



HAL
open science

Etude des altérations anatomiques et fonctionnelles de la paroi intestinale induites par les nitrates, les nitrites et les dérivés N-nitrosés contaminants de l'alimentation de l'homme

Rafael Garcia Villar

► To cite this version:

Rafael Garcia Villar. Etude des altérations anatomiques et fonctionnelles de la paroi intestinale induites par les nitrates, les nitrites et les dérivés N-nitrosés contaminants de l'alimentation de l'homme. convention d'aide à la recherche-EN97C23, 2000. hal-02839978

HAL Id: hal-02839978

<https://hal.inrae.fr/hal-02839978>

Submitted on 7 Jun 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

INRA – Unité de Neuro-Gastroentérologie & Nutrition
Département Nutrition, Alimentation et Sécurité Alimentaire

**ÉTUDE DES ALTÉRATIONS ANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES
DE LA PAROI INTESTINALE INDUITES PAR
LES NITRATES, LES NITRITES ET LES DÉRIVÉS N-NITROSÉS
CONTAMINANTS DE L'ALIMENTATION DE L'HOMME.**

Rapport Final
(Février 2000)

Rafael GARCIA-VILLAR

Directeur du Programme Scientifique : Lionel BUÉNO

Ont participé à ce travail: Pauline ANTON, Viviane BERTRAND, Lionel BUENO, Stanislas CHAUSSADE, Jean FIORAMONTI, Rafael GARCIA-VILLAR, Florence LAMINE, Muriel LARAUCHE, Paquita MARCHE, Stéphan MARTY, Lucien RESSAYRE, Marie-Laure ROUZADE, Sabine ROY, Vassilia THEODOROU.

Convention d'aide à la Recherche N° EN97C23
Ministère de l'Environnement : Programme "Environnement et santé"

Référence Destination : AC005C

Code INRA : A00729

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| A. POSITION DU PROBLÈME | 3 |
| B. PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE ET MÉTHODES | 5 |
| B.1 – Etude aiguë | 5 |
| B.1.1 – Mesure des mouvements hydriques intestinaux | 5 |
| B.1.2 – Etude de la sensibilité gastrique à la distension | 7 |
| B.2 – Etude subchronique | 9 |
| B.2.1 – Influence de l'ingestion quotidienne de nitrates et de nitrites | 9 |
| <i>B.2.1.1 – Etude fonctionnelle</i> | 9 |
| <i>B.2.1.2 – Etude anatomo-pathologique</i> | 11 |
| <i>B.2.1.3 – Paramètres biochimiques tissulaires</i> | 12 |
| <i>B.2.1.4 – Protocole expérimental</i> | 14 |
| B.2.2 – Effet de l'ingestion de nitrates sur lors d'une inflammation digestive | 15 |
| <i>B.2.2.1 – Gastrite expérimentale induite par l'iodoacétamide</i> | 15 |
| <i>B.2.2.2 – Colite expérimentale induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique</i> | 16 |
| <i>B.2.2.3 – Statistiques</i> | 16 |
| C. RÉSULTATS | 17 |
| C.1 – Etude aiguë | 17 |
| C.1.1 – Mesure des mouvements d'eau à travers la paroi colique | 17 |
| C.1.2 – Etude de la sensibilité gastrique à la distension | 19 |
| C.2 – Etude subchronique | 22 |
| C.2.1 – Effet de l'ingestion de nitrates et de nitrites pendant 14 jours chez le sujet sain | 22 |
| <i>C.2.1.1 – Etude fonctionnelle: contractilité du muscle lisse in vitro</i> | 22 |
| C.2.1.1.1 - Protocole expérimental | 22 |
| C.2.1.1.2 - Résultats | 23 |
| <i>C.2.1.2 – Etude anatomo-pathologique</i> | 24 |
| C.2.1.2.1 – Gain de poids corporel | 24 |
| C.2.1.2.2 – Topographie structurale | 25 |
| C.2.1.2.3 – Détermination du nombre de mastocytes | 25 |
| C.2.1.2.4 – Quantification des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles | 27 |
| <i>C.2.1.3 – Paramètres biochimiques tissulaires</i> | 28 |
| C.2.1.3.1 – Mesure de l'activité myéloperoxydase | 28 |
| C.2.1.3.2 – Mesure de l'activité monoxyde d'azote synthétase (NOS) | 30 |
| C.2.1.3.3 – Mesure de la concentration tissulaire en histamine | 31 |
| C.2.2 – Effet de l'ingestion de nitrates et de nitrites lors d'une inflammation digestive | 32 |
| <i>C.2.2.1 – Gastrite expérimentale induite par l'iodoacétamide</i> | 32 |
| C.2.2.1.1 - Effet du KNO ₃ sur la gastrite | 32 |
| C.2.2.1.2 - Effet du nitroprussiate de sodium sur la gastrite | 33 |
| <i>C.2.2.2 – Colite expérimentale induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique</i> | 34 |
| C.2.2.2.1 – Effet du nitroprussiate de sodium sur la chute de poids corporel | 34 |
| C.2.2.2.2 – Effet sur les scores lésionnels macroscopiques | 35 |
| C.2.2.2.3 - Effet sur l'infiltration neutrophilaire | 36 |
| C.2.2.2.4 - Effet sur le nombre de mastocytes muqueux | 37 |
| D. CONCLUSIONS | 38 |

Publications et communications auxquelles ce travail a donné lieu:

PUBLICATION

- Rouzade, M. L., Anton, P., Fioramonti, J., Garcia-Villar, R., Theodorou, V., Buéno, L. (1999) Reduction in gastric sensitivity to distension by nitrate ingestion in rats. *Alim Pharmacol Ther* 13: 1235-1241

COMMUNICATIONS

- Anton, P., Cordurié, P., Theodorou, V., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J., Buéno, L. (1999) Prévention par le nitrate de potassium d'une gastrite expérimentale induite par l'iodoacétamide chez le rat. Journées francophones de pathologie digestive, Nantes, mars 1999 [*Gastroenterol Clin Biol* 23 (2bis), A121]
- Anton, P., Roy, S., Theodorou, V., Fioramonti, J., Buéno, L. (2000) Effet d'un donneur de monoxyde d'azote sur une colite induite par le TNBS chez le rat. Journées Francophones de Pathologie Digestive SNFGE. Nice, 18-22 mars 2000.
- Anton, P., Theodorou, V., Garcia-Villar, R., Marche, P., Ressayre, L., Fioramonti, J., Buéno, L. (1998) Influence of chronic ingestion of nitrates and nitrites on gastrointestinal neutrophils and mast cells in rats. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, New Orleans, Mai 1998 [*Gastroenterology* 114: A921]
- Garcia-Villar, R., Anton, P., Marty, S., Theodorou, V., Fioramonti, J., Buéno, L. (1999) Chronic ingestion of nitrate and nitrite increases in vitro cholinergic contractility and decreases neutrophil content of the jejunum in rats. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, Mai 1999 [*Gastroenterology* 116 (4 part 2), A996]
- Lamine, F., Theodorou, V., Anton, P., Roy, S., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J., Buéno, L. (2000) Protective effects of intraluminal nitric oxide in experimental colitis in rats. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, San Diego, Mai 2000 (Poster)
- Larauche, M., Anton, P., Fioramonti, J., Garcia-Villar, R., Theodorou, V., Buéno, L. (2000) Effet protecteur du monoxyde d'azote d'origine alimentaire vis-à-vis d'une gastrite expérimentale chez le rat. Journées Francophones de Pathologie Digestive SNFGE. Nice, 18-22 mars 2000.
- Larauche, M., Anton, P., Fioramonti, J., Garcia-Villar, R., Theodorou, V., Buéno, L. (2000) Protective effect of dietary nitric oxide on experimental gastritis in rats. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, San Diego, Mai 2000 (Poster).
- Rouzade, M. L., Fioramonti, J., Buéno, L. (1998) Intragastric potassium nitrate decreases sensitivity to gastric distension by a mechanism involving nitric oxide but not potassium ions in anesthetized rats. 9th International Symposium on Neurogastroenterology and Motility. Maastricht. [*Neurogastroenterol Mot* 10, p 441, A40]

MÉMOIRES DE STAGE

- Marty S. (1998) Effets de l'ingestion de sels de nitrate et de nitrite sur la motricité intestinale et les mouvements hydriques coliques chez le rat. Mémoire de stage DESU, Université Paul Sabatier-Toulouse III (Sciences) soutenu le 25 septembre 1998. 48pp plus annexes, 105 réfs.
- Roy S (1999) Influence du monoxyde d'azote exogène sur une colite expérimentale chez le rat. Mémoire de Stage BTS, Lycée Saliège, Toulouse. 20pp plus annexes, 44 réfs.

A. POSITION DU PROBLÈME

L'objectif du projet était de déterminer si l'ingestion régulière de nitrates ou de nitrites, a des doses susceptibles d'être trouvées dans l'alimentation normale et dans l'eau de boisson de l'homme et/ou des animaux d'élevage, était capable d'altérer l'intégrité anatomo-fonctionnelle de la paroi intestinale (muqueuse, musculuse, innervation intrinsèque), créant ainsi les conditions du développement de pathologies digestives plus conséquentes. Notre hypothèse était que des pathologies intestinales telles que les **troubles fonctionnels intestinaux**, qui affectent près de 15% de la population des pays occidentaux, seraient favorisées par un "état micro-inflammatoire" de la muqueuse digestive, provoqué par l'ingestion prolongée de xénobiotiques de diverses natures, contenus à de faibles doses dans l'alimentation.

Dans ce contexte, l'impact sur la santé humaine ou animale des nitrates, nitrites et dérivés N-nitrosés (nitrosamines, nitrosamides...) présents dans de nombreux aliments courants et dans l'eau de boisson est ressenti de façon de plus en plus critique. L'organisme qui ingère ces dérivés azotés en même temps que ses nutriments, doit y faire face et apporter les réponses les mieux adaptées pour la survie de l'espèce. A cet égard, le tube digestif, et plus particulièrement sa muqueuse, constitue la première barrière de protection contre des substances toxiques présentes dans l'alimentation. Or, il n'existe pratiquement aucune étude approfondie des répercussions d'apports quotidiens de dérivés nitrés sur la physiologie intestinale ou sur les éventuels processus physiopathologiques qu'ils pourraient induire.

Les recherches qui ont fait l'objet de la présente convention d'aide a été menée sur une période de 2 ans. Elles ont envisagé à la fois les effets sur la paroi gastro-intestinale de l'ingestion aiguë et de l'ingestion subchronique (14 jours) de sels (sodium et potassium) de nitrate et de nitrite chez le rat. Les concentrations utilisées ont été précisées au cours d'essais pilotes, en fonction des données de la littérature relatives aux concentrations susceptibles d'être présentes dans l'eau de boisson ou les aliments, aux doses "sans-effet" (DSE) et léthales 50% (DL50) chez le rat et aux doses journalières admissibles (DJA) chez l'homme.

Au cours de la deuxième année du programme, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes impliqués dans l'action des nitrates et des nitrites sur la paroi intestinale au cours d'un processus inflammatoire et notamment à une médiation possible de ces effets par le monoxyde d'azote (NO). L'hypothèse de travail était que l'ingestion de dérivés nitrés pouvait avoir des répercussions plus marquées sur l'organisme dans un contexte physiopathologique digestif que chez des sujets sains

B. PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE ET MÉTHODES

Ce travail a été réalisé suivant une approche expérimentale comportant deux volets. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'impact d'une exposition unique (administration aiguë) aux sels de nitrate et/ou nitrite sur un paramètre fonctionnel (mouvements hydriques au niveau de la paroi colique) et sur un paramètre de viscérosensibilité (distension gastrique). Nous avons ensuite envisagé les conséquences d'une ingestion quotidienne répétée pendant 14 jours (administration subchronique) de ces sels sur des paramètres anatomiques, biochimiques et fonctionnels, puis lors de processus inflammatoires digestifs (gastrite et colite expérimentales).

B.1 – Etude aiguë

B.1.1 – Mesure des mouvements hydriques intestinaux

La mesure du flux net d'eau au niveau du côlon proximal est un paramètre classiquement utilisé afin d'apprécier les variations des mouvements hydriques au niveau de la paroi colique.

B.1.1.1 - Préparation des animaux

La mesure des flux hydriques coliques a été réalisée selon la technique de l'anse canulée et perfusée (Quito & Brown, 1987). Après avoir anesthésié les rats à l'uréthane (2g/kg, i.p), anesthésique irréversible, nous avons réalisé une laparotomie xypho-ombilicale afin d'accéder à la jonction caeco-colique. Un segment de 5 cm de côlon proximal situé à 1 cm de la jonction caeco-colique a été isolé, canulé à sa partie proximale et rincé avec une solution de sérum physiologique (NaCl 0,9%). Ce segment a été ensuite ligaturé et canulé à sa partie distale pour permettre la perfusion intra-luminale, puis replacé dans la cavité abdominale. L'incision a ensuite été suturée. Les rats ont été placés par la suite sur une table chauffante pendant toute la durée de l'expérience afin de maintenir leur température corporelle à 37°C.

