the phase of MH (DSS-AA mixture group). Values are mean ± SEM of data obtained from 6 to 8 animals. *$P < 0.05$.

amino acids as supplement (DSS-AA mixture group) was at an intermediate value (81 ± 16 mg protein per day, n = 8).

DISCUSSION

Our data support the idea that in our experimental model of colitis, amino acid supplementation increases the healing of the colonic mucosa while having little effect on the spontaneous course of inflammation resolution. The rationale for using these 3 amino acids was based (as presented in the introduction) on their individual metabolic and physiological properties toward the intestinal mucosa. Additional studies are obviously required to determine if the amino acids used act in an additive or synergistic way. Supplemental amino acids are most likely acting on the colonic mucosa through the bloodstream after absorption in the small intestine. Although the mechanisms of action by which the 3 amino acids speed up the colonic MH remain unclear (and outside the scope of this study), it can be presumed that these amino acids may be involved as a building block for intestinal protein synthesis, as fuel for anabolic pathways, and as precursor for bioactive compounds. From that point of view, it can be envisaged to incorporate additional selected amino acids in the mixture to manage both inflammation and MH.

To our knowledge, very few studies have been carried out to evaluate the role of dietary components in post-colitis MH. Indeed, most studies have focused on the effects of dietary supplementation before and/or during the induction of colitis.[39,49–52] This is related to the fact that only recently has emerged MH as a therapeutic goal that would allow diminishing the risk of relapse in patients in remission for IBD.[8]

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

In the phase of colitis induction in rats, we classically observed anorexia, slower increase of body weight, thickening and shortening of the colon, and loose luminal content with visible blood particularly in the distal part of the colon, where ulcerations were particularly important. Histological and biochemical parameters confirmed the relative severity of inflammation and major zone of ulceration in the distal colon using 5% DSS for 6 days. Both proinflammatory and regulatory cytokines were largely increased reflecting the involvement of regulatory mechanisms.[53,54] The activity of MPO was also tremendously increased in the colon reflecting neutrophil infiltration after DSS treatment. In contrast, and as previously found in patients with IBDs,[55] the expression of *Muc2* and *Muc3* genes was not significantly modified after colitis induction in a context of large epithelial erosion. Interestingly, in our model, we found that the amounts of all SCFAs in the luminal colonic content were markedly decreased, with a very drastic reduction of butyrate. These reductions are likely partly because of the shortened colonic transit time. The consequence of such drastic decrease of luminal SCFA is that colonocytes in the remaining epithelium would be largely deprived of their main fuels from luminal origin,[56] thus depending on energy substrates from arterial source (e.g., glutamate). In addition, the low amount of SCFA in the colonic content may favor the inflammatory process, as observed in our experimental model, in view of the reported capacity of SCFA to mitigate large intestine mucosal inflammation.[56,57] Surprisingly, the amount of glutathione in its reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms in inflamed colon was not affected by colitis, despite presumed intense production of reactive oxygen and nitrogen oxidative species.[58] These results that were already observed in previous studies using the model of DSS-induced colitis,[49,50,59] suggest that the colonic content in glutathione can be dissociated from regulating major inflammation, at least in this experimental model.

We observed a decrease of the relative water content in the colonic luminal content, which may correspond to an enhanced colonic absorptive capacity with the amino acid mixture supplementation. This interpretation is reinforced by the observation of a marked increase of the proportion of colonic mucosa with typical regeneration/re-epithelialization after the longest duration of supplementation (i.e., 10 d), suggesting that the amino acid mixture supplementation was able to ameliorate MH after colitis induction. Data related to protein synthesis in the colon revealed, as already observed by other research teams,[59–61] that colitis is associated with a marked increase of the protein FSR. Treatment with the amino acid mixture was able to decrease the protein synthesis rate in the colon raising the view that, as already proposed from the histological analysis performed in this study, such a dietary supplementation may ameliorate the regeneration/re-epithelialization of the colonic mucosa, therefore diminishing the overall protein synthesis in the colon.

In deep contrast with what was observed on the histological aspect of the colon mucosa, the nutritional supplementation with the amino acid mixture had no detectable effect on the process of "spontaneous" resolution of inflammation observed in control animals after 10 days. Indeed, based on both the measurement of the colon wet weight/length ratio, on the measurement of the colonic MPO activity, and on the gene expression related to inflammatory and regulatory cytokines, we found that amino acid supplementation has no measurable effect on these parameters, which are all recognized indicators of inflammation. In addition, the amino acid mixture supplementation has no effect on the expression of genes related to mucin biosynthesis.

The interpretation of such an observation is that in our experimental model, the effects of dietary supplementation on MH and inflammation can be dissociated. Importantly, we observed an increased mucosal regeneration/re-epithelialization at 3 days after colitis induction, at a time when the colon mucosa was severely inflamed, whereas no mucosal regeneration/re-epithelialization was observed at the end of the induction phase of colitis. This indicates that MH can be effectively upregulated even in a context of mucosal inflammation. This raises the possibility to act both on the intestinal mucosa inflammation (with immunomodulating pharmacological treatment) and healing (with adjuvant nutritional intervention). Such a proposition based on results obtained in our experimental model obviously requires further studies including clinical studies to possibly confirm the beneficial adjuvant effects of amino acid supplementation on intestinal MH even during active phase of inflammation of the large bowel.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to warmly thank Olivier Tibaudeau and Véronique Descatoire for expert technical help and the Ajinomoto, Co., INRA and AgroParisTech for their financial support.

REFERENCES

1. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998;115:182–205.
2. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307–317.
3. Krishnan K, Arnone B, Buchman A. Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:410–422.
4. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122:512–530.
5. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2007;132:763–786.
6. Dave M, Loftus EV Jr. Mucosal healing in inflammatory bowel disease-a true paradigm of success? *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2012;8:29–38.
7. Froslie KF, Jahnsen J, Moum BA, et al. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology*. 2007;133:412–422.
8. Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lemann M, et al. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7:15–29.
9. Rieder F, Karrasch T, Ben-Horin S, et al. Results of the 2nd scientific workshop of the ECCO (III): basic mechanisms of intestinal healing. *J Crohns Colitis.* 2012;6:373–385.
10. Feagan BG, Lemann M, Befrits R, et al. Recommendations for the treatment of Crohn's disease with tumor necrosis factor antagonists: an expert consensus report. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:152–160.
11. Klimberg VS, Salloum RM, Kasper M, et al. Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. *Arch Surg.* 1990;125:1040–1045.

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

12. Guven A, Pehlivan M, Gokpinar I, et al. Early glutamine-enriched enteral feeding facilitates colonic anastomosis healing: light microscopic and immunohistochemical evaluation. *Acta Histochem.* 2007;109:122–129.
13. Blachier F, Boutry C, Bos C, et al. Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90:814S–821S.
14. Amagase K, Ochi A, Kojo A, et al. New therapeutic strategy for amino acid medicine: prophylactic and healing promoting effect of monosodium glutamate against NSAID-induced enteropathy. *J Pharmacol Sci.* 2012; 118:131–137.
15. Darcy-Vrillon B, Morel MT, Cherbuy C, et al. Metabolic characteristics of pig colonocytes after adaptation to a high fiber diet. *J Nutr.* 1993;123: 234–243.
16. Duee PH, Darcy-Vrillon B, Blachier F, et al. Fuel selection in intestinal cells. *Proc Nutr Soc.* 1995;54:83–94.
17. Ardawi MS, Newsholme EA. Fuel utilization in colonocytes of the rat. *Biochem J.* 1985;231:713–719.
18. Potten CS. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol.* 1997;273:G253–G257.
19. Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, et al. Enteral glutamate is the preferential source for mucosal glutathione synthesis in fed piglets. *Am J Physiol.* 1997;273:E408–E415.
20. Roediger WE, Babidge W. Human colonocyte detoxification. *Gut*. 1997; 41:731–734.
21. Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.* 2006;7:271–275.
22. Kemp M, Go YM, Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/ disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:921–937.
23. Higashiguchi T, Noguchi Y, Meyer T, et al. Protein synthesis in isolated enterocytes from septic or endotoxaemic rats: regulation by glutamine. *Clin Sci (Lond).* 1995;89:311–319.
24. Le Bacquer O, Laboisse C, Darmaun D. Glutamine preserves protein synthesis and paracellular permeability in Caco-2 cells submitted to "luminal fasting". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285: G128–G136.
25. Stoll B, Henry J, Reeds PJ, et al. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J Nutr.* 1998;128:606–614.
26. Schaart MW, Schierbeek H, van der Schoor SR, et al. Threonine utilization is high in the intestine of piglets. *J Nutr.* 2005;135:765–770.
27. Faure M, Moennoz D, Montigon F, et al. Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. *J Nutr.* 2005;135: 486–491.
28. Fogg FJ, Hutton DA, Jumel K, et al. Characterization of pig colonic mucins. *Biochem J.* 1996;316:937–942.
29. Law GK, Bertolo RF, Adjiri-Awere A, et al. Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292:G1293–G1301.
30. Hamard A, Mazurais D, Boudry G, et al. A moderate threonine deficiency affects gene expression profile, paracellular permeability and glucose absorption capacity in the ileum of piglets. *J Nutr Biochem.* 2010;21:914–921.
31. Mao X, Zeng X, Qiao S, et al. Specific roles of threonine in intestinal mucosal integrity and barrier function. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3: 1192–1200.
32. Wang X, Qiao S, Yin Y, et al. A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young pigs. *J Nutr.* 2007;137:1442–1446.
33. Gersemann M, Becker S, Kubler I, et al. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation*. 2009;77:84–94.
34. Remond D, Buffiere C, Godin JP, et al. Intestinal inflammation increases gastrointestinal threonine uptake and mucin synthesis in enterally fed minipigs. *J Nutr.* 2009;139:720–726.
35. Riedijk MA, Stoll B, Chacko S, et al. Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:3408–3413.
36. Shoveller AK, Brunton JA, Pencharz PB, et al. The methionine requirement is lower in neonatal piglets fed parenterally than in those fed enterally. *J Nutr.* 2003;133:1390–1397.
37. Bauchart-Thevret C, Stoll B, Chacko S, et al. Sulfur amino acid deficiency upregulates intestinal methionine cycle activity and suppresses epithelial growth in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296: E1239–E1250.
38. Shoveller AK, Stoll B, Ball RO, et al. Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *J Nutr.* 2005;135:1609–1612.
39. Faure M, Mettraux C, Moennoz D, et al. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. *J Nutr.* 2006;136:1558–1564.
40. Boutry C, Matsumoto H, Airinei G, et al. Monosodium glutamate raises antral distension and plasma amino acid after a standard meal in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300:G137–G145.
41. Chevalier L, Bos C, Gryson C, et al. High-protein diets differentially modulate protein content and protein synthesis in visceral and peripheral tissues in rats. *Nutrition*. 2009;25:932–939.
42. Chevalier L, Bos C, Azzout-Marniche D, et al. Dietary protein regulates hepatic constitutive protein anabolism in rats in a dose-dependent manner and independently of energy nutrient composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299:R1720–R1730.
43. Chevalier L, Bos C, Azzout-Marniche D, et al. Energy restriction only slightly influences protein metabolism in obese rats, whatever the level of protein and its source in the diet. *Int J Obes (Lond).* 2013;37:263–271.
44. Kristensen NB, Pierzynowski SG, Danfaer A. Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intraruminally infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate. *J Anim Sci.* 2000;78:1372–1379.
45. Ostuni MA, Issop L, Peranzi G, et al. Overexpression of translocator protein in inflammatory bowel disease: potential diagnostic and treatment value. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1476–1487.
46. Kerr TA, Ciorba MA, Matsumoto H, et al. Dextran sodium sulfate inhibition of real-time polymerase chain reaction amplification: a poly-A purification solution. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:344–348.
47. de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One*. 2007;2:e898.
48. Ogawa A, Andoh A, Araki Y, et al. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol.* 2004;110:55–62.
49. Lara-Villoslada F, Debras E, Nieto A, et al. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clin Nutr.* 2006;25:477–488.
50. Lenoir L, Rossary A, Joubert-Zakeyh J, et al. Lemon verbena infusion consumption attenuates oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *Dig Dis Sci.* 2011;56:3534–3545.
51. Sprong RC, Schonewille AJ, van der Meer R. Dietary cheese whey protein protects rats against mild dextran sulfate sodium-induced colitis: role of mucin and microbiota. *J Dairy Sci.* 2010;93:1364–1371.
52. Tsune I, Ikejima K, Hirose M, et al. Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in the rat. *Gastroenterology*. 2003;125:775–785.
53. Dharmani P, Leung P, Chadee K. Tumor necrosis factor-alpha and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PLoS One*. 2011;6:e25058.
54. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg.* 1998;22:382–389.
55. Weiss AA, Babyatsky MW, Ogata S, et al. Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues. *J Histochem Cytochem.* 1996;44:1161–1166.
56. Thibault R, Blachier F, Darcy-Vrillon B, et al. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:684–695.
57. Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13:2826–2832.
58. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16:1997–2015.
59. Mercier S, Breuille D, Mosoni L, et al. Chronic inflammation alters protein metabolism in several organs of adult rats. *J Nutr.* 2002;132:1921–1928.
60. El Yousfi M, Breuille D, Papet I, et al. Increased tissue protein synthesis during spontaneous inflammatory bowel disease in HLA-B27 rats. *Clin Sci (Lond).* 2003;105:437–446.
61. Heys SD, Park KG, McNurlan MA, et al. Protein synthesis rates in colon and liver: stimulation by gastrointestinal pathologies. *Gut*. 1992;33:976–981.