B.1.1.2 - Mesure du flux net d'eau

Après avoir rincé et évacué leur contenu avec une solution saline (NaCl à 0,9%), les anses coliques (côlon proximal) sont perfusées avec une solution de Tyrode isotonique contenant (en mmol/l): Na^+ 142,6 ; K^+ 5,0 ; Mg^{2+} 1,2 ; Ca^{2+} 1,3 ; Cl^- 123,8 ; HCO_3^- 25,0 ; HPO_4^{2-} 17,0 ; glucose 5,0. La solution contenait aussi 1 $\mu\text{Ci/l}$ de polyéthylène glycol de poids moléculaire 4000 (PEG 4000) marqué au ^{14}C utilisé comme marqueur de dilution non absorbé du flux net d'eau et 5 g/l de PEG 4000 non marqué comme transporteur. Le segment de côlon a été perfusé à l'aide d'une pompe péristaltique (Gilson-Minipuls 2-95400 Villiers le Bel - France) à un débit constant de 6 ml/h. L'effluent a été recueilli toutes les 15 minutes, par un collecteur

de fractions (Buchler Instruments Inc, Fort Lee, New Jersey, USA), pendant une durée totale de 360 minutes, les deux premières heures correspondant à la période d'équilibration. L'activité β du ^{14}C dans les échantillons collectés a été déterminée par scintillation liquide (Kontron Instruments 31520 Ramonville Toulouse-France).

Le flux net d'eau de chaque échantillon collecté toutes les 15 minutes a été déterminé à l'aide de la formule suivante:

$$1 - (\text{CPMs}/\text{CPMx}) \times (\text{P}/\text{L}) = \text{flux net } (\mu\text{l}/\text{cm}/\text{h})$$

où CPMs correspond à l'activité du ^{14}C dans la solution perfusée, CPMx l'activité de l'échantillon recueilli, P le débit de perfusion et L la longueur du segment colique perfusé.

Nous avons ensuite calculé la moyenne du flux net d'eau sur deux échantillons consécutifs afin d'obtenir une valeur moyenne de flux net d'eau pendant une période de 30 minutes. Les valeurs positives correspondant à une absorption d'eau, les valeurs négatives à une sécrétion hydrique. De plus, le taux de récupération du ^{14}C PEG 4000 a été déterminé dans le volume total de l'effluent collecté au cours de toute la durée de l'expérience aussi bien chez les animaux témoin que chez les animaux traités par les sels de nitrate et de nitrite de manière à mettre en évidence un éventuel passage du ^{14}C PEG 4000 à travers l'épithélium colique. Ce taux a oscillé entre 91 et 102% et n'a pas indiqué de changement dans l'absorption du ^{14}C PEG 4000 à travers la muqueuse colique. Au cours de la perfusion par les sels de nitrate et de nitrite, la solution de Tyrode a été modifiée afin de respecter l'équilibre isotonique. En effet, un déséquilibre ionique peut être responsable de phénomènes d'hyperabsorption ou d'hypersecretion indépendants de l'agent perfusé. Aussi, pour chaque sel utilisé et ce pour chacune des doses, la quantité correspondante de NaCl a été éliminée.

B.1.1.3 - Protocole expérimental

Les études ont été réalisées sur des rats mâles de souche Wistar (250-300 g). Les animaux étaient au préalable placés dans des cages individuelles en polyprène, sur une litière de sciure de bois, à température ambiante (22 ± 1 °C) et avaient un libre accès à la nourriture et à l'eau de boisson.

Cinq lots de 8 rats ont été utilisés. Le premier lot a servi de contrôle et a reçu une perfusion de NaCl à la dose de 170 mg/kg. Les deux lots suivants ont été traités par une perfusion de nitrate de sodium (NaNO_3) respectivement aux doses de 125 et 250 mg/kg. Sur les deux derniers lots, une perfusion de nitrite de sodium (NaNO_2) a été effectuée respectivement aux doses de 4 et 8 mg/kg.

B.1.1.4 – Statistiques

Après une analyse de variance pour chacune des perfusions effectuées, l'étude statistique a été réalisée avec le test non paramétrique pour séries appariées de Wilcoxon. La comparaison entre les sécrétions nettes d'eau (60/90 min) des différents traitements a également été précédée d'une analyse de variance (ANOVA) avant de procéder à l'étude statistique au moyen du test non paramétrique pour séries non appariées de Mann-Whitney. La valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

B.1.2 – Etude de la sensibilité gastrique à la distension

B.1.2.1 - Préparation des animaux

Les animaux ont été mis à jeun la veille de l'étude mais avaient libre accès à l'eau de boisson. Le jour même, ils ont été anesthésiés au pentobarbital sodique (Nembutal, Sanofi Recherche, Libourne, France; 60 mg/kg; sc). L'anesthésie a été maintenue par une ré-administration de cet anesthésique (15 mg/kg/h). La température corporelle a été maintenue à 35°C en plaçant les animaux sur une table chauffante.

La trachée a été canulée pour faciliter la respiration de l'animal. Un cathéter (0,3 mm diamètre interne; 0,7 mm diamètre externe) a été introduit dans l'aorte thoracique via la carotide gauche afin de procéder à une perfusion rétrograde constante de sérum physiologique additionné de nembutal. Le débit de la perfusion était de 40 μ l/mn. La pression artérielle systémique a été enregistrée à partir de ce cathéter intra-carotidien au moyen d'un capteur de pression (P231D) connecté à un polygraphe (R 411 dynograph, Beckman, Palo Alto, USA).

Afin de procéder aux distensions gastriques, une laparotomie xypho-ombilicale a été effectuée afin d'exposer l'estomac. Un ballon, de 5 à 5,5 cm de long et fait avec un préservatif, a été placé dans l'estomac selon une méthode précédemment décrite. Il a été suturé avec une soie à un cathéter (1 mm diamètre interne; 1,8 mm diamètre externe). La portion de cathéter insérée dans le ballon a été perforée régulièrement afin de faciliter l'entrée d'air dans le ballon. Le volume du ballon était supérieur à celui de l'estomac afin d'éviter toute résistance du ballon lors de l'insufflation d'air. Le ballon a été placé dans l'estomac à travers une petite incision réalisée à la base du cardia. Le cathéter a été extériorisé à travers la laparotomie réalisée et les plans musculaires et cutanés ont été suturés.

Des distensions isobariques de l'estomac ont été effectuées en connectant le ballon à un barostat et les volumes de distension ont été enregistrés de façon permanente sur un polygraphe Beckman. Les administrations intragastriques des solutions ont été faites à travers un cathéter couplé au cathéter portant le ballon et extériorisé avec lui.

B.1.2.2 – Mesure de la sensibilité gastrique à la distension

La pression artérielle basale a été enregistrée pendant 5 minutes avant de procéder à l'injection intragastrique des solutions. Les distensions gastriques isobariques ont été réalisées par paliers avec des déflations intermittentes. Chaque palier de distension durait 20 secondes. La première distension a été réalisée à une pression de 10 mmHg et une augmentation de 5 mmHg a été réalisée toutes les 5 minutes jusqu'à une pression maximale de 40 mmHg. Cinq minutes après la dernière distension, la sensibilité à une douleur somatique a été évaluée en

quantifiant la chute de pression artérielle consécutive à un pincement de la peau réalisé à l'aide d'une porte-aiguille durant 10 secondes.

B.1.2.3 - Protocole expérimental

Les études ont été réalisées sur des rats mâles de souche Wistar (300-350 g). Les animaux étaient au préalable placés dans des cages individuelles en polyprène, sur une litière de sciure de bois, à température ambiante (22 ± 1 °C) et avaient un libre accès à la nourriture et à l'eau de boisson.

Sept lots de 8 rats ont reçu les solutions suivantes directement dans l'estomac. Le premier lot a servi de témoin (H_2O ; 1 ml). Quatre autres lots ont respectivement eu le KNO_3 , le $NaNO_3$, le KCl et le $NaCl$ à la dose de 0,1 mmol/kg. L'effet du NO produit par les sels de nitrate a été étudié avec des agents pharmacologiques: un donneur de NO, le nitroprussiate de sodium (SNP; 5 mg/kg) et un piègeur du NO, l'hémoglobine (Hb; 150 mg/kg) administrés soit avec de l'eau, soit avec le KNO_3 .

B.1.2.4 – Statistiques

La chute de pression artérielle a été quantifiée en mesurant la chute maximale de pression sanguine observée après la stimulation nociceptive, exprimée en variation de la pression artérielle en mmHg. Les valeurs obtenues ont été exprimées en moyenne \pm ESM. L'analyse statistique des données a été réalisée par analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Student. Les différences ont été considérées significatives pour $p < 0,05$.

B.2 – Etude subchronique

B.2.1 – Influence de l'ingestion quotidienne de nitrates et de nitrites

B.2.1.1 – Etude fonctionnelle

Cette étude s'est focalisée sur la mesure de la contractilité de la couche musculaire longitudinale du jéjunum de rats traités pendant 14 jours par les sels de nitrate et nitrite.

B.2.1.1.1 – Préparation des lambeaux

Lors du sacrifice des animaux, les segments de jéjunum (10 cm de long) prélevés, sont ouverts longitudinalement puis rincés dans un tampon physiologique de Krebs (pH=7,4) composé de (en mmol/l): NaCl, 118,0 ; NaHCO₃, 25,0 ; KCl, 5,0 ; KH₂PO₄, 1,0 ; MgSO₄, 1,0 ; Glucose, 11,0 et CaCl₂, 1,3. A l'aide d'une lame de scalpel, le mésentère est éliminé et huit lambeaux de la paroi du jéjunum sont alors découpés (10 mm x 2 mm) dans le sens des fibres longitudinales. Un long fil de coton est ligaturé à la partie supérieure du lambeau pour permettre son accrochage à une jauge de contrainte du système d'enregistrement des contractions (UF1, Pioden Controls Ltd, Canterbury, GB), alors que la partie inférieure du lambeau est équipée d'une boucle du même fil pour la fixation à la partie inférieure de la chambre de superfusion. Huit lambeaux de jéjunum ont été placés simultanément dans des chambres de superfusion individuelles où ils ont reçu de façon continue (Pompe péristaltique, Pumpsystem, MV16, Ismatec SA, Zurich, Suisse) par la tubulure principale le tampon de superfusion (Krebs), oxygéné (95% O₂/5% CO₂) à température constante (35-37°C), délivré au débit constant (2 ml/mn). Les agents pharmacologiques testés (Carbachol, sérotonine, neurokinine A) ont été instillés à l'aide d'une tubulure annexe au débit de 40 µl/mn. Le tampon de superfusion, comme les agents pharmacologiques, ont été évacués instantanément par vidange gravitaire.

B.2.1.1.2 - Acquisition des données

Chaque lambeau est fixé d'une part à la partie inférieure de la chambre de superfusion et d'autre part à un capteur de force isométrique à jauge de contrainte relié à l'amplificateur qui lui transmet un courant ($I=U/R$) toujours constant. Les contractions du lambeau tendent à modifier la résistance de cette jauge en faisant varier l'intensité du courant restitué par l'amplificateur. Ces variations sont transcrites de façon numérique en tension, puis exprimées en grammes. L'amplificateur transmet chaque seconde les informations à un enregistreur multicanaux (ASTRO-MED, Inc, MT 95000, West Warwick, Rhode Island, USA), à un micro-ordinateur (Compaq Prolinea 3/25 S) qui grâce au programme ISORGAN (F. Vinson, non publié ; programme réalisé avec Lab View, National Instruments, Austin, USA) permet de visualiser numériquement et graphiquement à l'écran les variations de la tension. Ce programme permet l'acquisition des données en temps réel et génère toutes les 15 minutes des fichiers de données qui seront analysés ultérieurement.

B.2.1.1.3 - Analyse et expression des résultats

Les fichiers de données générés par le programme ISORGAN sont analysés grâce au deuxième micro-ordinateur (Compaq, Prolinea MT 4/66), à l'aide du programme CALIGRAM (Vinson et Balcaen, non publié ; réalisé avec Borland C⁺⁺4.5, Object Windows 2.5 et Visual Solution Pack 1.1). Ce programme permet d'obtenir pour chaque piste les paramètres relatifs à chaque contraction :

- temps : début, fin et durée de la contraction ;
- tension relative : tension maximale - tension de base appliquée au lambeau.

Les tensions relatives des contractions induites par les différentes concentrations d'agents pharmacologiques apparaissent dans les tableaux récapitulatifs élaborés à partir du logiciel Excel 5. Pour chaque piste, a été exprimée l'amplitude des contractions en pourcentage de la moyenne des amplitudes des contractions obtenues avec les contrôles KCl (60mM). Ces contractions KCl sont prises comme référence, c'est-à-dire qu'elles représentent le 100% de contraction. Ce calcul permet de s'affranchir des paramètres propres à chaque lambeau qui sont en fait déterminants en ce qui concerne l'amplitude de la contraction (nombre de fibres musculaires présentes dans le lambeau), et ainsi de pouvoir comparer les données des différentes pistes entre elles.

B.2.1.1.4 - Courbes concentration-réponse (CCR)

Les courbes concentration-réponse des neuromédiateurs du système nerveux intrinsèque, carbachol (CCH), hydroxytryptamine (5-HT) et neurokinine A (NKA), ont été construites par superfusion de concentrations croissantes non cumulatives de 2.10^{-9} M à 2.10^{-6} M pour la NKA ou 2.10^{-9} M à 2.10^{-5} M pour le CCH et la 5-HT par incrément de 1 log M. Toutes les concentrations ont été exprimées en concentrations finales au contact du tissu et couvrent la totalité de la gamme d'effets (de "l'absence d'effet" à "l'effet maximal"). Toutes les expérimentations ont été réalisées sur 3 lambeaux pour chaque animal et répétées six fois sur des animaux différents.

Quatre contrôles ont été réalisés en perfusant une solution de KCl 60 mM jusqu'à ce que la réponse des lambeaux au KCl soit stable et reproductible. Des périodes de rinçage de 10 minutes ont été observées entre les 4 premiers KCl contrôles, entre le dernier KCl contrôle et la perfusion du premier des trois neuromédiateurs ainsi qu'entre un KCl contrôle intermédiaire (administration de KCl 60 mM entre la perfusion de deux neuromédiateurs différents) et la perfusion du neuromédiateur suivant. Une période de rinçage de 15 minutes a été effectuée entre la fin de la perfusion d'un agent et le KCl contrôle intermédiaire suivant. Chaque concentration de neuromédiateur a été superfusée pendant 3 minutes espacée d'une période de rinçage de 7 minutes. Les contrôles KCl 60 mM initiaux ont été comparés aux KCl contrôles intermédiaires et à 4 contrôles KCl 60 mM terminaux réalisés après l'administration des agonistes.

Ces courbes ont été obtenues à l'aide d'un logiciel GRAPH PAD PRISM. Les données (amplitude des contractions en pourcentage du KCl référence) ont été ajustées par régression non linéaire à une courbe sigmoïde par la méthode des moindres carrés pondérés. Les concentrations des agents pharmacologiques ont été exprimées en logarithme décimal afin d'avoir une échelle linéaire. L'analyse des données a permis, pour chacune des catégories d'animaux, de déterminer:

- la valeur de la réponse maximale (ou Emax);
- la valeur de la concentration d'agoniste qui induit 50% de la réponse maximale (ou EC₅₀).

B.2.1.1.5 - Statistiques

L'Emax et l'EC₅₀ moyens pour chaque animal ont été calculés à partir des valeurs obtenues pour chaque lambeau, et les résultats exprimées en moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM, n=6).

Après une analyse de variance (ANOVA), la comparaison entre les différents traitements a été réalisée avec un test statistique de comparaisons multiples de Bonferroni pour séries non appariées. La valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Pour la détermination des courbes concentration-réponse, les valeurs individuelles obtenues ont été "poolées" afin de pondérer les éventuelles valeurs aberrantes. L'analyse statistique a ensuite été effectuée de la même manière.

B.2.1.2 – Etude anatomo-pathologique

Cette partie du travail visait à mettre en évidence les éventuelles altérations anatomiques de la paroi du tractus digestif (estomac, jéjunum, côlon proximal) suite à l'ingestion quodienne des sels de nitrate et de nitrite.

B.2.1.2.1 – Topographie structurale

Les segments d'estomac, de jéjunum et de côlon proximal (2 à 3 cm de long) ont été fixés dans une solution de Carnoy (éthanol absolu à 60%, chloroforme à 30% et acide acétique à 10%) pendant 24 heures à température ambiante. Ces segments ont ensuite été déshydratés dans de l'éthanol absolu, éclaircis dans du xylène puis imprégnés de paraffine liquide avant de couler les blocs.

Après réalisation des blocs, des coupes de 5 μ m d'épaisseur ont été réalisées et les lames colorées avec l'hémalum/éosine avant d'être interprétées.

B.2.1.2.2 – Quantification des mastocytes

Une fois les coupes réalisées, elles ont été colorées au bleu alcian/O-safranine, coloration spécifique utilisée pour identifier les mastocytes (Roberts *et al*, 1990), le bleu alcian

permettant de mettre en évidence les granules d'héparine contenus dans le cytoplasme des mastocytes.

La quantification des mastocytes a été réalisée en microscopie optique à fort grossissement (x 0,45). L'image microscopique a été détectée par une caméra video (JVC 3-CCD) et traduite par un programme de capture d'image (Neotech, Eastleigh, GB), puis lue avec un logiciel d'analyse d'image Optilab Pro (Grafech, Marmande, France). Le nombre de mastocytes déterminé par imagerie microscopique a été exprimé par mm² de tissu.

B.2.1.2.3 – Quantification des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles

Les segments d'estomac et de jéjunum (2 à 3 cm de long) ont été fixés dans de l'acétone refroidie et additionnée de deux inhibiteurs d'enzymes protéolytiques: le phényl méthyl sulfonyl fluorure (PMSF; 2 mM) et l'iodoacétamide (20 mM) pendant 10 minutes à 4°C sous agitation avant d'être plongés dans de l'acétone et mis à -20°C pendant 48 heures. Ces segments ont ensuite été déshydratés dans du méthyl benzoate, éclaircis dans du xylène puis imprégnés de paraplast liquide avant de couler les blocs.

Après réalisation des blocs, des coupes de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées et les lames colorées lors de leur mise en présence d'une enzyme spécifiques des polynucléaires, la phosphatase alcaline. Ensuite, afin de différencier les neutrophiles des éosinophiles, le double des coupes a été mis en présence de "direct red", colorant ne révélant que ce type de polynucléaires.

La quantification des polynucléaires a été réalisée en microscopie optique à fort grossissement (x 0,45). L'image microscopique a été détectée par une caméra video (JVC 3-CCD) et traduite par un programme de capture d'image (Neotech, Eastleigh, GB), puis lue avec un logiciel d'analyse d'image Optilab Pro (Grafech, Marmande, France). Le nombre de polynucléaires déterminé par imagerie microscopique a été exprimé mm² de tissu.

B.2.1.2.4 - Statistiques

Tous les résultats obtenus au cours de l'étude anatomo-pathologique ont été exprimés en moyenne ± ESM. L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du test "t" de Student pour séries non appariées. Le seuil de signification choisi était de p<0,05.

B.2.1.3 – Paramètres biochimiques tissulaires

Dans cette partie de l'étude, nous avons dosé différents composés enzymatiques tissulaires témoignant de la réponse de la paroi digestive à l'exposition répétée à de faibles doses de sels de nitrate et de nitrite.

B.2.1.3.1 – Mesure de l'activité myéloperoxydase

L'activité MPO a été déterminée selon la méthode de Bradley *et al* (1982) sur les tissus prélevés après abattage des animaux. Ainsi, les segments d'estomac, de jéjunum et de côlon proximal (2 à 3 cm de long) ont été immergés dans du tampon phosphate (50 mM, pH=6,0). Après lyse mécanique dans de la glace à l'aide d'un polytron (PCU-2, Lucerne, Suisse), 3 cycles de congélation (azote liquide, 1 minute) et de décongélation (bain-marie, 37°C, 10 minutes) ont été réalisés. Après centrifugation (10000 rpm, 15 minutes, 4°C), le culot a été repris dans du bromure d'hexadecyl triméthylammonium (HTAB) à 0,5%. Les échantillons ont ensuite été soniqués (Büchi, Flawil, Suisse). Le surnageant a été récupéré en vue des dosages de l'activité MPO et des protéines totales.

L'activité MPO a été déterminée par spectrophotométrie. L'échantillon a été mis en présence de tampon phosphate (50 mM, pH=6,0) contenant de l'O-dianisidine hydroxylée (0,167 mg/ml) et du peroxyde d'hydrogène à 0,0005%. Les changements d'absorbance (450 nm, 25°C, 2 minutes) ont été déterminés sur un spectrophotomètre (Uvikon 860, St Quentin-en-Yvelines, France) et ramenés en unités MPO, une unité MPO étant définie comme celle dégradant 1 μ mole de peroxyde d'hydrogène par minute. Les protéines totales ont été dosées selon la méthode de Lowry (DC Protein Assay, Bio Rad, Ivry, France). L'activité MPO a été exprimée en U MPO/g de protéine.

B.2.1.3.2 – Mesure de l'activité monoxyde d'azote synthétase (NOS)

La détermination de l'activité NOS est un bon paramètre pour évaluer la production de monoxyde d'azote (NO) dans les tissus, le NO étant une molécule très instable ce qui rend sa détermination directe difficile (Rachmilewitz *et al*, 1995). Les activités NOST (totale) et NOSi (inductible) (et par différence NOSc, constitutive) ont été déterminées à l'aide d'un substrat radiomarqué : la [¹⁴C] L-arginine (Sigma, St-Quentin Fallavier, France).

Après homogénéisation de segments d'estomac et de jéjunum (2 à 3 cm de long) au polytron dans un tampon Tris-HCl (50 mM, pH=7,4) contenant du dithiothréitol, DTT (1 mM), du phénylméthyl sulphonyl fluorure, PMSF (1 mM) et des inhibiteurs de protéases, leupepsine (23,4 mM) et pepstatine (14,6 μ M), puis sonication, les échantillons ont été centrifugés (2 500 rpm, 4°C, 10 minutes) et les surnageants récupérés.

Dans un bain-marie à 37°C et pendant 45 minutes, les échantillons ont été mis en présence d'un tampon réactionnel constitué de Tris-HCl (50 mM, pH=7,4), de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit ou NADPH (200 μ M) comme co-substrat, de flavine adénine dinucléotide ou FAD (10 μ M), de flavine mononucléotide ou FMN (10 μ M), toutes deux comme groupes prosthétiques des NOS, de DTT (1 μ M), de tétrahydrobioptérine ou BH4 (50 μ M) comme co-facteur et de pepsine (5 mM) marqué à la [¹⁴C] L-arginine (1 μ Ci/ml). Ce tampon contenait en outre, pour le dosage de la NOST, du CaCl₂ (2 mM) en tant que cofacteur de la NOSc, ou, pour le dosage de la NOSi, Ca⁺⁺/Calmoduline indépendante, un mélange de

chélateurs de calcium : acide éthylène diamine tétraacétique EDTA (1 mM) et acide éthylène glycol-bis (2-aminoéthyl) N,N,N',N' tétraacétique ou EGTA (1 mM). Au bout de 45 minutes, la réaction a été stoppée à 4°C par un tampon d'arrêt (HEPES 30 mM + EDTA 3 mM, pH=5,5). Les solutions ont ensuite été passées sur une colonne de résine DOWEX-50W puis éluées afin de retenir la [¹⁴C] L-arginine en excès.

L'activité de [¹⁴C] lié à la L-citrulline a été déterminée sur compteur β par scintillation liquide (Kontron Instruments, Bâle, Suisse). Les activités NOST et NOSi ont été exprimées en pmol/h puis ramenées à la quantité totale de protéines (mg) contenue dans les échantillons déterminée d'après la méthode de Lowry.

B.2.1.3.3 – Mesure des concentrations tissulaires d'histamine

La quantité d'histamine libérée par les mastocytes a été déterminée *in vitro* par dosage radioimmunologique (RIA) à l'aide d'un kit commercial (Immunotech-Beckman, Marseille, France).

Des segments d'estomac et de jéjunum (2 à 3 cm de long) prélevés lors de l'abattage ont été placés dans des tubes à essai de 5 ml contenant une solution de Tyrode (3 ml). Un dégranulateur de mastocytes, le composé 48/80 (3 mg/ml; Sigma) a été additionné à cette solution. Vingt minutes après cette addition, un échantillon de 1 ml du milieu a été prélevé en vue du dosage de la quantité d'histamine. Cet échantillon a été mis en présence d'un réactif d'acylation pour acyler l'histamine et lui conférer une meilleure conformation lors de la mise en présence avec des anticorps monoclonaux anti-histamine. Les échantillons acylés ont ensuite été mis en présence d'un traceur d'acylation, la [¹²⁵I]-histamine, dans des tubes revêtus des anticorps monoclonaux anti-histamine en vue de réaliser le dosage RIA par compétition entre l'histamine modifiée (acylée) de l'échantillon et le traceur d'acylation, pour leur liaison à l'anticorps immobilisé sur le tube. Après incubation pendant 18 heures (2-8°C), le contenu des tubes a soigneusement été aspiré et l'activité de [¹²⁵I] déterminée sur compteur β (Cobra II, Packard Instruments, Meriden, U.S.A.).

La concentration en histamine (nM), inversement proportionnelle au nombre de coups par minute mesurés, a été déterminée d'après une courbe d'étalonnage, et ramenée à la quantité totale de protéines (μ g) contenue dans l'échantillon déterminée d'après la méthode de Bradford (Bio Rad, Ivry, France).

B.2.1.3.4 - Statistiques

Tous les résultats obtenus de l'étude des paramètres biochimiques tissulaires ont été exprimés en moyenne \pm ESM. L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du test "t" de Student pour séries non appariées. Le seuil de signification choisi était de $p < 0,05$.

B.2.1.4 - Protocole expérimental

Ces études ont été réalisées sur des rats mâles de souche Wistar (200-250 g). Les animaux étaient au préalable placés dans des cages individuelles en polyprène, sur une litière de sciure de bois, à température ambiante (22 ± 1 °C) et avaient un libre accès à la nourriture et à l'eau de boisson.