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Discussion générale et perspectives

7 Discussion générale et perspectives

7.1 Effets du régime hyperprotéique sur le microbiote, le métabolisme des colonocytes et le métabolisme de l'hôte

7.1.1 Microbiote et régime hyperprotéique

L'utilisation d'outils de biologie moléculaire a permis de mieux mettre en lumière l'influence de l'alimentation sur la composition du microbiote intestinale. Nous avons constaté que dans le modèle de rat nourri pendant deux semaines avec un régime riche en protéines, la composition et la diversité du microbiote caecal et colique ont été modifiées. Cette modification est probablement le reflet d'une adaptation conséquente de l'écosystème microbien consécutive à l'arrivée plus importante de protéines et de peptides dans le gros intestin. En effet, le groupe *Clostridium coccoides* et le groupe *Clostridium leptum* sont des groupes majeurs du phylum *Firmicutes*, et sont réduits fortement dans le contenu du gros intestin suite au régime hyperprotéique, alors que le groupe *Bacteroides fragilis* reste inchangé. Nous pouvons faire l'hypothèse que le ratio *Firmicutes*/*Bacteroides* est diminué dans le cas d'un régime hyperprotéique. Par ailleurs, nous avons observé que le gain de poids des animaux ayant suivi le régime hyperprotéique est beaucoup moins important par rapport aux animaux témoins recevant un régime équilibré, confirmant l'effet amaigrissant d'un tel régime. Nos résultats sont cohérents avec les données publiées précédemment par l'équipe de Gordon J.I. révélant que ce ratio est augmenté chez les obèses et qu'il est diminué après un régime hypocalorique amaigrissant pauvre en glucides ou en lipides chez les même sujets (Ley et al., 2006). Cependant, il est important de noter que le lien entre le ratio *Firmicutes*/*Bacteroides* et l'obésité est controversé dans d'autres études. La baisse supposée de ce ratio dans le cas du régime hyperprotéique est une extrapolation, qui nécessite d'autres études incluant d'autres groupes majeurs du phylum *Bacteroidetes* comme le *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* spp.(Bervoets et al., 2013).

L'analyse de la composition du microbiote par la DGGE-PCR nous a confirmé la réduction de plusieurs groupes de *Clostridium* dans le contenu caecal et colique. Nos résultats ont montré que la modification du microbiote intervient également au niveau de l'espèce, en plus du changement au niveau des grands groupes bactériens. En effet, nous avons observé que la prévalence de *Bacteroides vulgatus* dans le contenu caecal est augmentée avec le régime hyperprotéique. *B. vulgatus* fait partie du groupe *Bacteroides fragilis*; et pourtant, la quantité de ce groupe n'est pas augmentée quand on se réfère aux résultats obtenus par la PCR en temps réel quantitative.

B. vulgatus est une espèce potentiellement pathogène. En effet, le groupe *B. fragilis* est un des groupes de pathogènes les plus importants dans les infections polymicrobiennes (Aldridge et al., 2003; Appleman et al., 1991; Brook, 1989). Dans ces infections cliniques, *B. vulgatus* est présent dans 7% des cas par rapport aux autres membres du groupe *B. fragilis* (Brook, 1989). Cependant, sa

proportion relative apparaît être réduite dans le microbiote fécal des patients souffrant de diabète de type 2 (Wu et al., 2010) et des enfants/adolescents obèses (Bervoets et al., 2013).

La prévalence d'autres bactéries, comme *Bacteroides dorei* et les bactéries du genre *Fusobacterium* présente des variations contradictoires dans le contenu caecal versus colique : elle est augmentée dans le contenu caecal mais est diminuée dans le contenu colique. *B. dorei* est une espèce nouvellement identifiée (Bakir et al., 2006) en tant que membre du genre *Bacteroides*. Il n'y a cependant pas encore de données cliniques disponibles sur cette espèce. Par ailleurs, la surabondance de *Fusobacterium* dans les biopsies rectales des patients avec des adénomes et des carcinomes colorectaux par rapport aux sujets sains a été rapportée (Castellarin et al., 2012; Kostic et al., 2012; Marchesi et al., 2011; McCoy et al., 2013). Ces bactéries sont donc suspectées d'être associées au cancer colorectal, mais leurs rôles dans l'étiologie des adénocarcinomes colorectaux doivent encore être investigués.

Nos résultats montrent que le changement de la composition du microbiote au niveau de l'espèce observé, suite à la consommation du régime hyperprotéique, peut être différent selon le segment du gros intestin. Ces changements pourraient avoir des conséquences sur la physiologie et la physiopathologie de l'hôte. De manière intéressante, la biodiversité du microbiote caecal et colique est modifiée en conséquence. La diversité et la richesse de l'écosystème microbien au niveau du côlon sont réduites par l'ingestion du régime riche en protéines. La réduction de la diversité est généralement considérée comme non favorable pour un écosystème. On peut formuler une nouvelle hypothèse de travail selon laquelle le régime hyperprotéique créerait des conditions favorables au développement d'épisodes inflammatoires chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin en rémission, notamment à travers l'altération du microbiote. On peut trouver quelques éléments dans la littérature scientifique étayant cette hypothèse. En effet, il a été rapporté que la diversité du microbiote fécal chez les patients souffrant de la maladie de Crohn est réduite (Manichanh et al., 2006) et que le niveau de consommation de protéines apparaît comme un facteur associé au risque de rechute chez les patients souffrant de recto-colite hémorragique en rémission (Jowett et al., 2004). Un autre élément de support vient de nos résultats : nous avons en effet observé que la concentration du *Faecalibacterium prausnitzii* dans le contenu du gros intestin (caecum et côlon) est significativement réduite suite à la consommation du régime hyperprotéique. Comme décrit précédemment dans la partie 3.1.1 de l'introduction bibliographique, *F. prausnitzii* est considéré comme possédant des propriétés anti-inflammatoires dans le contexte des MICI (Sokol et al., 2008; Sokol et al., 2009). Globalement donc, plusieurs éléments convergent, mais de nouvelles investigations sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Nous pourrions par exemple nourrir les animaux avec un régime NP ou HP pendant 15 jours, puis tester les effets du DSS utilisé en dose modérée sur l'intensité de la colite.

Les modifications de la composition et de la diversité du microbiote suite à la consommation du régime hyperprotéique sont compatibles avec des résultats récemment publiés dans la littérature scientifique, montrant que le microbiome varie entre les populations en fonction des différences culturelles et socio-économiques, que ce soit au niveau phylotypique ou fonctionnel (Yatsunenko et

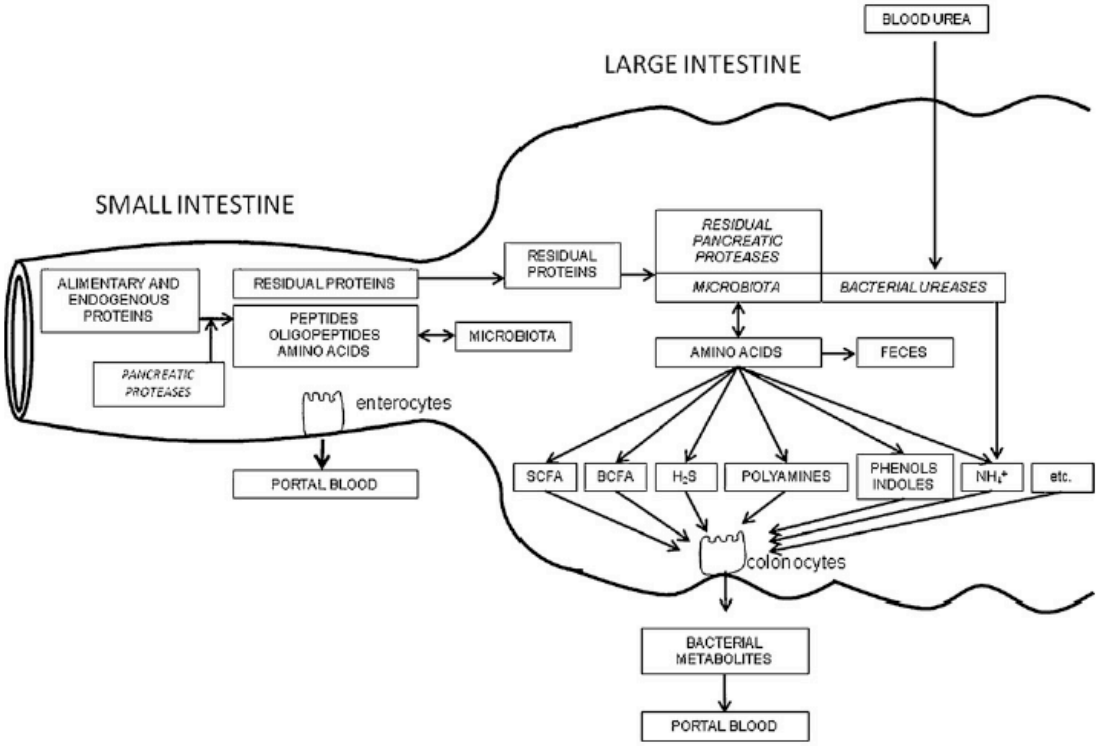
al., 2012). Une autre étude très récente (Cotillard et al., 2013) sur l'impact d'un régime amaigrissant sur les personnes obèses et en surpoids a rapporté une amélioration de la richesse en gènes du microbiote des sujets obèses ayant subi une modification nutritionnelle. De fait, la richesse des gènes du microbiote a été montrée réduite chez les personnes obèses (par rapport à celles non obèses) et ce défaut de richesse a été mis en relation (corrélation) avec un statut défavorable de marqueurs métaboliques tels que l'adiposité, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'état inflammatoire (Le Chatelier et al., 2013). Ainsi, des analyses métagénomiques sur l'impact du régime riche en protéines sur le microbiote pris en tant qu'entité fonctionnelle seraient très intéressantes pour comprendre l'adaptation de ce dernier d'une façon plus globale. Une surreprésentation des gènes codant des enzymes de dégradations des acides aminés, tels que glutamine, aspartate, proline, ornithine et lysine, dans le catabolisme des sucres simples et dans le métabolisme des sels biliaires a été montrée au sein du microbiote de sujets américains (Yatsunenko et al., 2012). L'alimentation des américains étant décrite comme riche en protéines, sucres simples et lipides, ces résultats pourraient refléter l'adaptation fonctionnelle du microbiote à un tel type d'alimentation. Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que dans le cas d'un régime riche en protéines, mais avec un apport lipidique normal, il y aurait également un changement au niveau fonctionnel du microbiote chez l'homme. Ceci nous semble aussi constituer un champ d'investigation très intéressant pour le futur.