L'administration quotidienne durant 14 jours par voie gastro-oesophagienne (po) des sels de nitrate et de nitrite a été réalisée sur 5 lots de 8 rats. Le premier lot a reçu de l'eau (H_2O ; 1 ml po). Les deux lots suivants ont été traités par les sels de nitrate : $NaNO_3$ (500 mg/kg/j po) et KNO_3 (250 mg/kg/j po). Les deux derniers lots ont été traités les sels de nitrite : $NaNO_2$ (8 mg/kg/j po) et KNO_2 (5 mg/kg/j po). Les rats ont été pesés deux fois par semaine au cours de la durée du traitement. A l'issue du traitement, les animaux ont été sacrifiés et des segments d'estomac, de jéjunum et de côlon proximal ont été prélevés afin de mesurer les paramètres décrits ci-dessus.

B.2.2 – Effet de l'ingestion de nitrates sur lors d'une inflammation digestive

B.2.2.1 – Gastrite expérimentale induite par l'iodoacétamide

B.2.2.1.1 – La gastrite induite par l'iodoacétamide

Les modèles expérimentaux de gastrites peuvent reposer sur l'administration de différents types d'inducteurs. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à l'induction de l'inflammation gastrique par un agent chimique, l'iodoacétamide. Cette molécule provoque la détérioration du mucus cytoprotecteur de l'estomac. L'iodoacétamide, molécule inhibitrice des ponts disulfures responsables de la cohésion des mucines gastriques, provoque lors de son administration orale chez le rat des ulcérations gastriques (Karmeli *et al.*, 1996). Ce modèle se rapproche des gastrites induites par la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez l'homme.

B.2.2.1.2 – Protocole expérimental

Huit lots de 8 rats mâle Wistar (200-250 g) ont été utilisés. Les deux premiers lots ont reçu respectivement par voie orale (po) de l'eau (1 ml/j; lot témoin) et de l'iodoacétamide (25 mg/kg/j po) pendant 7 jours. Pendant la durée du traitement par l'iodoacétamide, le lot 3 a reçu du KNO_3 (250 mg/kg/j po), le lot 4, un donneur de NO, le nitroprussiate de sodium (SNP, 2 mg/kg/j po) et le lot 5, un piègeur de NO, l'hémoglobine (150 mg/kg/j po) associé au traitement par le KNO_3 . Les effets propres du KNO_3 , du SNP et de l'hémoglobine ont été étudiés en l'absence d'iodoacétamide sur les lots 6, 7 et 8. Le gain de poids corporel des animaux a été évalué tout au long du traitement. A l'issue des traitements, les animaux ont été sacrifiés et des échantillons d'estomac (2 cm de long) ont été prélevés afin de déterminer l'activité myéloperoxydase et de quantifier le nombre de mastocytes.

B.2.2.2 – Colite expérimentale induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique

B.2.2.1.1 – Induction d'une colite par l'acide trinitrobenzène sulfonique

L'acide trinitrobenzène sulfonique ou TNBS est une molécule administrée en association avec de l'éthanol absolu (50/50; v/v). Il se comporte comme un haptène chimique qui, une fois la muqueuse décapée par l'éthanol, se lie aux protéines des tissus et stimule l'immunité à médiation cellulaire. L'intérêt de ce modèle réside dans le fait que les médiateurs libérés sont similaires à ceux trouvés en excès dans les pathologies touchant le côlon (maladie de Crohn) chez l'homme.

B.2.2.1.2 – Préparation des animaux

Des cathéters intracoliques (0,30 mm de diamètre interne, 0,70 mm de diamètre externe) de 80 cm de long équipés de deux arrêteurs espacés de 1 cm de l'une des extrémités ont été préparés. Les rats ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'acépromazine (Calmivet, Vetoquinol, Lure, France) et de Kétamine (Imalgène 1000, Rhône-Mérieux, Lyon, France) aux doses respectives de 0,6 et 102 mg/kg. Après une laparotomie xypho-ombilicale et incision du côlon proximal (sur 2 mm à 2 cm du caecum), le cathéter a été introduit jusqu'à l'arrêteur le plus externe dans le sens antérograde et l'incision suturée. Le cathéter a été immobilisé sur le côlon au niveau du second arrêteur et au niveau du plan musculaire abdominal. Il a alors été exteriorisé à la base du cou et protégé par une canne en verre attachée à la peau. Les plans musculaires et cutanés ont été suturés. Les rats ont ensuite été placés dans des cages individuelles et maintenus dans une pièce à la température contrôlée ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) jusqu'à leur réveil. Les traitements ont débuté 5 jours après la chirurgie.

B.2.2.1.3 – Protocole expérimental

Quatre lots de 8 rats mâles Wistar (200-250 g) ont été utilisés. Le premier lot (témoin) a reçu une injection de sérum physiologique (NaCl 0,9%) suivie d'une perfusion continue pendant quatre jours de NaCl (0,9%) à un débit de 0,25 ml/h. Les deux lots suivants ont reçu une injection unique de TNBS (80 mg/kg) suivie d'une perfusion continue de NaCl (0,9%; 0,25 ml/h; 4 jours) ou de nitroprussiate de sodium (SNP; 2 mg/kg/j; 0,25 ml/h; 4 jours) respectivement. L'effet propre du SNP a été étudié sur le dernier lot. Le gain de poids corporel des animaux a été évalué tout au long du traitement. A l'issue du traitement, les rats ont été exsanguinés et des segments de côlon (2 cm de long) ont été prélevés afin de déterminer l'activité myéloperoxydase et de quantifier le nombre de mastocytes.

B.2.2.3 – Statistiques

Pour chaque paramètre étudié, les valeurs individuelles obtenues ont été exprimées en moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM). Après analyse de variance, la comparaison des effets des différents traitements a été réalisée à l'aide du test statistique non paramétrique pour séries non appariés de Mann-Whitney ou test U. La valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

C - RESULTATS

C.1- Étude aiguë

C.1.1 – Mesure des mouvements d'eau à travers la paroi colique

Le profil basal, obtenu en perfusant en continu une solution de Tyrode isotonique dans une anse colique proximale isolée et canulée, correspond à une absorption nette d'eau par le côlon proximal, contribuant à la fonction physiologique du gros intestin en tant qu'organe de compensation des pertes hydriques.

Sous nitrate de sodium

La perfusion pendant 60 minutes d'une solution de Tyrode isotonique modifiée, dans laquelle du nitrate de sodium a été introduit à la place de quantités équimoléculaires de NaCl, inverse ce profil basal d'absorption au profit d'une sécrétion nette d'eau aux deux concentrations utilisées. Cet effet se maintient pendant 1 à 2 heures après la fin de la perfusion (Figure 1).

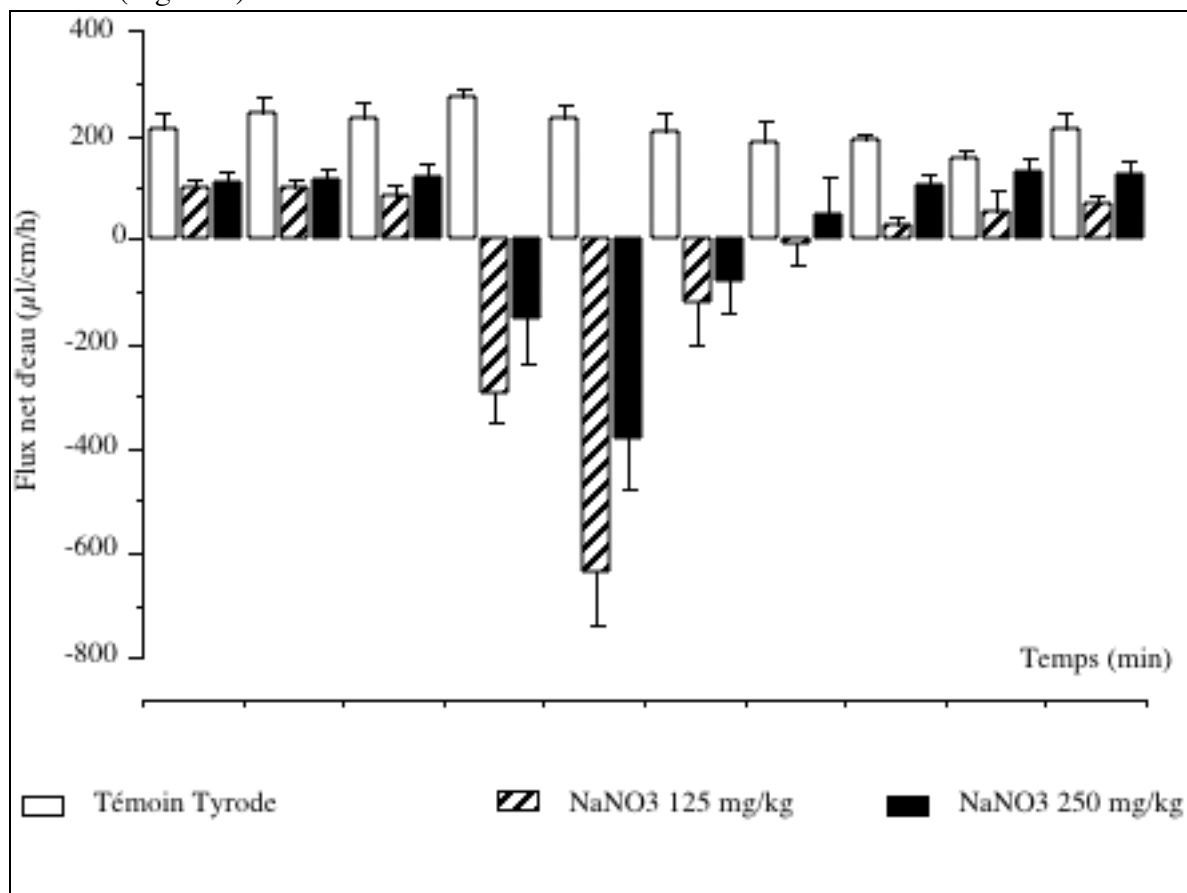


Figure 1 : Effets d'une perfusion intraluminaire isotonique de 60 minutes par du nitrate de sodium (NaNO₃) aux doses de 125 et 250 mg/kg sur les mouvements d'eau coliques (Valeurs moyennes ± ESM ; n=8).

Sous nitrite de sodium

De même, la perfusion intraluminale pendant 60 minutes d'une solution de Tyrode isotonique modifiée, dans laquelle du nitrite de sodium a été introduit à la place de quantités équimoléculaires de NaCl, inverse ce profil basal d'absorption au profit d'une sécrétion nette d'eau aux deux concentrations utilisées. Cet effet se maintient pendant 1 heure après la fin de la perfusion (Figure 2).



Figure 2 : Effets d'une perfusion intraluminale de 60 minutes par du nitrite de sodium (NaNO_2) aux doses de 4 et 8 mg/kg sur les mouvements d'eau coliques (Valeurs moyennes \pm ESM ; $n=8$).

C.1.2 – Etude de la sensibilité gastrique à la distension

C.1.2.1 Mesure des variations de pression artérielle

Dans les conditions basales (c'est à dire après l'administration de 1 ml d'eau distillée), la chute de pression artérielle moyenne a évolué linéairement de $7,8 \pm 2$ à $31,6 \pm 2,7$ mmHg pour des pressions de distension allant de 10 à 40 mmHg.

Après l'administration intragastrique de KNO_3 (0,1 mmol/kg), les chutes de pression artérielle pour des pressions de distension allant de 10 à 30 mmHg n'étaient pas différentes des valeurs basales, mais étaient significativement ($p < 0,05$) réduites pour les pressions de distension de 35 et 40 mmHg. Mais ni le NaNO_3 , ni le NaCl , ni le KCl n'ont eu d'effet sur la chute de pression artérielle.

L'administration d'hémoglobine (150 mg/kg), le piègeur de NO, lors de l'injection de KNO_3 a réversé l'effet du KNO_3 pour les plus fortes pressions de distension. L'administration de SNP (5 mg/kg), le donneur de NO, a reproduit l'effet obtenu en présence de KNO_3 (réduction de la chute de pression artérielle lors de l'application de pressions allant de 30 à 40 mmHg). Aucun des agents pharmacologiques utilisés n'a eu d'effet propre sur ce paramètre (Figure 3).

C.1.2.2 Mesure du volume gastrique

Chez des animaux témoins, le volume gastrique est passé de $0,7 \pm 0,3$ ml à $5,5 \pm 0,4$ ml pour des pressions allant de 10 à 40 mmHg. L'administration de KNO_3 a augmenté les volumes gastriques mais seules les pressions de 10 et 15 mmHg ont entraîné des différences significatives. L'effet du KNO_3 a été réversé par une administration préalable d'hémoglobine. Ni le NaNO_3 , le NaCl , le KCl ou le SNP n'ont eu d'effet propre sur les volumes gastriques (Figure 4).

Fall in blood pressure (mmHg)

Figure 3 : Effet d'une administration intragastrique de KNO₃ sur la chute de pression artérielle induite par une série de disensions gastriques chez le rat anesthésié.

Gastric volume (ml)

*

*

Gastric distending pressure (mmHg)

□

Figure 4 : Effets d'une administration intragastrique de sels de nitrate et nitrite sur le volume gastrique lors d'une distension gastrique

C.2 – Etude subchronique

C.2.1 – Effet de l'ingestion de nitrates et de nitrites pendant 14 jours chez le sujet sain

C.2.1.1 – Etude fonctionnelle: contractilité du muscle lisse *in vitro*

Une modification éventuelle de la réactivité du muscle lisse intestinal à une stimulation pharmacologique par des médiateurs des systèmes nerveux qui assurent physiologiquement le contrôle de la motricité digestive est un bon indicateur de perturbations fonctionnelles. Notre choix s'est porté sur les systèmes cholinergique (dont le carbachol est un agoniste), tachykinergique (neurokinine A) et sérotonergique (sérotonine), tous trois stimulateurs de la contractilité intestinale.