7.1.2 Colonocytes et métabolisme des métabolites bactériens

La fermentation, par le microbiote, des acides aminés dans le côlon est un processus complexe (Figure 16), qui implique des produits intermédiaires comme les acides organiques, tels que le succinate, le formate, le lactate et l'éthanol, et aboutit à des produits finaux de la fermentation bactérienne principalement les acides gras à chaîne courte (AGCC) acétate, propionate et butyrate. Dans notre étude, nous avons observé que la quantité totale d'AGCC produite après l'ingestion du régime hyperprotéique est beaucoup plus importante en comparaison avec le groupe témoin, que ce soit dans le contenu luminal caecal ou colique. En ce qui concerne les produits intermédiaires de la fermentation bactérienne, ils sont également augmentés par la consommation du régime hyperprotéique dans le contenu luminal colique, et dans un degré moindre dans le contenu caecal.

La fermentation bactérienne des acides aminés dans le gros intestin est déterminée en partie par la concentration du substrat et par la concentration des bactéries et leurs activités métaboliques (Ou et al., 2013). Dans le cas du régime hyperprotéique, on peut supposer que la concentration du substrat, en l'occurrence les acides aminés, est plus élevée puisqu'une partie, loin d'être négligeable, des protéines et des peptides échappent à la digestion dans l'intestin grêle et passent la jonction iléo-caecale (Bos et al., 2005). Les quantités d'AGCC produits sont augmentées alors que leurs concentrations sont quasiment inchangées. En même temps, nos résultats ont montré que les concentrations de certaines bactéries productrices d'AGCC, comme le groupe bactérien *C. coccoides* et *F. prausnitzii*, sont diminuées. Pour mettre en relation ces différents éléments, il reste à déterminer si le maintien de la concentration des AGCC est dû au remaniement de l'écosystème microbien en régulant sa composition microbienne ou à la dilution des composés luminaux dans la lumière du gros

Figure 16. Schéma du métabolisme global des protéines dans l'intestin grêle et le gros intestin.



Selon Davila AM et al. Pharmacological Research 68 (2013) 95– 107.

intestin suite à l'augmentation de la masse des contenus coliques, ou à l'ensemble de ces deux phénomènes. La résultante joue potentiellement un rôle crucial sur sa physiologie, notamment en ce qui concerne le butyrate (cf. la partie 3.3 de l'introduction bibliographique).

En effet, face à cette augmentation très importante en quantité totale des produits intermédiaires et finaux de la fermentation bactérienne des acides aminés suite à l'ingestion du régime hyperprotéique, nous observons que le poids du contenu luminal du gros intestin, que ce soit caecal ou colique, est fortement augmenté après l'ingestion du régime hyperprotéique. Cette augmentation est imputée en grande partie à l'augmentation de la teneur en eau du contenu luminal (Andriamihaja et al., 2010). On ne connaît toutefois pas le mécanisme exact mis en place par l'hôte pour expliquer cette rétention d'eau dans la lumière du gros intestin. Nos résultats indiquent que cette rétention d'eau n'est pas due à la modification de l'expression des transporteurs Na des colonocytes. Un métabolite bactérien augmenté à l'issu de la fermentation des acides aminés, l'ammonium, est capable d'inhiber l'absorption Na par les colonocytes (Cermak et al., 2000; Mouille et al., 2004); et ce phénomène pourrait expliquer en partie les résultats observés. La mesure de l'expression des aquaporines dans les colonocytes pourrait être pertinente.

Nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle l'augmentation du contenu luminal du gros intestin résulterait d'une interaction hôte-microbiote permettant de faire face à l'augmentation de la production des acides gras à chaîne courte par le microbiote intestinal après l'ingestion du régime hyperprotéique. En d'autres termes, de telles modifications permettraient de maintenir constantes les concentrations d'acides gras à chaîne courte (notamment le butyrate dont on connaît son rôle de substrats énergétiques des colonocytes et son rôle dans l'expression génique dans ces cellules).

Ainsi, la concentration des AGCC dans la lumière du gros intestin est maintenue et l'absorption de ces derniers par les colonocytes ne devrait donc pas être modifiée. C'est effectivement ce que nos résultats nous suggèrent puisque l'expression des transporteurs d'AGCC, i.e. MCT1 et SMCT1, n'est pas modifiée et que l'excrétion fécale des acides gras à courte chaîne est augmentée.

D'un point de vu global, le microenvironnement du gros intestin est un écosystème dynamique qui implique l'hôte et le microbiote. Dans le cas du régime hyperprotéique, la surabondance de substrat pour la fermentation microbienne (en l'occurrence les acides aminés) vient modifier l'équilibre de cet écosystème. Nous faisons l'hypothèse que l'hôte et le microbiote agissent en interaction à travers différentes stratégies d'action afin de maintenir cette homéostasie, mais avec en contrepartie une augmentation de l'excrétion des acides gras à chaîne courte.

7.1.3 AGCC et leur rôle dans l'obésité

L'absorption des AGCC et leur transformation subséquente en triglycérides dans le foie ont été proposées comme expliquant en partie les effets du microbiote sur l'obésité (cf. la partie 3.1.2 de l'introduction bibliographique). En effet, le « microbiote des obèses » a plus de capacité à dégrader les polysaccarides et par conséquent, la concentration des AGCC, en particulier butyrate et acétate, (μmol par g de contenu humide) dans la lumière caecale est plus élevée chez les souris obèses

(Turnbaugh et al., 2006). Et conjointement, l'énergie restante dans les fèces est moins importante chez ces dernières.

Or en plus des polysaccarides, les acides aminés sont aussi des substrats potentiels pour la fermentation microbienne qui aboutit à la production des AGCC. Nos résultats indiquent bien que la fermentation des acides aminés est également une source d'AGCC dans la lumière du gros intestin. De plus, en ce qui concerne les acides gras à chaîne branchée (AGCB), ces produits finaux de la fermentation sont issus exclusivement de la fermentation des acides aminés branchés et représentent donc un témoin de la fermentation des protéines par le microbiote. En effet, la concentration des AGCB dans le contenu luminal du gros intestin des rats après l'ingestion du régime hyperprotéique est 2 à 3 fois plus élevée dans celui du côlon et d'un degré moindre dans celui du caecum. Toutefois, comme discuté ci-dessus, la concentration des AGCC n'est pas modifiée par ce régime que ce soit dans le contenu luminal caecal ou le contenu colique.

Nous avons observé en même temps que l'énergie sous forme d'AGCC dans les fèces des rats ayant reçu du régime hyperprotéique est deux fois plus élevée. Cependant, en terme relatif, cette excrétion d'AGCC ne représente qu'environ 0,1% de l'énergie ingérée. Etant donné que le gain de poids corporel est beaucoup moins élevé chez les rats recevant un régime hyperprotéique, il serait important de mesurer au cours de futures expérimentations l'énergie totale restante dans les fèces en utilisant une bombe calorimétrique, ce qui permettrait de déterminer si la perte d'énergie dans les fèces est plus importante en cas de régime hyperprotéique.

7.2 Effets des acides aminés sur la cicatrisation colique post-colite

Hormis leur qualité de nutriment, les acides aminés peuvent jouer des rôles très importants au niveau de la muqueuse colique. Ainsi nous nous sommes intéressés aux effets d'un mélange d'acides aminés (thréonine, méthionine et glutamate) sur la cicatrisation de la muqueuse colique après une colite induite par le DSS (dextran sodium sulfate), un modèle de colite souvent utilisé pour étudier les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

7.2.1 Hypothèses sur le mécanisme d'action du mélange d'acides aminés sur la cicatrisation

Effet direct du mélange d'acides aminés

L'intestin grêle ayant une forte capacité d'absorption des acides aminés, et étant a priori peu touché par le traitement DSS, nous supposons que le mélange d'acides aminés (thréonine, méthionine et glutamate) administré par la voie entérale chez les rats dans notre étude est quasiment entièrement absorbé au niveau de l'intestin grêle et qu'il n'y en a pas/peu qui arrivent dans le côlon. De plus, le côlon n'est pas supposé être capable d'absorber les acides aminés mis à part dans la période

néonatale. Ainsi, ces acides aminés sont très probablement apportés à la muqueuse colique par la circulation sanguine.

- Thréonine

La thréonine est un acide aminé indispensable qui est fortement utilisé pour la synthèse protéique dans la muqueuse intestinale. De plus la thréonine représente l'acide aminé le plus abondant dans les mucines intestinales. Les souris déficientes en Muc2 développent une colite plus intense quand elles sont traitées par le DSS (Van der Sluis et al., 2006). Et la Muc3, qui possède des domaines extracellulaires riche en cystéine, stimule la migration cellulaire *in vitro* et réduit l'ulcération de la muqueuse intestinale chez les souris recevant du DSS (Ho et al., 2006). De plus, la restriction en thréonine alimentaire diminue la synthèse de mucines coliques chez les rats sans modifier la synthèse protéique de la muqueuse (Faure et al., 2005).

Cependant, nous n'avons pas observé de différences significatives au niveau de l'expression des ARNm de Muc2 et Muc3 dans la muqueuse colique des rats avec une colite aiguë induite par le DSS. Les travaux menés par M. Faure et ses collègues (Faure et al., 2003) ont montré que les niveaux d'ARNm de Muc2 et Muc3 ont été augmentés au niveau du côlon dans un modèle de colite chronique induite par le DSS, mais le taux de synthèse protéique fractionnel (FSR) des mucines n'a pas été affecté. Toutefois, notre étude et celle de Faure M. et al. n'ont pas utilisé la même souche de rat, ni la même durée/cycle d'administration de DSS. Il reste donc très difficile de les comparer étant donné que l'état de la colite varie énormément selon la souche de l'animal modèle et la durée utilisées (cf. la partie 4.5 de l'introduction bibliographique).

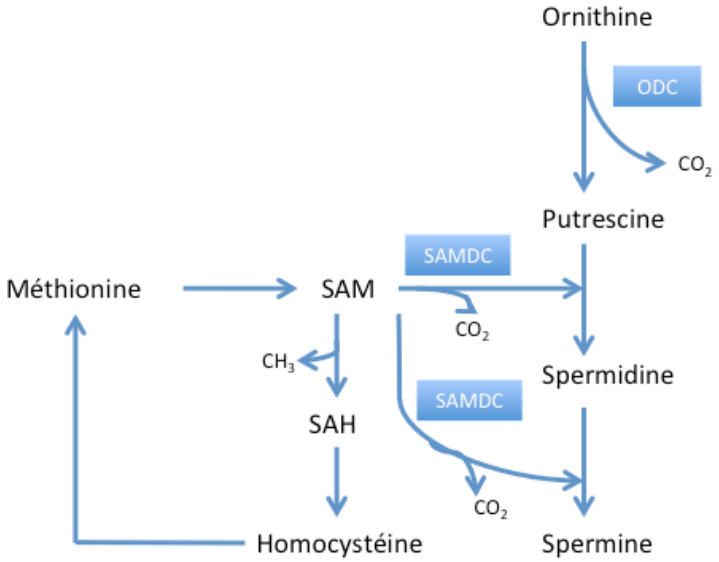
Il est cependant possible que la production de mucines soit principalement stimulée au niveau de la traduction sans que le niveau d'ARNm ne soit fortement modifié. De fait, la restriction en thréonine alimentaire n'affecte pas le niveau d'ARNm des mucines, mais réduit leur taux de synthèse (Faure et al., 2005).

- Méthionine

La méthionine est un acide aminé soufré indispensable qui est un précurseur de cystéine dans de nombreux tissus de l'organisme. Un rôle important de la cystéine est son incorporation dans le glutathion en fournissant le groupement thiol (-SH). La synthèse du glutathion peut être limitée par la disponibilité de cystéine intracellulaire (Lu, 1999). Dans notre modèle de colite expérimentale aigüe, nous n'avons pas constaté de changement du ratio GSH/GSSG dans la muqueuse colique, malgré qu'il soit généralement admis que le stress oxydant soit associé à l'inflammation (cf. la partie 4.3.2 de l'introduction bibliographique). Cependant, les études chez les patients atteints de MICI ont montré des résultats divergents (Kruidenier et al., 2003; Szanto et al., 2005; Tsunada et al., 2003).

Il est possible que les enzymes impliquées dans le stress oxydant soient modulées par la supplémentation en méthionine. Par exemple, la L-arginine est le substrat commun pour la NOS et

Figure 17. Méthionine et synthèse des polyamines.



ODC : ornithine décarboxylase; SAMDC: S-adenyl-L-méthionine décarboxylase.