C.2.1.1.1 Protocole expérimental

Les animaux ont été traités par gavage intragastrique pendant 14 jours avec des nitrates ou des nitrites (sodium ou potassium), ou de l'eau (1 ml; groupe témoin) (Tableau A).

Tableau A: Traitements effectués chez les différents groupes expérimentaux; un groupe témoin (non présenté) a reçu de l'eau.

| Principe actif | | n | DL ₅₀ (orale, rat) | Dose administrée |
|----------------------|----------------------|---|-------------------------------|------------------|
| Nitrate de Sodium | (NaNO ₃) | 8 | 8 g/kg | 0,5 g/kg/j |
| Nitrate de Potassium | (KNO ₃) | 8 | 4 g/kg | 0,25 g/kg/j |
| Nitrite de Sodium | (NaNO ₂) | 8 | 180 mg/kg | 8 mg/kg/j |
| Nitrite de Potassium | (KNO ₂) | 8 | 108 mg/kg | 5 mg/kg/j |

C.2.1.1.2 Résultats

La contraction maximale induite par le carbachol est significativement plus importante sur les lambeaux musculaires provenant de rats ayant ingéré les nitrates ou les nitrites que chez les rats témoins qui ont reçu de l'eau (Tableaux B et C).

Tableau B: Paramètres des courbes concentration-réponse du carbachol, de la sérotonine et de la neurokinine A en conditions basales (Témoins) et chez des animaux traités par les sels de nitrate (NaNO_3 , KNO_3). Valeurs moyennes ($n=8$) EC_{50} : Concentration efficace 50% (intervalle de confiance 95%; μM); E_{max} : Effet maximal (% de la contraction induite par du KCl à 60mM).

| | | Carbachol | Sérotonine | Neurokinine A |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|
| Témoin | EC50 (μM) | 0,21 (0,16-0,26) | 0,19 (0,13-0,29) | 0,02 (0,01-0,04) |
| | E_{max} (%) | 123,49 \pm 2,49 | 110,28 \pm 2,88 | 142,47 \pm 3,73 |
| NaNO₃ 500 mg/kg/j | EC50 (μM) | 0,46 (0,11-1,94) | 0,48 (0,17-1,34) | 0,03 (0,01-0,07) |
| | E_{max} (%) | 153,85 \pm 7,39* | 102,40 \pm 6,34 | 155,00 \pm 4,02 |
| KNO₃ 250 mg/kg/j | EC50 (μM) | 0,22 (0,14-0,34) | 0,10 (0,07-0,14) | 0,02 (0,01-0,03) |
| | E_{max} (%) | 154,50 \pm 5,66* | 123,88 \pm 5,30 | 142,34 \pm 8,10 |

* significativement différent ($p<0,05$) du lot témoin

Tableau C: Paramètres des courbes concentration-réponse du carbachol, de la sérotonine et de la neurokinine A chez des animaux traités par les nitrites (NaNO_2 , KNO_2). (cf. légende Tab.B)

| | | Carbachol | Sérotonine | Neurokinine A |
|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------|
| NaNO₂ 8 mg/kg/j | EC50 (μM) | 0,19 (0,15-0,24) | 0,20 (0,15-0,27) | 0,05 (0,03-0,08) |
| | E_{max} (%) | 157,45 \pm 3,57* | 116,09 \pm 4,21 | 153,05 \pm 7,16 |
| KNO₂ 5 mg/kg/j | EC50 (μM) | 0,25 (0,18-0,36) | 0,27 (0,18-0,40) | 0,05 (0,03-0,07) |
| | E_{max} (%) | 158,93 \pm 4,40* | 108,30 \pm 4,82 | 131,99 \pm 11,41 |

* significativement différent ($p<0,05$) du lot témoin (cf. Tab. B)

C.2.1.2 – Etude anatomo-pathologique

C.2.1.2.1 – Gain de poids corporel

L'administration pendant 14 jours de sels (sodium ou potassium) de nitrate (Fig.1) ou de nitrite (Fig.2) n'a pas altéré la croissance pondérale des rats traités par rapport à des animaux non-traités (Valeurs moyennes \pm ESM ; n=6) (Figures 5 & 6).

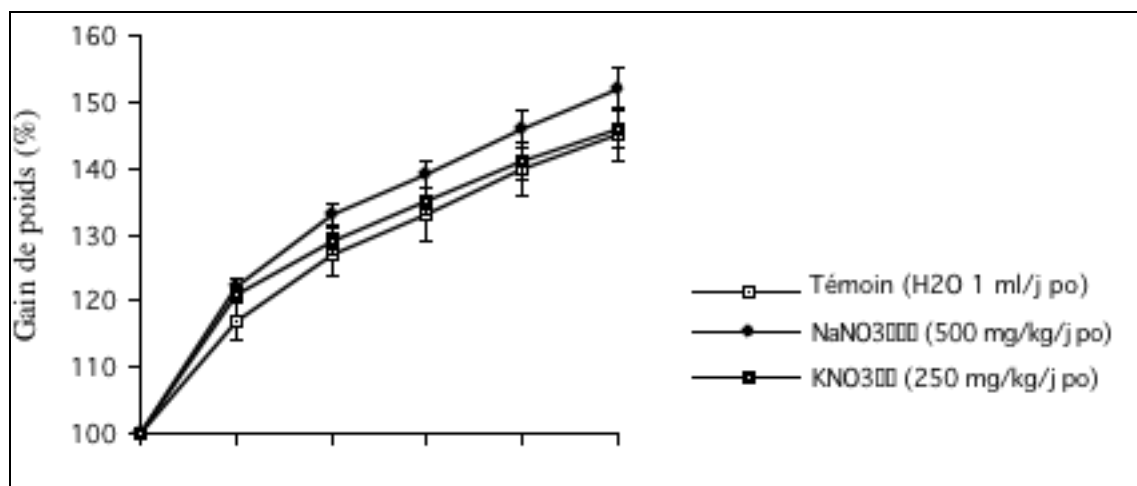


Figure 5 : Évolution du poids corporel chez des rats traités pendant 14 jours avec du nitrate de sodium (NaNO₃), du nitrate de potassium (KNO₃), ou de l'eau.

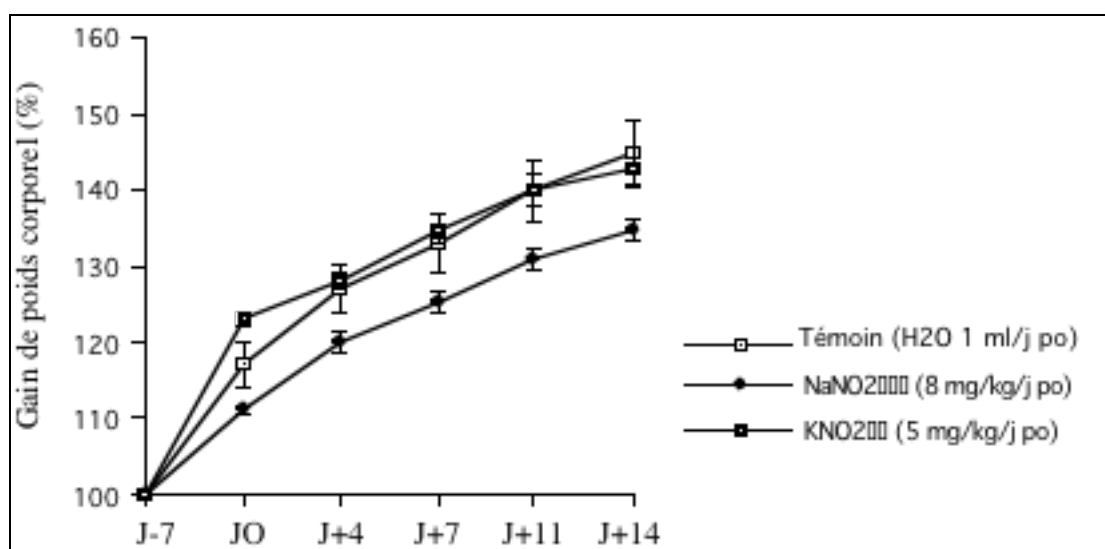


Figure 6 : Évolution du poids corporel chez des rats traités pendant 14 jours avec du nitrite de sodium (NaNO₂), du nitrite de potassium (KNO₂), ou de l'eau.

C.2.1.2.2 – Topographie structurale

L'observation en microscopie optique, après coloration de coupes transversales à l'hémalun-éosine, n'a révélé aucune modification notable des parois gastrique, intestinale et colique chez les animaux ayant ingéré des sels (sodium ou potassium) de nitrate ou de nitrite aux concentrations indiquées ci-dessus, par rapport aux animaux non-traités.

C.2.1.2.3 – Détermination du nombre de mastocytes

L'administration durant 14 jours de sels de nitrate ou de nitrite a eu des répercussions différentes sur la population mastocytaire gastro-intestinale en fonction du tissu étudié et du sel administré.

Au niveau gastrique:

L'administration pendant 14 jours de KNO_3 et de NaNO_2 a respectivement diminué et augmenté le nombre de mastocytes gastriques (Figure 7).

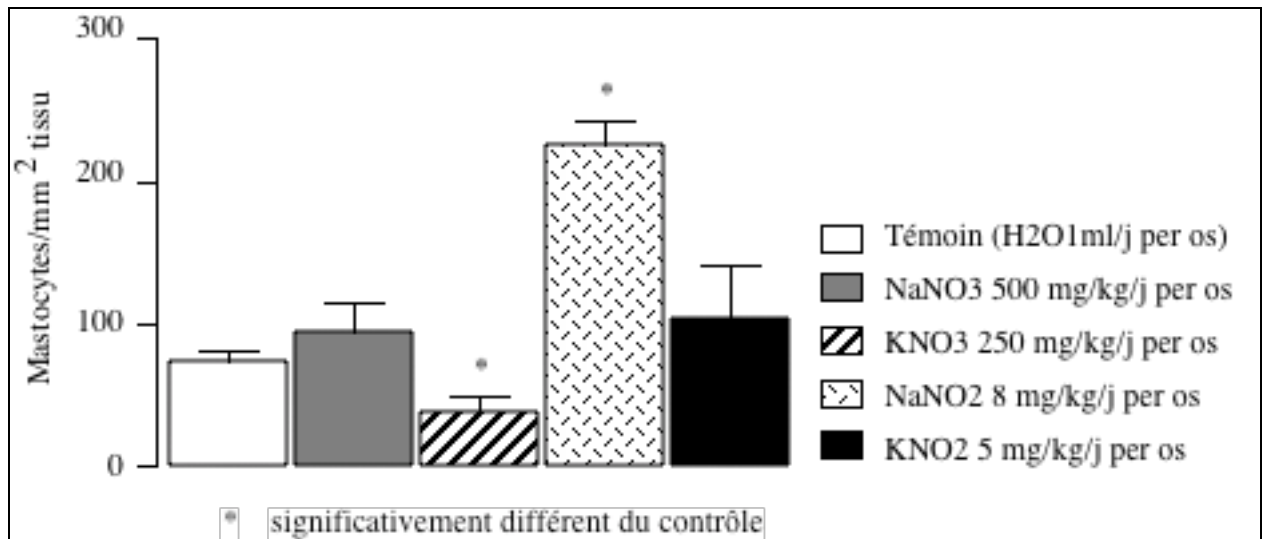


Figure 7 : Effets de l'ingestion durant 14 jours de sels (sodium ou potassium) de nitrate ou de nitrite sur le nombre de mastocytes au niveau de la paroi gastrique (Valeurs moyennes \pm ESM; n=6).

Au niveau intestinal:

L'administration des sels de nitrate et de nitrite durant 14 jours n'a pas modifié le nombre de mastocytes au niveau de la paroi du jéjunum (Figure 8).

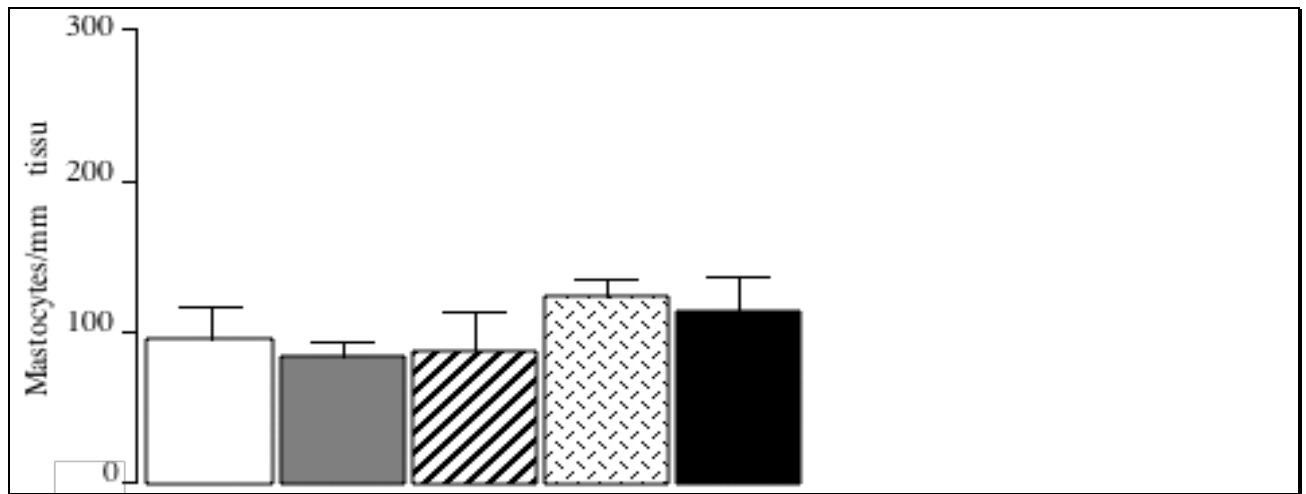


Figure 8 : Effets de l'ingestion pendant 14 jours de sels (sodium ou potassium) de nitrate ou de nitrite sur le nombre de mastocytes au niveau de la paroi jéjunale (Valeurs moyennes \pm ESM ; n=6).