Modifiée selon Johnson, L. R. and S. A. McCormack 1999, News Physiol Sci 14: 12-17 ; Shoveller, A. K., et al. J Nutr 2005,135(7): 1609-1612.

l'arginase (Figure 3B). Cette dernière convertit l'arginine en ornithine et urée. L'ornithine est à son tour converti en putrescine par l'ornithine décarboxylase. La putrescine est une diamine qui peut être converti en polyamines dans des étapes métaboliques impliquant la méthionine (Figure 17). En effet, pour la synthèse des polyamines, la première étape est la production de putrescine à partir de l'ornithine catalysée par l'enzyme l'ornithine décarboxylase (ODC). Ensuite, la putrescine est convertie en spermidine, qui est à son tour convertie en spermine par l'ajout d'un groupement propylamine à chaque fois fourni par la S-adenosylméthionine (SAM) sous l'action de l'enzyme S-adenosyl-L-méthionine décarboxylase (SAMDC). La SAM est produite à partir de la méthionine lors de la transméthylation pour la production de l'homocystéine. L'expression et l'activité de la SAMDC mériteraient d'être explorées pour une éventuelle implication dans les phénomènes de cicatrisation de la muqueuse intestinale.

L'arginine est donc le précurseur commun du radical NO (convertible en peroxynitrite qui est un oxydant fort) et des polyamines qui exercent des effets bénéfiques sur la cicatrisation de la muqueuse intestinale. En effet, les polyamines sont capables de stimuler la migration des cellules intestinales *in vitro* (Rao et al., 1999; Ray et al., 2003) ; d'accélérer la cicatrisation gastrique et duodénale des ulcères induites par le stress chez le rat (Wang and Johnson, 1990, 1992) ; d'améliorer la cicatrisation de l'intestin grêle sur un modèle d'ischémie intestinal transitoire chez les rats (Duranton et al., 1998). Il serait intéressant de rajouter des polyamines dans le mélange d'acides aminés afin de tester une efficacité éventuellement meilleure du mélange par rapport aux acides aminés seuls.

Les activités des autres enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydant, comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutahion peroxidase (GPx) seraient également intéressantes à étudier pour mieux comprendre le statut rédox dans la cicatrisation intestinale dans les MICI. Il a été montré que l'activité plasmatique de la GPx est augmentée sur le modèle de colite induite par le DSS (Tham et al., 2002), mais peu de données existent concernant la SOD et la catalase.

- Glutamate

Le glutamate est largement métabolisé par les cellules de l'épithélium intestinal soit pour la synthèse protéique soit pour être oxydé afin de produire de l'énergie. Il est possible que l'effet de la supplémentation en cet acide aminé sur la cicatrisation de la muqueuse colique soit principalement dû à son rôle de substrat oxydatif énergétique dans un contexte de cicatrisation correspondant à un fort anabolisme.

Enfin, il est possible que ces 3 acides aminés agissent en synergie et non par simple effet additif, mais nos expériences ne permettent pas de le savoir et de nouvelles expériences sont nécessaires pour élucider cette question.

Effet indirect du mélange : rôle des facteurs peptidiques

Dans le modèle de colite induite par le DSS, le niveau d'expression de l'ARNm du TGF-β est environ 2 fois plus élevé par rapport au niveau normal. Ce résultat est en accord avec ce qu'on obtient chez les patients atteints de la maladie de Crohn, dont le niveau de l'ARNm du TGF-β a été rapporté plus élevé dans la partie de muqueuse intestinale subissant un rétrécissement (Di Sabatino et al., 2009). Cependant, nous avons trouvé que le niveau d'expression du TGF-β est significativement diminué, 3 jours post-colite, lors de la phase de la cicatrisation chez le groupe DSS-AA mixture et revient au niveau similaire de celui du groupe contrôle DSS-Ala 7 jours et 10 jours post-colite. Cela suppose que la stimulation de la cicatrisation par l'administration du mélange d'acides aminés ne passe pas par les voies impliquant le TGF-β dans ce laps de temps. Le TGF-β est connu pour stimuler la migration cellulaire lors de la restitution (Dignass and Podolsky, 1993) et pour inhiber en même temps la prolifération des cellules (Ko et al., 1998).

Les facteurs peptidiques TFF (Trefoil Peptides) sont présents en général dans la lumière intestinale et interagissent avec les cellules épithéliales sur le côté apical de ces dernières (Taupin and Podolsky, 2003; Wong et al., 1999). Il a été proposé que les TFF stimulent la cicatrisation épithéliale via des mécanismes distincts de ceux activés par d'autres facteurs peptidiques et indépendants du TGF-β (Dignass et al., 1994). De plus, les souris knockout des gènes codant le TFF3/ITF ont une colite induite par le DSS plus exacerbée que les souris de type sauvage (Mashimo et al., 1996) et l'injection intraveineuse de TFF3 exogène est protectrice contre le DSS (Kjellev et al., 2007). Ainsi, l'effet du mélange d'acides aminés sur la cicatrisation de la muqueuse colique post-colite pourrait impliquer les TFF, et de futures investigations nous donneraient des éclaircissements en la matière.

7.2.2 D'autres pistes de supplémentation nutritionnelle

Dans notre étude, nous avons utilisé une seule dose de chaque acide aminé dans le mélange en nous basant sur les niveaux utilisés dans la littérature notamment dans le modèle rat avec colite chimio-induite. Il serait intéressant de réaliser une étude qui permettrait de connaître les doses permettant une cicatrisation optimale, mais cela nécessiterait d'utiliser un grand nombre d'animaux avec d'éventuelles difficultés vis-à-vis du Comité d'Ethique animale. En plus des acides aminés, il serait bien d'étudier la combinaison de ceux-ci avec d'autres nutriments susceptibles d'améliorer la cicatrisation de la muqueuse intestinale, voire d'améliorer la cicatrisation et diminuer l'inflammation en même temps ; sachant que la cicatrisation est probablement plus efficace quand le niveau d'inflammation n'est pas trop sévère.

L'administration de fibres alimentaires ou de probiotiques pour restaurer les teneurs en acides gras à chaîne courte dans le contenu luminal colique (fortement abaissées dans la colite chimio-induite) et la mesure des conséquences sur la colite mériteraient d'être entreprise. De fait, il a été rapporté que la consommation d'amidon résistant réduit la sévérité de colite induite par le DSS chez les souris (Le Leu et al., 2013). La piste des probiotiques peut aussi être intéressante compte tenu de la dysbiose décrite chez les patients atteints de MICI. Cependant, à l'inverse, il est généralement conseillé aux patients atteints de MICI de limiter leur consommation alimentaire de fibres.

Des compléments de vitamines et minéraux pourraient également être pris en compte, notamment lorsque ces composés sont abaissés dans la circulation sanguine, et qu'ils sont connus pour être impliqués dans les phénomènes de cicatrisation. On peut citer par exemple les minéraux comme le Zinc et Sélénium qui interviennent dans l'activité catalytique des enzymes SOD, catalase et GPx ; etles vitamines A, C, E et beta-carotène qui sont connues pour leurs effets antioxydants. Une supplémentation en vitamine D pourrait aussi être bénéfique. En effet, la déficience en vitamine D est souvent retrouvée chez les patients souffrant de MICI (Ulitsky et al., 2011). Un niveau de 25(OH)D sanguin élevé avec un apport alimentaire élevé en vitamine D alimentaire ont été associés à une incidence réduite de la maladie de Crohn (Ananthakrishnan et al., 2012). De plus, une étude clinique d'intervention a montré que le complément en vitamine D3 chez les patients atteints de la maladie de Crohn en rémission réduit le risque de rechute (Jorgensen et al., 2010).

Pour conclure sur cette deuxième étude, nos résultats montrent que le mélange d'acides aminés (thréonine, méthionine et glutamate) a des effets bénéfiques sur la cicatrisation de la muqueuse colique, et ce indépendamment de l'inflammation. Il existe actuellement un consensus au sein de la communauté internationale médicale sur l'importance de la cicatrisation dans la prise en charge thérapeutique des MICI. La complémentation nutritionnelle en acides aminés pourrait constituer un traitement adjuvant du traitement pharmacologique pour permettre d'accélérer la cicatrisation.

Pour mieux comprendre les effets et les mécanismes des acides aminés sur la cicatrisation de la muqueuse colique, les modèles cellulaires constituent de bons modèles expérimentaux. En effet, les modèles de cellules en culture avec des lésions crées artificiellement sont assez couramment utilisés pour étudier les mécanismes de la restitution (Corredor et al., 2003; Dignass and Podolsky, 1993; McCormack et al., 1992; Moore et al., 1989; Nusrat et al., 1992).

Les études cliniques chez les patients sont bien entendu indispensables pour valider les effets des compléments en acides aminés sur la cicatrisation des lésions de la muqueuse du gros intestin. Cependant, il faut garder présent à l'esprit que les effets bénéfiques attendus pourraient être difficiles à établir clairement car possiblement masqués par les traitements thérapeutiques. Une définition stricte des critères d'inclusion et d'exclusion pourrait minimiser cet aspect.

Références bibliographiques

A

Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. Nature reviews. Immunology *10*, 131-144.

Ahern, P.P., Izcue, A., Maloy, K.J., and Powrie, F. (2008). The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. Immunol Rev *226*, 147-159.

Al-Sadi, R.M., and Ma, T.Y. (2007). IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. J Immunol *178*, 4641-4649.

Aldridge, K.E., Ashcraft, D., O'Brien, M., and Sanders, C.V. (2003). Bacteremia due to Bacteroides fragilis group: distribution of species, beta-lactamase production, and antimicrobial susceptibility patterns. Antimicrob Agents Chemother *47*, 148-153.

Allez, M., Brimnes, J., Dotan, I., and Mayer, L. (2002). Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. Gastroenterology *123*, 1516-1526.

Ananthakrishnan, A.N., Khalili, H., Higuchi, L.M., Bao, Y., Korzenik, J.R., Giovannucci, E.L., Richter, J.M., Fuchs, C.S., and Chan, A.T. (2012). Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn's disease. Gastroenterology *142*, 482-489.

Anderson, C.A., Boucher, G., Lees, C.W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K.D., Lee, J.C., Goyette, P., Imielinski, M., Latiano, A., et al. (2011). Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. Nat Genet *43*, 246-252.

Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Tome, D., and Blachier, F. (2009). Butyrate metabolism in human colon carcinoma cells: implications concerning its growth-inhibitory effect. Journal of cellular physiology *218*, 58-65.

Andriamihaja, M., Davila, A.M., Eklou-Lawson, M., Petit, N., Delpal, S., Allek, F., Blais, A., Delteil, C., Tome, D., and Blachier, F. (2010). Colon luminal content and epithelial cell morphology are markedly modified in rats fed with a high-protein diet. American journal of physiology *299*, G1030-1037.

Andrianifahanana, M., Moniaux, N., and Batra, S.K. (2006). Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. Biochimica et biophysica acta *1765*, 189-222.

Appleman, M.D., Heseltine, P.N., and Cherubin, C.E. (1991). Epidemiology, antimicrobial susceptibility, pathogenicity, and significance of Bacteroides fragilis group organisms isolated at Los Angeles County-University of Southern California Medical Center. Rev Infect Dis *13*, 12-18.

Archer, S.Y., Meng, S., Shei, A., and Hodin, R.A. (1998). p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 6791-6796.

Argenzio, R.A., Henrikson, C.K., and Liacos, J.A. (1988). Restitution of barrier and transport function of porcine colon after acute mucosal injury. The American journal of physiology *255*, G62-71.

Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. Science (New York, N.Y *338*, 120-123.

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.

Attene-Ramos, M.S., Nava, G.M., Muellner, M.G., Wagner, E.D., Plewa, M.J., and Gaskins, H.R. (2010). DNA damage and toxicogenomic analyses of hydrogen sulfide in human intestinal epithelial FHs 74 Int cells. Environ Mol Mutagen *51*, 304-314.

Audie, J.P., Janin, A., Porchet, N., Copin, M.C., Gosselin, B., and Aubert, J.P. (1993). Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. J Histochem Cytochem *41*, 1479-1485.

B

Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 15718-15723.

Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science (New York, N.Y *307*, 1915-1920.

Backhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 979-984.