Au niveau colique:

Aucun des sels ingérés pendant 14 jours n'a altéré le nombre de mastocytes détectables au niveau de la paroi colique (Figure 9).

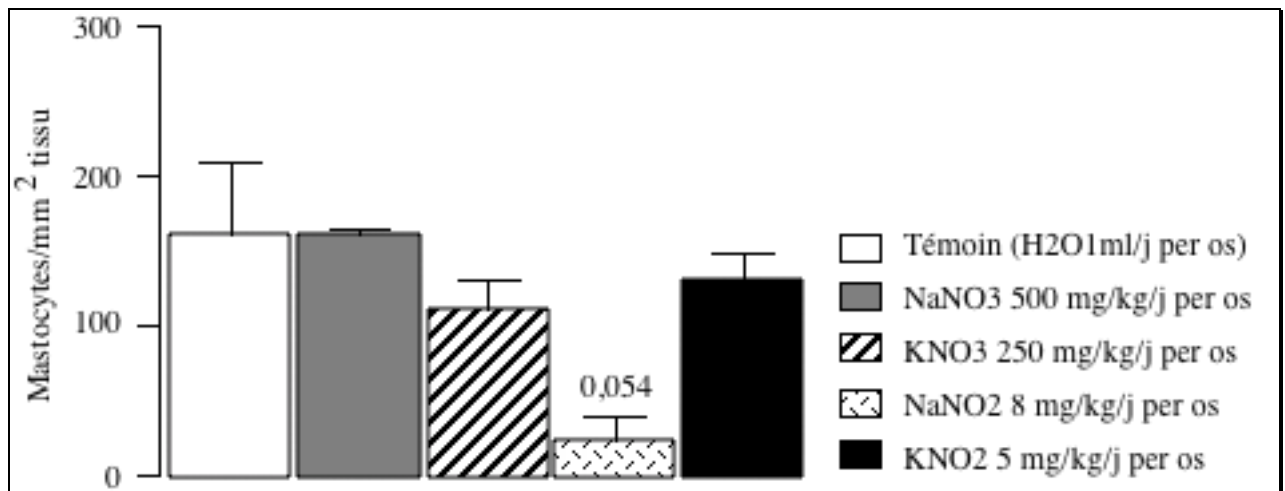


Figure 9 : Effets de l'ingestion pendant 14 jours de sels (sodium ou potassium) de nitrate ou de nitrite sur le nombre de mastocytes au niveau de la paroi colique (Valeurs moyennes \pm ESM ; n=6).

C.2.1.2.4 – Quantification des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles

Aucune modification du nombre de polynucléaires neutrophiles (PMN) ou éosinophiles (PME) présents dans la paroi jéjunale ou gastrique n'a été observée après administration par voie orale de nitrates ou de nitrites pendant 14 jours (Tableau D).

Tableau D : Effet d'une administration des sels de nitrate et nitrite pendant 14 jours sur le nombre de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles

| | Estomac | | Jéjunum | |
|--|----------------|---------|----------------|--------|
| | PMN | PME | PMN | PME |
| Témoin (H ₂ O 1 ml po) | 140 ± 20 | 2 ± 1 | 140 ± 17 | 4 ± 2 |
| NaNO₃ (500 mg/kg/j po) | 131 ± 24 | 10 ± 3 | 130 ± 12 | 3 ± 2 |
| KNO₃ (250 mg/kg/j po) | 95 ± 11 | 20 ± 7 | 123 ± 12 | 0 ± 0 |
| NaNO₂ (8 mg/kg/j po) | 171 ± 33 | 7 ± 3 | 140 ± 8 | 10 ± 9 |
| KNO₂ (5 mg/kg/j po) | 73 ± 23 | 18 ± 10 | 108 ± 19 | 5 ± 4 |

C.2.1.3 – Paramètres biochimiques tissulaires

C.2.1.3.1 – Mesure de l'activité myéloperoxydase

Les variations de l'activité myéloperoxydase, mesurée après 14 jours de traitement par les sels de nitrate et de nitrite sur des tissus gastriques, intestinaux et coliques ont été différentes selon le tissu considéré et le sel ingéré.

Au niveau gastrique :

L'activité MPO gastrique a été significativement stimulée après administration de NaNO_3 , de NaNO_2 et de KNO_2 . En revanche, elle s'est trouvée légèrement mais significativement réduite en présence de KNO_3 (Figure 10).



Figure 10 : Effets de l'administration pendant 14 jours de sels de nitrate et de nitrite sur l'activité MPO de la paroi gastrique (Valeurs moyennes \pm ESM; $n=6$).

Au niveau jéjunal :

L'ingestion de nitrates a significativement altéré l'activité MPO jéjunale (Figure 11).

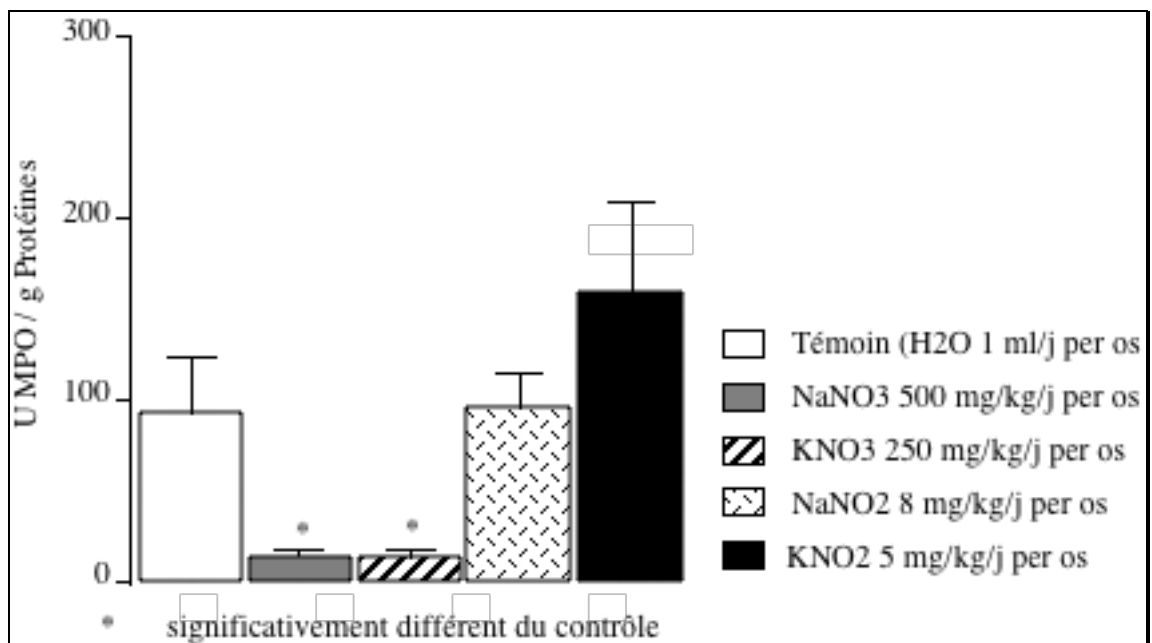


Figure 11 : Effets de l'administration pendant 14 jours de sels de nitrate et de nitrite sur l'activité MPO de la paroi intestinale (Valeurs moyennes \pm ESM ; n=6) □

Au niveau colique :

Sur les différents sels de nitrates et de nitrites administrés par voie orale pendant 14 jours seul le KNO3 a significativement réduit l'activité MPO colique (Figure 12).

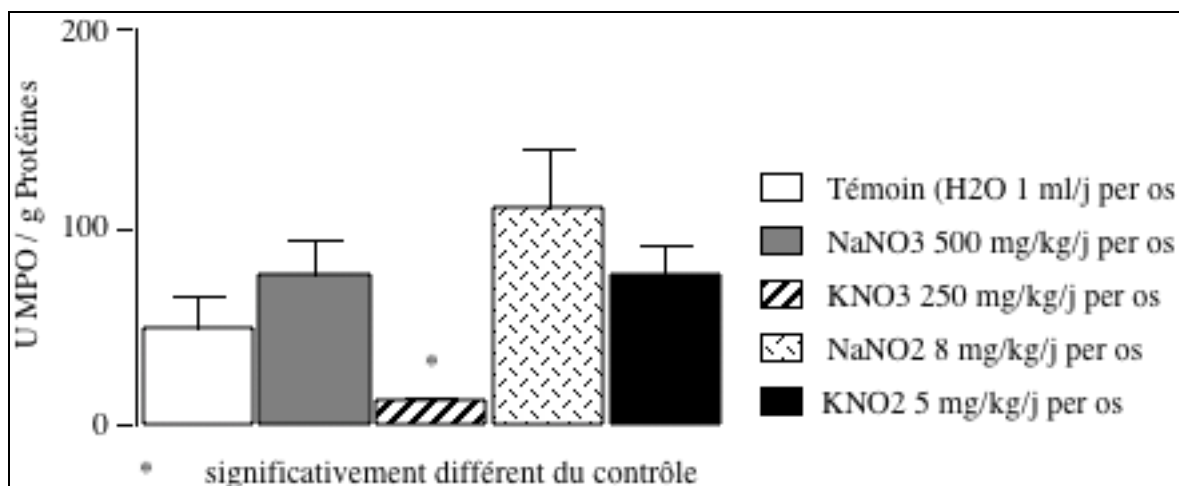


Figure 12 : Effets de l'administration durant 14 jours de sels de nitrate et de nitrite sur l'activité MPO dans la paroi colique (Valeurs moyennes \pm ESM ; n=6).

C.2.1.3.2 – Mesure de l'activité monoxyde d'azote synthétase (NOS)

Au niveau gastrique, seul le KNO_2 (8 mg/kg/j po) a réduit l'activité NOS constitutive (NO_{Sc}) alors que l'activité NOS inducible (NO_{Si}) a été significativement augmentée ($p < 0,05$) par l'administration des deux sels de nitrate (Figure 13).

Au niveau jéjunal, ni les nitrates, ni les nitrites n'ont eu d'effet sur l'activité NOS aussi bien constitutive qu'inducible (Figure 13).

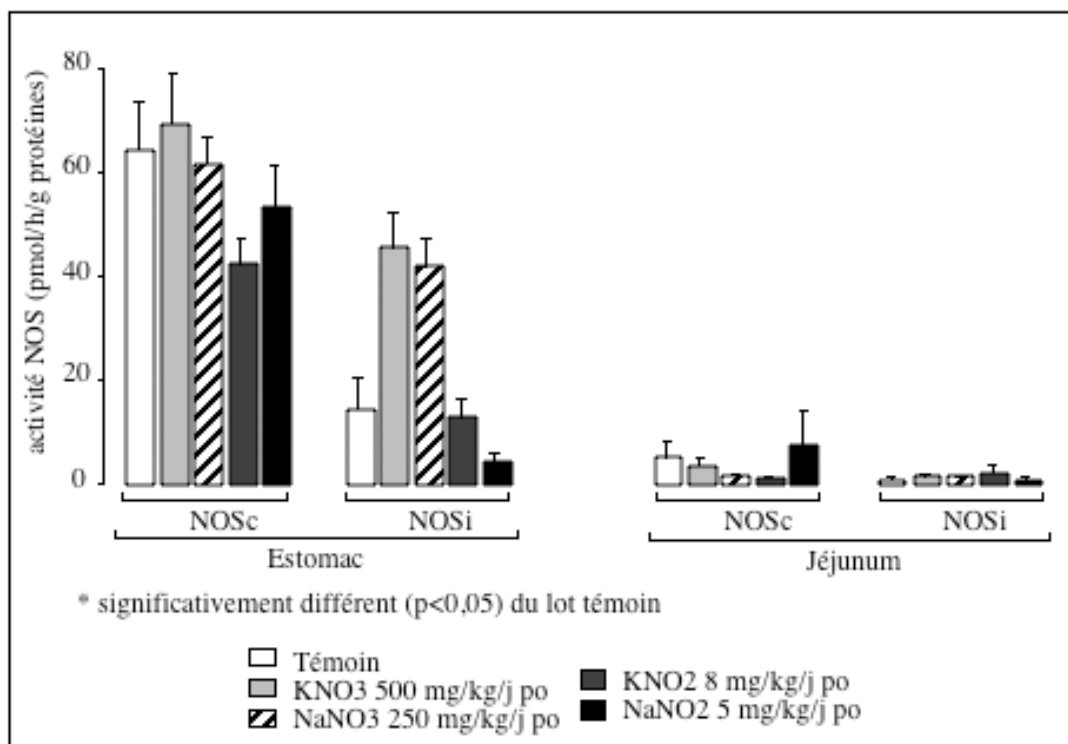


Figure 13 : Effet de l'absorption des sels de nitrate et nitrite pendant 14 jours sur les activités NO_{Sc} et NO_{Si} gastrique et jéjunale.