Bakir, M.A., Sakamoto, M., Kitahara, M., Matsumoto, M., and Benno, Y. (2006). Bacteroides dorei sp. nov., isolated from human faeces. Int J Syst Evol Microbiol *56*, 1639-1643.

Barcenilla, A., Pryde, S.E., Martin, J.C., Duncan, S.H., Stewart, C.S., Henderson, C., and Flint, H.J. (2000). Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. Applied and environmental microbiology *66*, 1654-1661.

Barmeyer, C., Ye, J.H., Soroka, C., Geibel, P., Hingsammer, L.M., Weitgasser, L., Atway, D., Geibel, J.P., Binder, H.J., and Rajendran, V.M. (2013). Identification of Functionally Distinct Na-HCO3 Co-Transporters in Colon. PloS one *8*, e62864.

Basson, M.D., Modlin, I.M., Flynn, S.D., Jena, B.P., and Madri, J.A. (1992). Independent modulation of enterocyte migration and proliferation by growth factors, matrix proteins, and pharmacologic agents in an in vitro model of mucosal healing. Surgery *112*, 299-307; discussion 307-298.

Bauchart-Thevret, C., Stoll, B., Chacko, S., and Burrin, D.G. (2009). Sulfur amino acid deficiency upregulates intestinal methionine cycle activity and suppresses epithelial growth in neonatal pigs. Am J Physiol Endocrinol Metab *296*, E1239-1250.

Beltran, A.R., Ramirez, M.A., Carraro-Lacroix, L.R., Hiraki, Y., Reboucas, N.A., and Malnic, G. (2008). NHE1, NHE2, and NHE4 contribute to regulation of cell pH in T84 colon cancer cells. Pflugers Arch *455*, 799-810.

Bement, W.M., Forscher, P., and Mooseker, M.S. (1993). A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance. J Cell Biol *121*, 565-578.

Bervoets, L., Van Hoorenbeeck, K., Kortleven, I., Van Noten, C., Hens, N., Vael, C., Goossens, H., Desager, K.N., and Vankerckhoven, V. (2013). Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. Gut Pathog *5*, 10.

Blachier, F., Darcy-Vrillon, B., Sener, A., Duee, P.H., and Malaisse, W.J. (1991). Arginine metabolism in rat enterocytes. Biochimica et biophysica acta *1092*, 304-310.

Blachier, F., M'Rabet-Touil, H., Posho, L., Darcy-Vrillon, B., and Duee, P.H. (1993). Intestinal arginine metabolism during development. Evidence for de novo synthesis of L-arginine in newborn pig enterocytes. Eur J Biochem *216*, 109-117.

Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J.F., and Tome, D. (2007). Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. Amino acids *33*, 547-562.

Boffa, L.C., Lupton, J.R., Mariani, M.R., Ceppi, M., Newmark, H.L., Scalmati, A., and Lipkin, M. (1992). Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats. Cancer Res *52*, 5906-5912.

Borody, T.J., Bilkey, S., Wettstein, A.R., Leis, S., Pang, G., and Tye, S. (2007). Anti-mycobacterial therapy in Crohn's disease heals mucosa with longitudinal scars. Dig Liver Dis *39*, 438-444.

Bos, C., Stoll, B., Fouillet, H., Gaudichon, C., Guan, X., Grusak, M.A., Reeds, P.J., Burrin, D.G., and Tome, D. (2005). Postprandial intestinal and whole body nitrogen kinetics and distribution in piglets fed a single meal. Am J Physiol Endocrinol Metab *288*, E436-446.

Boughton-Smith, N.K., Evans, S.M., Hawkey, C.J., Cole, A.T., Balsitis, M., Whittle, B.J., and Moncada, S. (1993). Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. Lancet *342*, 338-340.

Bringer, M.A., Glasser, A.L., Tung, C.H., Meresse, S., and Darfeuille-Michaud, A. (2006). The Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. Cell Microbiol *8*, 471-484.

Brook, I. (1989). Pathogenicity of the Bacteroides fragilis group. Ann Clin Lab Sci *19*, 360-376.

Buck, R.C. (1986). Ultrastructural features of rectal epithelium of the mouse during the early phases of migration to repair a defect. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol *51*, 331-340.

Buisine, M.P., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M.C., Colombel, J.F., Porchet, N., and Aubert, J.P. (2001). Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. Gut *49*, 544-551.

Buyse, M., Sitaraman, S.V., Liu, X., Bado, A., and Merlin, D. (2002). Luminal leptin enhances CD147/MCT-1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco2-BBE. The Journal of biological chemistry *277*, 28182-28190.

C

Calonge, M.L., Ilundain, A., and Bolufer, J. (1990). Glycylsarcosine transport by epithelial cells isolated from chicken proximal cecum and rectum. The American journal of physiology *258*, G660-664.

Cao, W., Vrees, M.D., Kirber, M.T., Fiocchi, C., and Pricolo, V.E. (2004). Hydrogen peroxide contributes to motor dysfunction in ulcerative colitis. American journal of physiology *286*, G833-843.

Caprioli, F., Pallone, F., and Monteleone, G. (2008). Th17 immune response in IBD: A new pathogenic mechanism. J Crohns Colitis *2*, 291-295.

Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercoe, E., Moore, R.A., et al. (2012). Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res *22*, 299-306.

Cermak, R., Lawnitzak, C., and Scharrer, E. (2000). Influence of ammonia on sodium absorption in rat proximal colon. Pflugers Arch *440*, 619-626.

Chacko, A., and Cummings, J.H. (1988). Nitrogen losses from the human small bowel: obligatory losses and the effect of physical form of food. Gut *29*, 809-815.

Charney, A.N., Giannella, R.A., and Egnor, R.W. (1999). Effect of short-chain fatty acids on cyclic 3',5'-guanosine monophosphate-mediated colonic secretion. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol *124*, 169-178.

Charney, A.N., Micic, L., and Egnor, R.W. (1998). Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat colon. The American journal of physiology *274*, G518-524.

Chen, L., Li, P., Wang, J., Li, X., Gao, H., Yin, Y., Hou, Y., and Wu, G. (2009). Catabolism of nutritionally essential amino acids in developing porcine enterocytes. Amino acids *37*, 143-152.

Chopin, V., Toillon, R.A., Jouy, N., and Le Bourhis, X. (2002). Sodium butyrate induces P53-independent, Fas-mediated apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. Br J Pharmacol *135*, 79-86.

Claesson, M.J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkila, J., Marchesi, J.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Ross, R.P., and O'Toole, P.W. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. PloS one *4*, e6669.

Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., and Farrow, J.A. (1994). The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int J Syst Bacteriol *44*, 812-826.

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.

Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., and Sedergran, D.J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab Invest *69*, 238-249.

Corredor, J., Yan, F., Shen, C.C., Tong, W., John, S.K., Wilson, G., Whitehead, R., and Polk, D.B. (2003). Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms. Am J Physiol Cell Physiol *284*, C953-961.

Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology *140*, 1785-1794.

Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., et al. (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. Nature *500*, 585-588.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. Nature *420*, 860-867.

Cuff, M., Dyer, J., Jones, M., and Shirazi-Beechey, S. (2005). The human colonic monocarboxylate transporter Isoform 1: its potential importance to colonic tissue homeostasis. Gastroenterology *128*, 676-686.

Cuff, M.A., Lambert, D.W., and Shirazi-Beechey, S.P. (2002). Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. The Journal of physiology *539*, 361-371.

Cummings, J.H., Gibson, G.R., and Macfarlane, G.T. (1989). Quantitative estimates of fermentation in the hind gut of man. Acta Vet Scand Suppl *86*, 76-82.

Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., and Macfarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. Gut *28*, 1221-1227.

D

D. Brent Polk, and Frey, M.R. (2012). Mucosal Restitution and Repair. In Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fifth Edition). L.R. Johnson, ed. (ACADEMIC PRESS), pp. 1147-1168.

D'Haens, G., Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Geboes, K., Hanauer, S.B., Irvine, E.J., Lemann, M., Marteau, P., Rutgeerts, P., Scholmerich, J., et al. (2007). A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. Gastroenterology *132*, 763-786.

D'Haens, G.R., Fedorak, R., Lemann, M., Feagan, B.G., Kamm, M.A., Cosnes, J., Rutgeerts, P.J., Marteau, P., Travis, S., Scholmerich, J., et al. (2009). Endpoints for clinical trials evaluating disease modification and structural damage in adults with Crohn's disease. Inflammatory bowel diseases *15*, 1599-1604.

Dagher, P.C., Egnor, R.W., Taglietta-Kohlbrecher, A., and Charney, A.N. (1996). Short-chain fatty acids inhibit cAMP-mediated chloride secretion in rat colon. The American journal of physiology *271*, C1853-1860.

DANIELS, P.R.W.H.G.B.V.G. (1979). Histologie fonctionnelle. MANUEL et ATLAS. (Churchill Livingstone).

Danjo, Y., and Gipson, I.K. (1998). Actin 'purse string' filaments are anchored by E-cadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement. J Cell Sci *111 (Pt 22)*, 3323-3332.

Darcy-Vrillon, B., Cherbuy, C., Morel, M.T., Durand, M., and Duee, P.H. (1996). Short chain fatty acid and glucose metabolism in isolated pig colonocytes: modulation by NH4+. Mol Cell Biochem *156*, 145-151.

Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998). Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. Gastroenterology *115*, 1405-1413.

Darragh, A.J., Cranwell, P.D., and Moughan, P.J. (1994). Absorption of lysine and methionine from the proximal colon of the piglet. The British journal of nutrition *71*, 739-752.

Dave, M., and Loftus, E.V., Jr. (2012). Mucosal healing in inflammatory bowel disease-a true paradigm of success? Gastroenterol Hepatol (N Y) *8*, 29-38.

Davila, A.M., Blachier, F., Gotteland, M., Andriamihaja, M., Benetti, P.H., Sanz, Y., and Tome, D. (2013). Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host. Pharmacol Res *68*, 95-107.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., and Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 14691-14696.

de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., and Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. The lancet oncology *13*, 607-615.

de Martel, C., Forman, D., and Plummer, M. (2013). Gastric cancer: epidemiology and risk factors. Gastroenterology clinics of North America *42*, 219-240.

Deplancke, B., and Gaskins, H.R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. The American journal of clinical nutrition *73*, 1131S-1141S.

Di Sabatino, A., Jackson, C.L., Pickard, K.M., Buckley, M., Rovedatti, L., Leakey, N.A., Picariello, L., Cazzola, P., Monteleone, G., Tonelli, F., et al. (2009). Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures. Gut *58*, 777-789.

Dicksved, J., Halfvarson, J., Rosenquist, M., Jarnerot, G., Tysk, C., Apajalahti, J., Engstrand, L., and Jansson, J.K. (2008). Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. The ISME journal *2*, 716-727.

Dieleman, L.A., Palmen, M.J., Akol, H., Bloemena, E., Pena, A.S., Meuwissen, S.G., and Van Rees, E.P. (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. Clin Exp Immunol *114*, 385-391.

Diener, M., Helmle-Kolb, C., Murer, H., and Scharrer, E. (1993). Effect of short-chain fatty acids on cell volume and intracellular pH in rat distal colon. Pflugers Arch *424*, 216-223.

Dignass, A., Lynch-Devaney, K., Kindon, H., Thim, L., and Podolsky, D.K. (1994). Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. The Journal of clinical investigation *94*, 376-383.

Dignass, A.U., and Podolsky, D.K. (1993). Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. Gastroenterology *105*, 1323-1332.

Domigan, N.M., Charlton, T.S., Duncan, M.W., Winterbourn, C.C., and Kettle, A.J. (1995). Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. The Journal of biological chemistry *270*, 16542-16548.

Donohoe, D.R., Collins, L.B., Wali, A., Bigler, R., Sun, W., and Bultman, S.J. (2012). The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. Molecular cell *48*, 612-626.

Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K., and Bultman, S.J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. Cell metabolism *13*, 517-526.

Dubinsky, M.C., Wang, D., Picornell, Y., Wrobel, I., Katzir, L., Quiros, A., Dutridge, D., Wahbeh, G., Silber, G., Bahar, R., et al. (2007). IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. Inflammatory bowel diseases *13*, 511-515.

Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., et al. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science (New York, N.Y *314*, 1461-1463.