C.2.1.3.3 – Mesure de la concentration tissulaire en histamine

Au niveau gastrique seuls les sels de nitrate, NaNO_3 (500 mg/kg/j po) et KNO_3 (250 mg/kg/j po) ont significativement ($p < 0,05$) augmenté la concentration tissulaire en histamine.

Au niveau jéjunal, l'administration de KNO_3 et de NaNO_2 (8 mg/kg/j po) ont été responsables de l'augmentation significative ($p < 0,05$) de la concentration tissulaire en histamine (Figure 14).

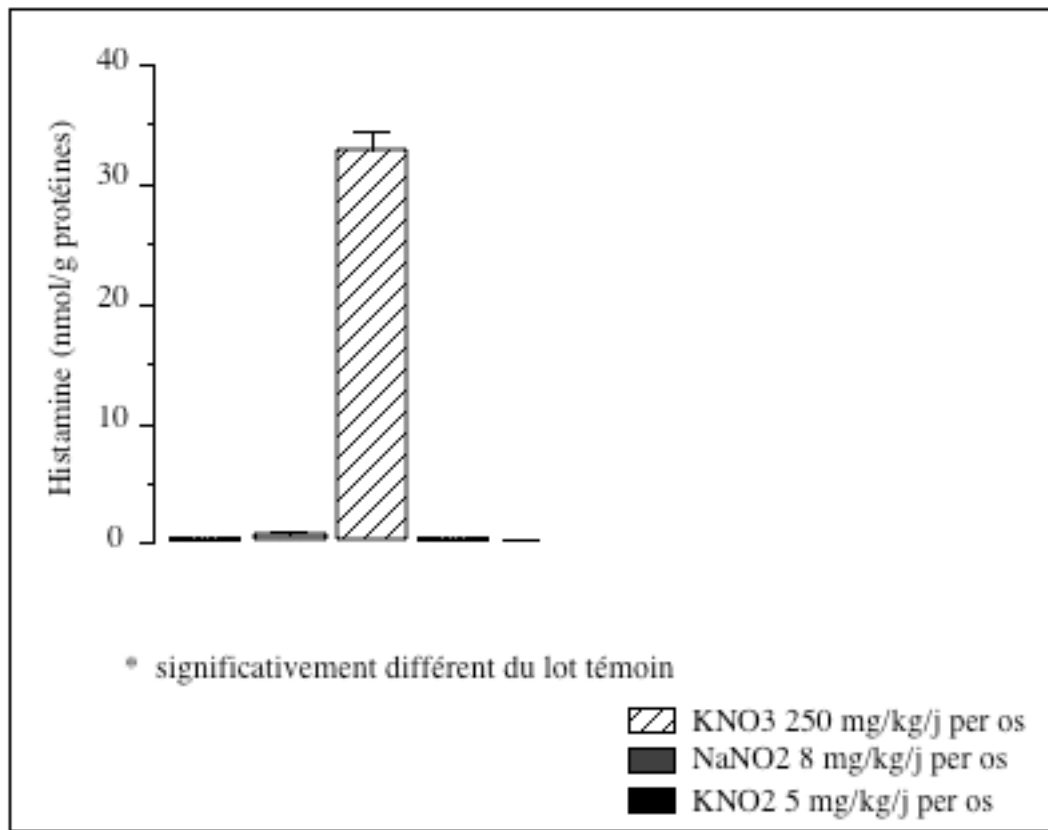


Figure 14 : Effet de l'administration des sels de nitrate et nitrite sur la concentration tissulaire en histamine aux niveaux gastrique et jéjunal.

C.2.2 – Effet de l'ingestion de nitrates et de nitrites lors d'une inflammation digestive

C.2.2.1 – Gastrite expérimentale induite par l'iodoacétamide

C.2.2.1.1 Effet du KNO_3 sur la gastrite

L'administration durant 7 jours d'iodoacétamide (25 mg/kg/j po) a significativement augmenté l'activité MPO gastrique. L'administration de KNO_3 , donneur de NO, lors de la gastrite expérimentale a bloqué de façon significative cette augmentation de l'activité MPO. La préadministration d'hémoglobine, un piègeur de NO avant la double administration de KNO_3 et d'iodoacétamide pendant 7 jours a reproduit l'effet de l'iodoacétamide seule. Aucun des agents utilisés (KNO_3 et hémoglobine) n'a eu d'effet propre sur l'activité MPO (Figure 15).

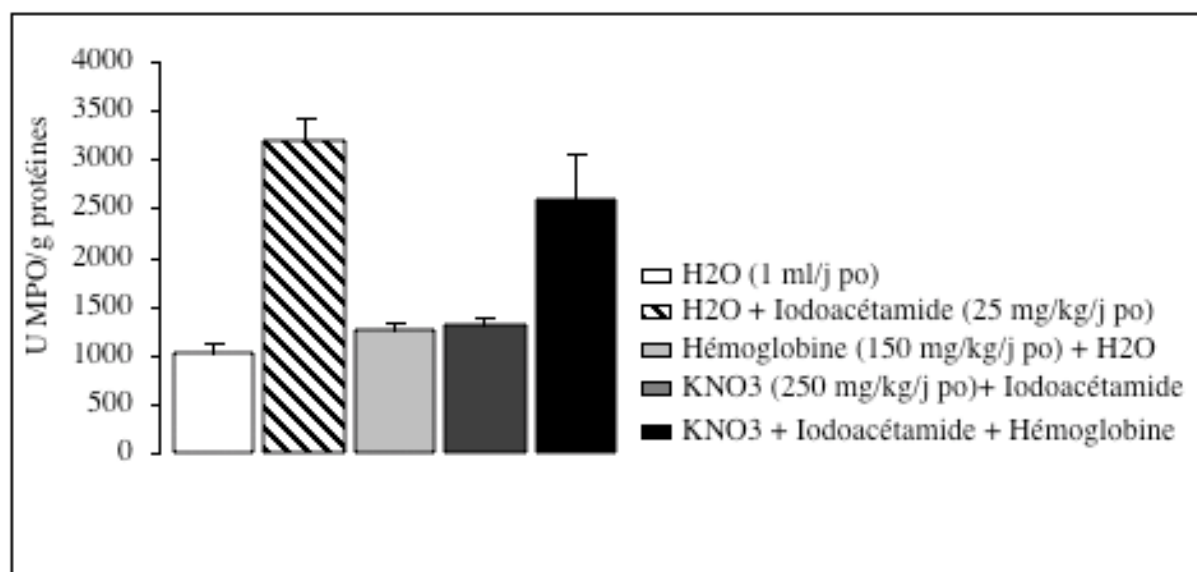


Figure 15 : Effets d'un donneur de NO, le KNO_3 et d'un piègeur de NO, l'hémoglobine, sur l'activité MPO lors d'une gastrite expérimentale induite par l'iodoacétamide.

C.2.2.1.2 Effet du nitroprussiate de sodium sur la gastrite

L'administration de nitroprussiate de sodium au cours du traitement par l'iodoacétamide a significativement réduit ($p < 0,05$) l'augmentation de l'activité MPO induite par l'iodoacétamide seule. En outre, le SNP n'a eu aucun effet propre sur l'activité MPO basale (Figure 16).

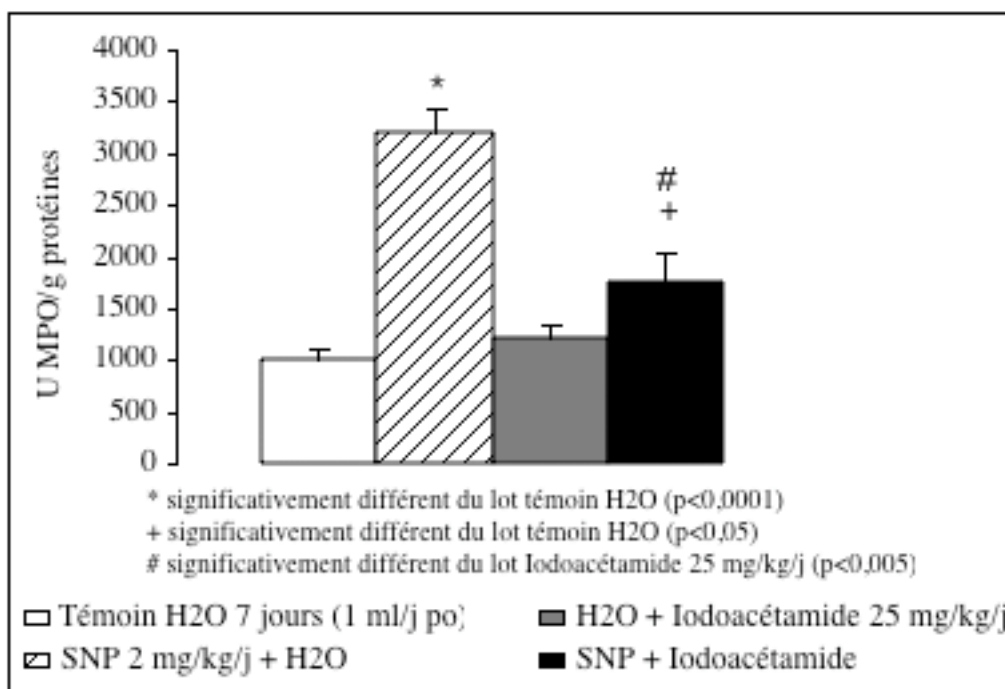


Figure 16 : Effet d'un donneur de NO, le SNP, sur l'activité MPO lors d'une gastrite expérimentale induite par l'iodoacétamide.

C.2.2.2 – Colite expérimentale induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique

C.2.2.2.1 – Effet du nitroprussiate de sodium sur la chute de poids corporel

L'administration de nitroprussiate de sodium (SNP; 2 mg/kg/j; 4 jours) a bloqué ($p < 0,05$) la chute de poids corporel provoquée par l'inflammation colique au TNBS (80 mg/kg). Le SNP seul n'a pas eu d'effet sur le gain de poids corporel chez des animaux témoins sains (Figure 17).

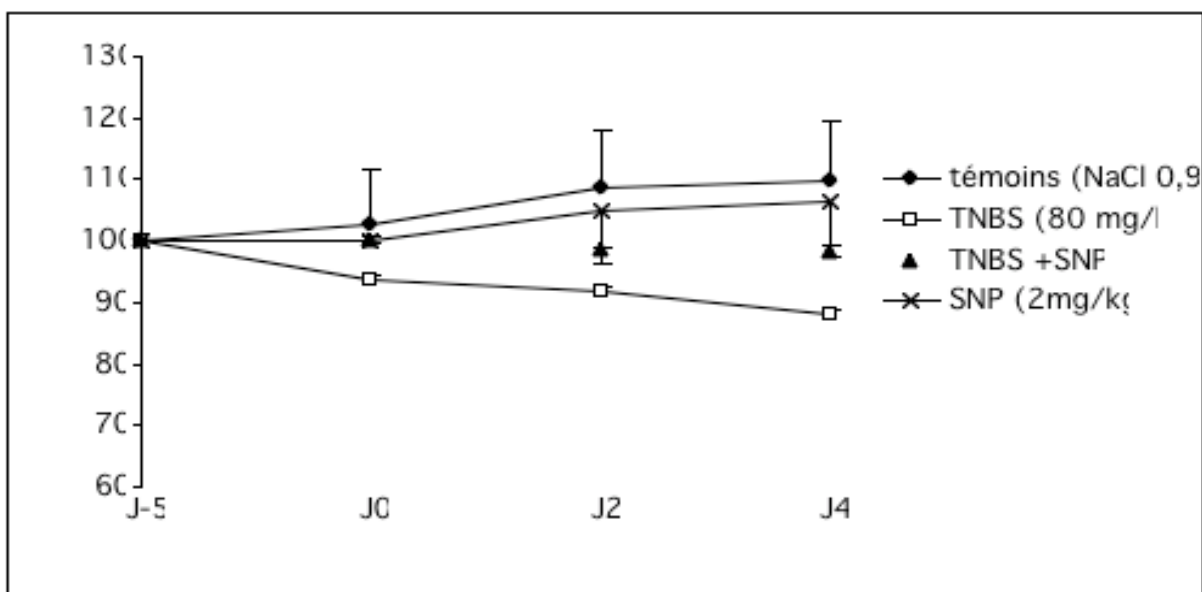


Figure 17 : Effets d'un traitement par un donneur de NO, le SNP lors d'une colite expérimentale induite par le TNBS.

C.2.2.2.2 – Effet sur les scores lésionnels macroscopiques

Une amélioration significative du score lésionnel a pu être observée ($6,64 \pm 0,81$ vs $2,08 \pm 1,08$; $p < 0,05$) grâce à l'administration de nitroprussiate de sodium (SNP; 2 mg/kg/j; 4 jours) après l'induction d'une colite expérimentale par le TNBS (80mg/kg). L'administration d'une solution de SNP seul (2 mg/kg/j; 4 jours) n'a pas altéré le score lésionnel macroscopique, qui reste nul, chez des animaux sains (Figure 18).