Duncan, S.H., Lobley, G.E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A.M., Louis, P., and Flint, H.J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. International journal of obesity (2005) *32*, 1720-1724.

Duranton, B., Schleiffer, R., Gosse, F., and Raul, F. (1998). Preventive administration of ornithine alpha-ketoglutarate improves intestinal mucosal repair after transient ischemia in rats. Crit Care Med *26*, 120-125.

E

Eaton, D.C., Malik, B., Bao, H.F., Yu, L., and Jain, L. (2010). Regulation of epithelial sodium channel trafficking by ubiquitination. Proc Am Thorac Soc *7*, 54-64.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. Science (New York, N.Y *308*, 1635-1638.

Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S., and Riddell, R.H. (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. Gastroenterology *109*, 1344-1367.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. Nature *420*, 629-635.

Evenepoel, P., Claus, D., Geypens, B., Hiele, M., Geboes, K., Rutgeerts, P., and Ghoos, Y. (1999). Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. The American journal of physiology *277*, G935-943.

F

Faure, M., Moennoz, D., Montigon, F., Mettraux, C., Breuille, D., and Ballevre, O. (2005). Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. The Journal of nutrition *135*, 486-491.

Faure, M., Moennoz, D., Montigon, F., Mettraux, C., Mercier, S., Schiffrin, E.J., Obled, C., Breuille, D., and Boza, J. (2003). Mucin production and composition is altered in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. Dig Dis Sci *48*, 1366-1373.

Favier, C.F., Vaughan, E.E., De Vos, W.M., and Akkermans, A.D. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. Applied and environmental microbiology *68*, 219-226.

Feiken, E., Romer, J., Eriksen, J., and Lund, L.R. (1995). Neutrophils express tumor necrosis factor-alpha during mouse skin wound healing. J Invest Dermatol *105*, 120-123.

Feil, W., Lacy, E.R., Wong, Y.M., Burger, D., Wenzl, E., Starlinger, M., and Schiessel, R. (1989). Rapid epithelial restitution of human and rabbit colonic mucosa. Gastroenterology *97*, 685-701.

Feil, W., Wenzl, E., Vattay, P., Starlinger, M., Sogukoglu, T., and Schiessel, R. (1987). Repair of rabbit duodenal mucosa after acid injury in vivo and in vitro. Gastroenterology *92*, 1973-1986.

Fenteany, G., Janmey, P.A., and Stossel, T.P. (2000). Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. Curr Biol *10*, 831-838.

Fleming, S.E., Fitch, M.D., DeVries, S., Liu, M.L., and Kight, C. (1991). Nutrient utilization by cells isolated from rat jejunum, cecum and colon. The Journal of nutrition *121*, 869-878.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 13780-13785.

Franke, A., McGovern, D.P., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., et al. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. Nat Genet *42*, 1118-1125.

Frey, M.R., Golovin, A., and Polk, D.B. (2004). Epidermal growth factor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires Src family kinase-dependent p38 MAPK signaling. The Journal of biological chemistry *279*, 44513-44521.

Froslie, K.F., Jahnsen, J., Moum, B.A., Vatn, M.H., and Group, I. (2007). Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. Gastroenterology *133*, 412-422.

Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., de la Motte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., and Strober, W. (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. J Immunol *157*, 1261-1270.

G

Gamet, L., Daviaud, D., Denis-Pouxviel, C., Remesy, C., and Murat, J.C. (1992). Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. Int J Cancer *52*, 286-289.

Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C., and Ausio, J. (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. The Journal of biological chemistry *270*, 17923-17928.

Gibson, J.A., Sladen, G.E., and Dawson, A.M. (1976). Protein absorption and ammonia production: the effects of dietary protein and removal of the colon. The British journal of nutrition *35*, 61-65.

Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science (New York, N.Y *312*, 1355-1359.

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. The Journal of biological chemistry *278*, 8869-8872.

Glasser, A.L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.H., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent invasive Escherichia coli strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. Infect Immun *69*, 5529-5537.

Gonzalez, A., Stombaugh, J., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Gordon, J.I., and Knight, R. (2011). The mind-body-microbial continuum. Dialogues in clinical neuroscience *13*, 55-62.

Goubern, M., Andriamihaja, M., Nubel, T., Blachier, F., and Bouillaud, F. (2007). Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. Faseb J *21*, 1699-1706.

Gower-Rousseau, C., Vasseur, F., Fumery, M., Savoye, G., Salleron, J., Dauchet, L., Turck, D., Cortot, A., Peyrin-Biroulet, L., and Colombel, J.F. (2013). Epidemiology of inflammatory bowel diseases: new insights from a French population-based registry (EPIMAD). Dig Liver Dis *45*, 89-94.

Grieshaber, M.K., and Volkel, S. (1998). Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. Annual review of physiology *60*, 33-53.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. Nature *389*, 349-352.

Guarner, F., and Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease. Lancet *361*, 512-519.

Guihot, G., Guimbaud, R., Bertrand, V., Narcy-Lambare, B., Couturier, D., Duee, P.H., Chaussade, S., and Blachier, F. (2000). Inducible nitric oxide synthase activity in colon biopsies from inflammatory areas: correlation with inflammation intensity in patients with ulcerative colitis but not with Crohn's disease. Amino acids *18*, 229-237.

Gupta, N., Martin, P.M., Prasad, P.D., and Ganapathy, V. (2006). SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. Life Sci *78*, 2419-2425.

Gupta, R.B., Harpaz, N., Itzkowitz, S., Hossain, S., Matula, S., Kornbluth, A., Bodian, C., and Ullman, T. (2007). Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. Gastroenterology *133*, 1099-1105; quiz 1340-1091.

H

Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E., and Jarnerot, G. (2003). Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. Gastroenterology *124*, 1767-1773.

Hamard, A., Mazurais, D., Boudry, G., Le Huerou-Luron, I., Seve, B., and Le Floc'h, N. (2010). A moderate threonine deficiency affects gene expression profile, paracellular permeability and glucose absorption capacity in the ileum of piglets. J Nutr Biochem *21*, 914-921.

Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., et al. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. Nat Genet *39*, 207-211.

Ho, S.B., Dvorak, L.A., Moor, R.E., Jacobson, A.C., Frey, M.R., Corredor, J., Polk, D.B., and Shekels, L.L. (2006). Cysteine-rich domains of muc3 intestinal mucin promote cell migration, inhibit apoptosis, and accelerate wound healing. Gastroenterology *131*, 1501-1517.

Hoogerwerf, W.A., Tsao, S.C., Devuyst, O., Levine, S.A., Yun, C.H., Yip, J.W., Cohen, M.E., Wilson, P.D., Lazenby, A.J., Tse, C.M., et al. (1996). NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. The American journal of physiology *270*, G29-41.

Hubner, G., Brauchle, M., Smola, H., Madlener, M., Fassler, R., and Werner, S. (1996). Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. Cytokine *8*, 548-556.

Hughes, R., Kurth, M.J., McGilligan, V., McGlynn, H., and Rowland, I. (2008). Effect of colonic bacterial metabolites on Caco-2 cell paracellular permeability in vitro. Nutr Cancer *60*, 259-266.

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature *411*, 599-603.

I

Ichikawa, H., and Sakata, T. (1998). Stimulation of epithelial cell proliferation of isolated distal colon of rats by continuous colonic infusion of ammonia or short-chain fatty acids is nonadditive. The Journal of nutrition *128*, 843-847.

Irvine, E.J., and Marshall, J.K. (2000). Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. Gastroenterology *119*, 1740-1744.

Iwashita, E. (1998). Greatly increased mucosal nitric oxide in ulcerative colitis determined in situ by a novel nitric oxide-selective microelectrode. J Gastroenterol Hepatol *13*, 391-395.

J

James, P.S., and Smith, M.W. (1976). Methionine transport by pig colonic mucosa measured during early post-natal development. The Journal of physiology *262*, 151-168.

Jess, T., Rungoe, C., and Peyrin-Biroulet, L. (2012a). Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. Clin Gastroenterol Hepatol *10*, 639-645.

Jess, T., Simonsen, J., Jorgensen, K.T., Pedersen, B.V., Nielsen, N.M., and Frisch, M. (2012b). Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. Gastroenterology *143*, 375-381 e371; quiz e313-374.

Johnson, L.R., and McCormack, S.A. (1999). Healing of Gastrointestinal Mucosa: Involvement of Polyamines. News Physiol Sci *14*, 12-17.

Jorgensen, S.P., Agnholt, J., Glerup, H., Lyhne, S., Villadsen, G.E., Hvas, C.L., Bartels, L.E., Kelsen, J., Christensen, L.A., and Dahlerup, J.F. (2010). Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-blind placebo-controlled study. Aliment Pharmacol Ther *32*, 377-383.

Jowett, S.L., Seal, C.J., Pearce, M.S., Phillips, E., Gregory, W., Barton, J.R., and Welfare, M.R. (2004). Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. Gut *53*, 1479-1484.

K

Kang, H., Min, B.S., Lee, K.Y., Kim, N.K., Kim, S.N., Choi, J., and Kim, H. (2011). Loss of E-cadherin and MUC2 expressions correlated with poor survival in patients with stages II and III colorectal carcinoma. Ann Surg Oncol *18*, 711-719.

Kawamata, K., Hayashi, H., and Suzuki, Y. (2007). Propionate absorption associated with bicarbonate secretion in vitro in the mouse cecum. Pflugers Arch *454*, 253-262.

Kikugawa, K., and Kato, T. (1988). Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite. Food Chem Toxicol *26*, 209-214.

Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. Current gastroenterology reports *12*, 319-330.

Kim, Y.S., Lee, M.H., Ju, A.S., and Rhee, K.J. (2011). Th17 responses are not induced in dextran sodium sulfate model of acute colitis. Immune Netw *11*, 416-419.

Kimura, H., Hokari, R., Miura, S., Shigematsu, T., Hirokawa, M., Akiba, Y., Kurose, I., Higuchi, H., Fujimori, H., Tsuzuki, Y., et al. (1998). Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. Gut *42*, 180-187.

Kitajima, S., Takuma, S., and Morimoto, M. (2000). Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. Exp Anim *49*, 9-15.

Kjellev, S., Thim, L., Pyke, C., and Poulsen, S.S. (2007). Cellular localization, binding sites, and pharmacologic effects of TFF3 in experimental colitis in mice. Dig Dis Sci *52*, 1050-1059.

Klebanoff, S.J. (1968). Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. J Bacteriol *95*, 2131-2138.

Ko, T.C., Yu, W., Sakai, T., Sheng, H., Shao, J., Beauchamp, R.D., and Thompson, E.A. (1998). TGF-beta1 effects on proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression. Oncogene *16*, 3445-3454.

Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Tabernero, J., et al. (2012). Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. Genome Res *22*, 292-298.

Kruidenier, L., Kuiper, I., Van Duijn, W., Mieremet-Ooms, M.A., van Hogezand, R.A., Lamers, C.B., and Verspaget, H.W. (2003). Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. J Pathol *201*, 17-27.

Kullmann, F., Messmann, H., Alt, M., Gross, V., Bocker, T., Scholmerich, J., and Ruschoff, J. (2001). Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. Int J Colorectal Dis *16*, 238-246.

L

Lacy, E.R. (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. Journal of clinical gastroenterology *10 Suppl 1*, S72-77.

Laroui, H., Ingersoll, S.A., Liu, H.C., Baker, M.T., Ayyadurai, S., Charania, M.A., Laroui, F., Yan, Y., Sitaraman, S.V., and Merlin, D. (2012). Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. PloS one *7*, e32084.

Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.M., Kennedy, S., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. Nature *500*, 541-546.

Le Leu, R.K., Young, G.P., Hu, Y., Winter, J., and Conlon, M.A. (2013). Dietary Red Meat Aggravates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice Whereas Resistant Starch Attenuates Inflammation. Dig Dis Sci.

Leschelle, X., Goubern, M., Andriamihaja, M., Blottiere, H.M., Couplan, E., Gonzalez-Barroso, M.D., Petit, C., Pagniez, A., Chaumontet, C., Mignotte, B., et al. (2005). Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. Biochimica et biophysica acta *1725*, 201-212.

Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 11070-11075.

Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature *444*, 1022-1023.

Lin, H.C., and Visek, W.J. (1991). Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. The Journal of nutrition *121*, 887-893.

Loftus, E.V., Jr. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. Gastroenterology *126*, 1504-1517.

Lovasz, B.D., Golovics, P.A., Vegh, Z., and Lakatos, P.L. (2013). New trends in inflammatory bowel disease epidemiology and disease course in Eastern Europe. Dig Liver Dis *45*, 269-276.

Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., and Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature *489*, 220-230.

Lu, S.C. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. FASEB J *13*, 1169-1183.

Lu, S.C. (2013). Glutathione synthesis. Biochimica et biophysica acta *1830*, 3143-3153.

Lupton, J.R. (2004). Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. The Journal of nutrition *134*, 479-482.

Lyngkaran, G., Kang, S., McSweeney, C., Sivanesan, S., Morrison, M., and Macrae, F. (2013). Indigenous Australians (IA) have a distinctive gut microbial profile compared to patients with inflammatory bowel disease (IBD) and non Indigenous controls. Journal of Crohn's and Colitis Vol. 7 Supplement 1, Page S5.

M

M'Rabet-Touil, H., Blachier, F., Morel, M.T., Darcy-Vrillon, B., and Duee, P.H. (1993). Characterization and ontogenesis of nitric oxide synthase activity in pig enterocytes. FEBS Lett *331*, 243-247.

Macfarlane, G.T., Allison, C., Gibson, S.A., and Cummings, J.H. (1988). Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. The Journal of applied bacteriology *64*, 37-46.

Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., and Allison, C. (1986). Protein degradation by human intestinal bacteria. Journal of general microbiology *132*, 1647-1656.

Macfarlane, G.T., and Macfarlane, S. (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. Journal of AOAC International *95*, 50-60.

Madej, M., Lundh, T., and Lindberg, J.E. (2002). Activity of enzymes involved in energy production in the small intestine during suckling-weaning transition of pigs. Biol Neonate *82*, 53-60.

Malle, E., Buch, T., and Grone, H.J. (2003). Myeloperoxidase in kidney disease. Kidney Int *64*, 1956-1967.

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.

Marchesi, J.R., Dutilh, B.E., Hall, N., Peters, W.H., Roelofs, R., Boleij, A., and Tjalsma, H. (2011). Towards the human colorectal cancer microbiome. PloS one *6*, e20447.

Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimaraes, V., Sokol, H., Dore, J., Corthier, G., and Furet, J.P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. BMC microbiology *9*, 123.

Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpofu, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H.F., and Rhodes, J.M. (2004). Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. Gastroenterology *127*, 80-93.

Mashimo, H., Wu, D.C., Podolsky, D.K., and Fishman, M.C. (1996). Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. Science (New York, N.Y *274*, 262-265.

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T., and Tanaka, R. (2004). Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. Applied and environmental microbiology *70*, 7220-7228.

May, C.L., and Kaestner, K.H. (2010). Gut endocrine cell development. Molecular and cellular endocrinology *323*, 70-75.

Mayeur, C., Veuillet, G., Michaud, M., Raul, F., Blottiere, H.M., and Blachier, F. (2005). Effects of agmatine accumulation in human colon carcinoma cells on polyamine metabolism, DNA synthesis and the cell cycle. Biochimica et biophysica acta *1745*, 111-123.

McCarroll, S.A., Huett, A., Kuballa, P., Chilewski, S.D., Landry, A., Goyette, P., Zody, M.C., Hall, J.L., Brant, S.R., Cho, J.H., et al. (2008). Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. Nat Genet *40*, 1107-1112.

McCormack, S.A., Viar, M.J., and Johnson, L.R. (1992). Migration of IEC-6 cells: a model for mucosal healing. The American journal of physiology *263*, G426-435.

McCoy, A.N., Araujo-Perez, F., Azcarate-Peril, A., Yeh, J.J., Sandler, R.S., and Keku, T.O. (2013). Fusobacterium is associated with colorectal adenomas. PloS one *8*, e53653.

McDonald, S.A., Preston, S.L., Lovell, M.J., Wright, N.A., and Jankowski, J.A. (2006). Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer. Nature clinical practice *3*, 267-274.

McNeil, N.I., Cummings, J.H., and James, W.P. (1979). Rectal absorption of short chain fatty acids in the absence of chloride. Gut *20*, 400-403.

Melgar, S., Engstrom, K., Jagervall, A., and Martinez, V. (2008). Psychological stress reactivates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice. Stress *11*, 348-362.

Melgar, S., Karlsson, A., and Michaelsson, 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. American journal of physiology *288*, G1328-1338.

Middleton, S.J., Shorthouse, M., and Hunter, J.O. (1993). Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. Lancet *341*, 465-466.

Mizoguchi, A., and Bhan, A.K. (2006). A case for regulatory B cells. J Immunol *176*, 705-710.

Moore, R., Carlson, S., and Madara, J.L. (1989). Rapid barrier restitution in an in vitro model of intestinal epithelial injury. Lab Invest *60*, 237-244.

Moore, W.E., and Moore, L.H. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. Applied and environmental microbiology *61*, 3202-3207.

Moran, G.W., Leslie, F.C., Levison, S.E., Worthington, J., and McLaughlin, J.T. (2008). Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders? Therapeutic advances in gastroenterology *1*, 51-60.

Mortensen, P.B., and Clausen, M.R. (1996). Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. Scandinavian journal of gastroenterology *216*, 132-148.

Mouille, B., Delpal, S., Mayeur, C., and Blachier, F. (2003). Inhibition of human colon carcinoma cell growth by ammonia: a non-cytotoxic process associated with polyamine synthesis reduction. Biochimica et biophysica acta *1624*, 88-97.

Mouille, B., Robert, V., and Blachier, F. (2004). Adaptative increase of ornithine production and decrease of ammonia metabolism in rat colonocytes after hyperproteic diet ingestion. American journal of physiology *287*, G344-351.

Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A., and Heldin, C.H. (2002). Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. Immunol Lett *82*, 85-91.

Musch, M.W., Bookstein, C., Xie, Y., Sellin, J.H., and Chang, E.B. (2001). SCFA increase intestinal Na absorption by induction of NHE3 in rat colon and human intestinal C2/bbe cells. American journal of physiology *280*, G687-693.

Muzes, G., Molnar, B., Tulassay, Z., and Sipos, F. (2012). Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol *18*, 5848-5861.

Naito, Y., Takagi, T., and Yoshikawa, T. (2007). Molecular fingerprints of neutrophil-dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol *42*, 787-798.

N

Ng, S.C., Tang, W., Ching, J., Wong, M., Chow, C.M., Hui, A.J., Wong, T.C., Leung, V., Tsang, S., Yu, H.H., et al. (2013). Incidence and Phenotype of Inflammatory Bowel Disease Based on Results From the Asia-Pacific Crohn's and Colitis Epidemiology Study. Gastroenterology.

Nicholson, R.A., Roth, S.H., Zhang, A., Zheng, J., Brookes, J., Skrajny, B., and Bennington, R. (1998). Inhibition of respiratory and bioenergetic mechanisms by hydrogen sulfide in mammalian brain. J Toxicol Environ Health A *54*, 491-507.

Nightingale, K.P., Wellinger, R.E., Sogo, J.M., and Becker, P.B. (1998). Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the Drosophila hsp26 gene in chromatin. EMBO J *17*, 2865-2876.

Nordgaard, I., Mortensen, P.B., and Langkilde, A.M. (1995). Small intestinal malabsorption and colonic fermentation of resistant starch and resistant peptides to short-chain fatty acids. Nutrition *11*, 129-137.

Nusrat, A., Delp, C., and Madara, J.L. (1992). Intestinal epithelial restitution. Characterization of a cell culture model and mapping of cytoskeletal elements in migrating cells. The Journal of clinical investigation *89*, 1501-1511.

Nyangale, E.P., Mottram, D.S., and Gibson, G.R. (2012). Gut microbial activity, implications for health and disease: the potential role of metabolite analysis. J Proteome Res *11*, 5573-5585.

O

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature *411*, 603-606.

Ohkusa, T. (1985). [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi *82*, 1327-1336.

Orholm, M., Binder, V., Sorensen, T.I., Rasmussen, L.P., and Kyvik, K.O. (2000). Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. Scand J Gastroenterol *35*, 1075-1081.

Ou, J., Carbonero, F., Zoetendal, E.G., Delany, J.P., Wang, M., Newton, K., Gaskins, H.R., and O'Keefe, S.J. (2013). Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. The American journal of clinical nutrition.

P

Pedersen, G., Brynskov, J., and Saermark, T. (2002). Phenol toxicity and conjugation in human colonic epithelial cells. Scand J Gastroenterol *37*, 74-79.

Perrier, C., and Rutgeerts, P. (2011). Cytokine blockade in inflammatory bowel diseases. Immunotherapy *3*, 1341-1352.

Peyrin-Biroulet, L., Ferrante, M., Magro, F., Campbell, S., Franchimont, D., Fidder, H., Strid, H., Ardizzone, S., Veereman-Wauters, G., Chevaux, J.B., et al. (2011). Results from the 2nd Scientific

Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis *5*, 477-483.

Pineton de Chambrun, G., Peyrin-Biroulet, L., Lemann, M., and Colombel, J.F. (2010). Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol *7*, 15-29.

Pitcher, M.C., and Cummings, J.H. (1996). Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? Gut *39*, 1-4.

Podolsky, D.K. (2002). Inflammatory bowel disease. N Engl J Med *347*, 417-429.

Poritz, L.S., Garver, K.I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., and Koltun, W.A. (2007). Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. J Surg Res *140*, 12-19.

Prantera, C., Kohn, A., Mangiarotti, R., Andreoli, A., and Luzi, C. (1994). Antimycobacterial therapy in Crohn's disease: results of a controlled, double-blind trial with a multiple antibiotic regimen. The American journal of gastroenterology *89*, 513-518.

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.

R

Rachmilewitz, D., Stamler, J.S., Bachwich, D., Karmeli, F., Ackerman, Z., and Podolsky, D.K. (1995). Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. Gut *36*, 718-723.

Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. The Journal of biological chemistry *266*, 4244-4250.

Rand, W.M., Pellett, P.L., and Young, V.R. (2003). Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. The American journal of clinical nutrition *77*, 109-127.

Rao, J.N., Li, J., Li, L., Bass, B.L., and Wang, J.Y. (1999). Differentiated intestinal epithelial cells exhibit increased migration through polyamines and myosin II. The American journal of physiology *277*, G1149-1158.

Rasmussen, H.S., Holtug, K., and Mortensen, P.B. (1988). Degradation of amino acids to short-chain fatty acids in humans. An in vitro study. Scand J Gastroenterol *23*, 178-182.

Ray, R.M., McCormack, S.A., Covington, C., Viar, M.J., Zheng, Y., and Johnson, L.R. (2003). The requirement for polyamines for intestinal epithelial cell migration is mediated through Rac1. The Journal of biological chemistry *278*, 13039-13046.

Ray, R.M., McCormack, S.A., and Johnson, L.R. (2001). Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms. American journal of physiology *281*, G37-43.

Reeds, P., Schaafsma, G., Tome, D., and Young, V. (2000). Criteria and significance of dietary protein sources in humans. Summary of the workshop with recommendations. The Journal of nutrition *130*, 1874S-1876S.

Reeds, P.J. (2000). Dispensable and indispensable amino acids for humans. The Journal of nutrition *130*, 1835S-1840S.

Remond, D., Buffiere, C., Godin, J.P., Mirand, P.P., Obled, C., Papet, I., Dardevet, D., Williamson, G., Breuille, D., and Faure, M. (2009). Intestinal inflammation increases gastrointestinal threonine uptake and mucin synthesis in enterally fed minipigs. The Journal of nutrition *139*, 720-726.

Riggs, M.G., Whittaker, R.G., Neumann, J.R., and Ingram, V.M. (1977). n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. Nature *268*, 462-464.

Rindi, G., Leiter, A.B., Kopin, A.S., Bordi, C., and Solcia, E. (2004). The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. Annals of the New York Academy of Sciences *1014*, 1-12.

Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., et al. (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. Nat Genet *39*, 596-604.

Ritzhaupt, A., Ellis, A., Hosie, K.B., and Shirazi-Beechey, S.P. (1998a). The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. The Journal of physiology *507 (Pt 3)*, 819-830.

Ritzhaupt, A., Wood, I.S., Ellis, A., Hosie, K.B., and Shirazi-Beechey, S.P. (1998b). Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. The Journal of physiology *513 (Pt 3)*, 719-732.

Robinson, J.W., Luisier, A.L., and Mirkovitch, V. (1973). Transport of amino-acids and sugars by the dog colonic mucosa. Pflugers Arch *345*, 317-326.

Roediger, W.E. (1980). Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. Gut *21*, 793-798.

Roediger, W.E. (1982). Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. Gastroenterology *83*, 424-429.

Rolhion, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). Adherent-invasive Escherichia coli in inflammatory bowel disease. Inflammatory bowel diseases *13*, 1277-1283.

Ronald, M.A., and Richard, B. (1992). Microbial Ecology: Fundamentals and applications - Third Edition. (The Benjamin/Cummings Publishing Compagny, Inc.).

Rutgeerts, P., Vermeire, S., and Van Assche, G. (2007). Mucosal healing in inflammatory bowel disease: impossible ideal or therapeutic target? Gut *56*, 453-455.

Rutter, M., Saunders, B., Wilkinson, K., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M., Williams, C., Price, A., Talbot, I., and Forbes, A. (2004a). Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. Gastroenterology *126*, 451-459.

Rutter, M.D., Saunders, B.P., Wilkinson, K.H., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M.A., Williams, C.B., Price, A.B., Talbot, I.C., and Forbes, A. (2004b). Cancer surveillance in longstanding ulcerative colitis: endoscopic appearances help predict cancer risk. Gut *53*, 1813-1816.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., and Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. The British journal of nutrition *80 Suppl 1*, S147-171.

Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Hanauer, S.B., Lochs, H., Lofberg, R., Modigliani, R., Present, D.H., Rutgeerts, P., Scholmerich, 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.

S

Savage, D.C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annual review of microbiology *31*, 107-133.

Schaart, M.W., Schierbeek, H., van der Schoor, S.R., Stoll, B., Burrin, D.G., Reeds, P.J., and van Goudoever, J.B. (2005). Threonine utilization is high in the intestine of piglets. The Journal of nutrition *135*, 765-770.

Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M., and Leiter, A.B. (2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. Endocrinology *145*, 2639-2644.

Schultz, J., and Kaminker, K. (1962). Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. Arch Biochem Biophys *96*, 465-467.

Schultz, M., Tonkonogy, S.L., Sellon, R.K., Veltkamp, C., Godfrey, V.L., Kwon, J., Grenther, W.B., Balish, E., Horak, I., and Sartor, R.B. (1999). IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. The American journal of physiology *276*, G1461-1472.

Schwiertz, A., Taras, D., Schafer, K., Beijer, S., Bos, N.A., Donus, C., and Hardt, P.D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. Obesity (Silver Spring, Md *18*, 190-195.

Sealy, L., and Chalkley, R. (1978). The effect of sodium butyrate on histone modification. Cell *14*, 115-121.

Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D.M., and Sartor, R.B. (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. Infect Immun *66*, 5224-5231.

Seno, H., Miyoshi, H., Brown, S.L., Geske, M.J., Colonna, M., and Stappenbeck, T.S. (2009). Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2 signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 256-261.

Sepulveda, F.V., and Smith, M.W. (1979). Different mechanisms for neutral amino acid uptake by new-born pig colon. The Journal of physiology *286*, 479-490.

Sheng, Y.H., Hasnain, S.Z., Florin, T.H., and McGuckin, M.A. (2012). Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. J Gastroenterol Hepatol *27*, 28-38.

Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., and van Blankenstein, M. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference

between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). Gut *39*, 690-697.

Shoveller, A.K., Stoll, B., Ball, R.O., and Burrin, D.G. (2005). Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. The Journal of nutrition *135*, 1609-1612.

Siavoshian, S., Blottiere, H.M., Le Foll, E., Kaeffer, B., Cherbut, C., and Galmiche, J.P. (1997). Comparison of the effect of different short chain fatty acids on the growth and differentiation of human colonic carcinoma cell lines in vitro. Cell Biol Int *21*, 281-287.

Silverberg, M.S., Duerr, R.H., Brant, S.R., Bromfield, G., Datta, L.W., Jani, N., Kane, S.V., Rotter, J.I., Philip Schumm, L., Hillary Steinhart, A., et al. (2007). Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease. Eur J Hum Genet *15*, 328-335.

Silverberg, M.S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I.D., Bernstein, C.N., Brant, S.R., Caprilli, R., Colombel, J.F., Gasche, C., Geboes, K., et al. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. Can J Gastroenterol *19 Suppl A*, 5-36.

Smiddy, F.G., Gregory, S.D., Smith, I.B., and Goligher, J.C. (1960). Faecal loss of fluid, electrolytes, and nitrogen in colitis before and after ileostomy. Lancet *1*, 14-19.

Smith, E.A., and Macfarlane, G.T. (1997). Dissimilatory amino Acid metabolism in human colonic bacteria. Anaerobe *3*, 327-337.

Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J.P., Letulle, S., Langella, P., Corthier, G., Tran Van Nhieu, J., and Furet, J.P. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. PloS one *6*, e16393.

Soderlund, S., Granath, F., Brostrom, O., Karlen, P., Lofberg, R., Ekbom, A., and Askling, J. (2010). Inflammatory bowel disease confers a lower risk of colorectal cancer to females than to males. Gastroenterology *138*, 1697-1703.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 16731-16736.

Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., and Dore, J. (2009). Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. Inflammatory bowel diseases *15*, 1183-1189.

Spehlmann, M.E., Begun, A.Z., Burghardt, J., Lepage, P., Raedler, A., and Schreiber, S. (2008). Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. Inflammatory bowel diseases *14*, 968-976.

Stephen, A.M., and Cummings, J.H. (1980). The microbial contribution to human faecal mass. Journal of medical microbiology *13*, 45-56.

Stoll, B., Burrin, D.G., Henry, J., Yu, H., Jahoor, F., and Reeds, P.J. (1999). Substrate oxidation by the portal drained viscera of fed piglets. The American journal of physiology *277*, E168-175.

Stoll, B., Henry, J., Reeds, P.J., Yu, H., Jahoor, F., and Burrin, D.G. (1998). Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. The Journal of nutrition *128*, 606-614.

Subramanian, S., Rhodes, J.M., Hart, C.A., Tam, B., Roberts, C.L., Smith, S.L., Corkill, J.E., Winstanley, C., Virji, M., and Campbell, B.J. (2008). Characterization of epithelial IL-8 response to inflammatory bowel disease mucosal E. coli and its inhibition by mesalamine. Inflammatory bowel diseases *14*, 162-175.

Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griendling, K.K., and Lambeth, J.D. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. Nature *401*, 79-82.

Sutherland, L., Singleton, J., Sessions, J., Hanauer, S., Krawitt, E., Rankin, G., Summers, R., Mekhjian, H., Greenberger, N., Kelly, M., et al. (1991). Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. Gut *32*, 1071-1075.

Szanto, I., Rubbia-Brandt, L., Kiss, P., Steger, K., Banfi, B., Kovari, E., Herrmann, F., Hadengue, A., and Krause, K.H. (2005). Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. J Pathol *207*, 164-176.

T

Taupin, D., and Podolsky, D.K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. Nat Rev Mol Cell Biol *4*, 721-732.

Thai, P., Loukoianov, A., Wachi, S., and Wu, R. (2008). Regulation of airway mucin gene expression. Annual review of physiology *70*, 405-429.

Tham, D.M., Whitin, J.C., and Cohen, H.J. (2002). Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. Pediatr Res *51*, 641-646.

Tothmeresz, B. (1995). Comparison of different methods for diversity ordering. . Journal of Vegetation Science., 283-290.

Townsend, J.H., Davis, S.R., Mackey, A.D., and Gregory, J.F., 3rd (2004). Folate deprivation reduces homocysteine remethylation in a human intestinal epithelial cell culture model: role of serine in one-carbon donation. American journal of physiology *286*, G588-595.

Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P., and Hansen, J.C. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. Mol Cell Biol *18*, 4629-4638.

Tsunada, S., Iwakiri, R., Ootani, H., Aw, T.Y., and Fujimoto, K. (2003). Redox imbalance in the colonic mucosa of ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol *38*, 1002-1003.

Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., et al. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature *457*, 480-484.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature *444*, 1027-1031.

Tytgat, K.M., Buller, H.A., Opdam, F.J., Kim, Y.S., Einerhand, A.W., and Dekker, J. (1994). Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin. Gastroenterology *107*, 1352-1363.

U

Ulitsky, A., Ananthakrishnan, A.N., Naik, A., Skaros, S., Zadvornova, Y., Binion, D.G., and Issa, M. (2011). Vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease: association with disease activity and quality of life. JPEN J Parenter Enteral Nutr *35*, 308-316.

V

Van der Sluis, M., De Koning, B.A., De Bruijn, A.C., Velcich, A., Meijerink, J.P., Van Goudoever, J.B., Buller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., et al. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. Gastroenterology *131*, 117-129.

Vaugelade, P., Posho, L., Darcy-Vrillon, B., Bernard, F., Morel, M.T., and Duee, P.H. (1994). Intestinal oxygen uptake and glucose metabolism during nutrient absorption in the pig. Proc Soc Exp Biol Med *207*, 309-316.

Velazquez, O.C., Seto, R.W., Bain, A.M., Fisher, J., and Rombeau, J.L. (1997). Deoxycholate inhibits in vivo butyrate-mediated BrDU labeling of the colonic crypt. J Surg Res *69*, 344-348.

Velcich, A., Palumbo, L., Jarry, A., Laboisse, C., Racevskis, J., and Augenlicht, L. (1995). Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. Cell Growth Differ *6*, 749-757.

Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., and Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. Science (New York, N.Y *295*, 1726-1729.

W

Wang, J.Y., and Johnson, L.R. (1990). Luminal polyamines stimulate repair of gastric mucosal stress ulcers. The American journal of physiology *259*, G584-592.

Wang, J.Y., and Johnson, L.R. (1992). Luminal polyamines substitute for tissue polyamines in duodenal mucosal repair after stress in rats. Gastroenterology *102*, 1109-1117.

Wilke, C.M., Bishop, K., Fox, D., and Zou, W. (2011). Deciphering the role of Th17 cells in human disease. Trends Immunol *32*, 603-611.

Willing, B., Halfvarson, J., Dicksved, J., Rosenquist, M., Jarnerot, G., Engstrand, L., Tysk, C., and Jansson, J.K. (2009). Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. Inflammatory bowel diseases *15*, 653-660.

Wolffram, S., Badertscher, M., and Scharrer, E. (1994). Carrier-mediated transport is involved in mucosal succinate uptake by rat large intestine. Experimental physiology *79*, 215-226.

Wong, W.M., Poulsom, R., and Wright, N.A. (1999). Trefoil peptides. Gut *44*, 890-895.

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 (New York, N.Y *334*, 105-108.

Wu, X., Ma, C., Han, L., Nawaz, M., Gao, F., Zhang, X., Yu, P., Zhao, C., Li, L., Zhou, A., et al. (2010). Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. Curr Microbiol *61*, 69-78.

X

Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature *448*, 427-434.

Y

Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S.V., and Merlin, D. (2009). Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. PloS one *4*, e6073.

Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature *486*, 222-227.

Yong, E. (2012). Gut microbial 'enterotypes' become less clear-cut. In Nature (Nature News).

Yu, Q.T., Saruta, M., Avanesyan, A., Fleshner, P.R., Banham, A.H., and Papadakis, K.A. (2007). Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. Inflammatory bowel diseases *13*, 191-199.

Z

Zaharia, V., Varzescu, M., Djavadi, I., Newman, E., Egnor, R.W., Alexander-Chacko, J., and Charney, A.N. (2001). Effects of short chain fatty acids on colonic Na+ absorption and enzyme activity. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol *128*, 335-347.

Zhu, H., and Li, Y.R. (2012). Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. Exp Biol Med (Maywood) *237*, 474-480.

Znalesniak, E.B., Durer, U., and Hoffmann, W. (2009). Expression profiling of stationary and migratory intestinal epithelial cells after in vitro wounding: restitution is accompanied by cell differentiation. Cell Physiol Biochem *24*, 125-132.

Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D., and De Vos, W.M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. Applied and environmental microbiology *64*, 3854-3859.