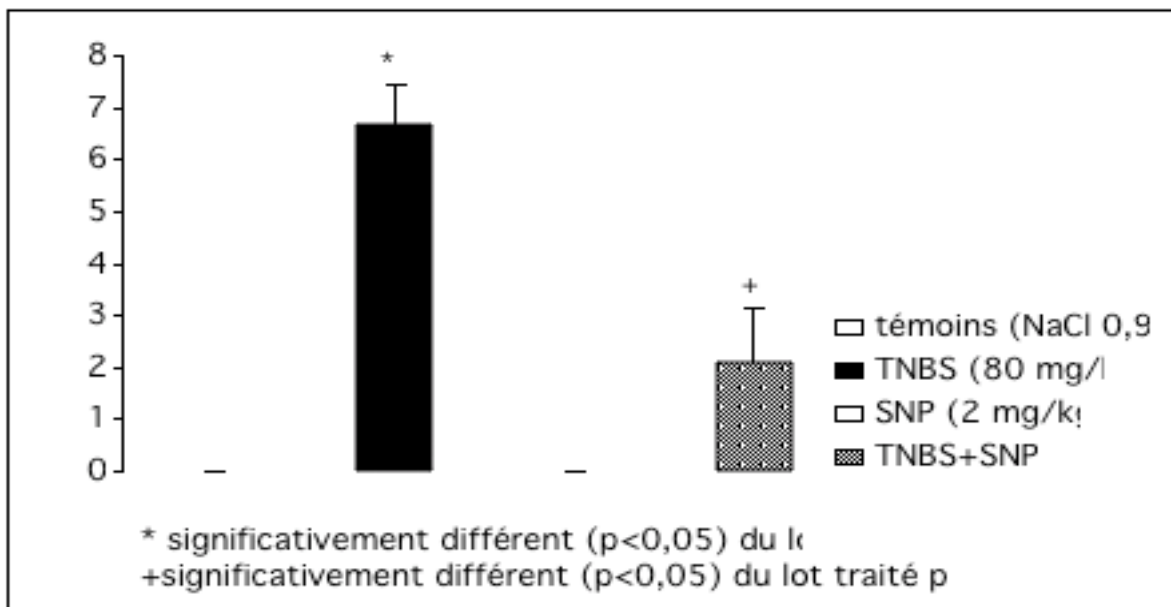


Figure 18 : Effet d'un donneur de NO, le SNP sur les scores lésionnels macroscopiques (SLM) lors d'une colite expérimentale induite par le TNBS.

C.2.2.2.3 - Sur l'infiltration neutrophilaire

Après induction d'une colite expérimentale par le TNBS (80mg/kg), l'administration intra-colique de nitroprussiate de sodium (SNP; 2mg/kg/j; 4 jours) a inhibé l'augmentation de l'activité MPO induite par le TNBS (2715 ± 768 U MPO/g de protéine vs 6256 ± 1905 chez les rats traités au TNBS; $p < 0,05$). L'administration de SNP seul n'a eu aucun effet propre significatif sur l'activité MPO (304 ± 152 U MPO/g de protéine vs $101,97 \pm 85,83$ chez les rats témoins) (Figure 19).

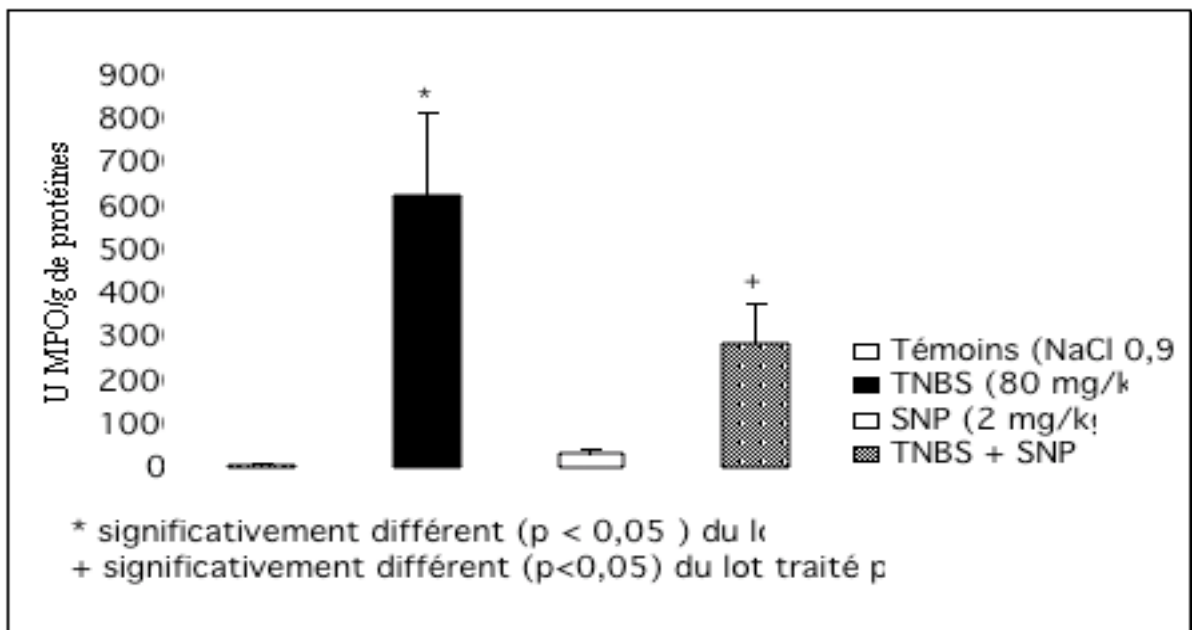


Figure 19 : Effet d'un donneur de NO, le nitroprussiate de sodium (SNP), sur l'activité myéloperoxydase lors d'une colite induite par le TNBS.

C.2.2.2.4 - Sur le nombre de mastocytes muqueux

On remarque une amélioration de l'inflammation induite par le TNBS à 80mg/kg après l'administration de SNP administré à la dose de 2 mg/kg/j ($193,5 \pm 65,21$ vs $96,67 \pm 15,88$ mastocytes muqueux/mm² tissu). Le SNP n'a aucun effet propre sur le nombre de mastocytes muqueux (Figure 20).

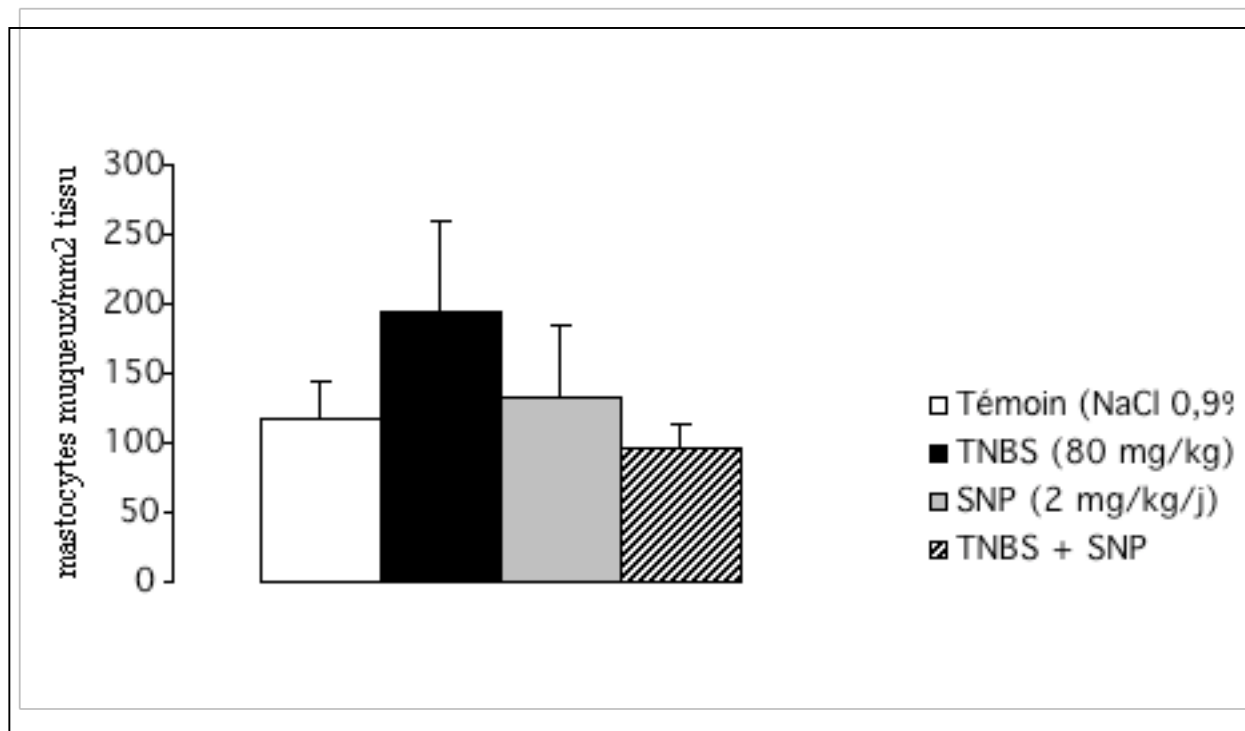


Figure 20 : Effet d'un donneur de NO, le SNP, sur le nombre de mastocytes muqueux lors d'une colite induite par le TNBS.

D - CONCLUSIONS

La première phase de notre projet avait permis d'identifier des altérations anatomo-pathologiques et fonctionnelles de la paroi du tractus gastro-intestinal induites par l'apport de nitrates ou de nitrites à faibles doses, inférieures ou égales à la DSE (dose sans effet) chez le rat. Toutefois, la signification biologique de ces modifications et leur pertinence dans la survenue éventuelle de processus pathologiques plus conséquents, restent à préciser.

En effet, si nos premiers résultats indiquent une altération micro-inflammatoire de la muqueuse gastrique (élévation de la MPO; augmentation du nombre de mastocytes), notamment sous l'effet des sels (sodium et potassium) de nitrite, il apparaît que celle-ci ne s'accompagne pas d'une perturbation de la croissance pondérale des animaux, ni de la structure histologique (microscopie optique) du tractus gastro-intestinal.

Sur le plan fonctionnel, les études de contractilité des lambeaux isolés de jéjunum, ont mis en évidence une augmentation significative de la réactivité du muscle lisse à une stimulation par un agoniste cholinergique, le carbachol, après 14 jours d'ingestion de nitrates ou de nitrites. Cette hyperréactivité semble spécifique du système cholinergique car elle n'est pas retrouvée avec deux autres neuromédiateurs, physiologiquement impliqués dans la régulation de la contractilité intestinale chez le rat: la sérotonine et la neurokinine A. On peut en déduire que l'ingestion chronique de nitrates ou de nitrites pourrait entraîner des troubles de la motricité intestinale en altérant le contrôle cholinergique de celle-ci.

Toujours sur le plan fonctionnel, la perfusion d'une solution isotonique de Tyrode contenant soit du NaNO_3 , soit du NaNO_2 , dans une anse colique proximale canulée, a inversé le profil physiologique d'absorption nette d'eau au profit d'une sécrétion d'eau. Ce résultat obtenu dans des conditions d'administration aiguë, n'a qu'une valeur indicative, et doit être confirmé chez des animaux ingérant les nitrates ou les nitrites de façon chronique. tendent à suggérerrceraient une action à plutôt

Toujours sur le plan fonctionnel, la perfusion d'une solution isotonique de Tyrode contenant soit du NaNO_3 , soit du NaNO_2 , dans une anse colique proximale canulée, a inversé le profil physiologique d'absorption nette d'eau au profit d'une sécrétion d'eau. Ce résultat obtenu dans des conditions d'administration aiguë, n'a qu'une valeur indicative, et doit être confirmé chez des animaux ingérant les nitrates ou les nitrites de façon chronique. tendent à suggérerrceraient une action à plutôt

Enfin, sur le plan de la biochimie tissulaire, l'histamine libérée par les mastocytes, ainsi que l'expression de la NOSi, induite dans les processus de type inflammatoire sont fortement augmentés au niveau gastrique par l'ingestion de nitrate de potassium ou de sodium, alors que ces paramètres ne sont pas modifiés au niveau intestinal.

Ces résultats mettaient donc en évidence: (i) des altérations de type "micro-inflammatoire" de la muqueuse gastrique (MPO, mastocytes, NOSi), essentiellement en réponse à l'ingestion de nitrites; (ii) des altérations des mécanismes de régulation fonctionnelle de la contractilité du muscle lisse jéjunal, et éventuellement, des échanges hydriques au niveau du côlon proximal, en réponse à la fois aux nitrates et aux nitrites. Ils ne permettaient cependant pas de conclure à une nocivité avérée des dérivés nitrés, ingérés à des doses susceptibles d'être présentes dans l'alimentation conventionnelle, particulièrement chez le sujet sain.

Partant de ce constat, il nous a semblé utile d'élargir le champ de notre étude, d'une part à la sensibilité viscérale chez le sujet sain, et d'autre part à des états physio-pathologiques gastro-intestinaux. Ainsi, nous avons voulu vérifier si pour un même taux d'ingestion de nitrates ou de nitrites, les répercussions seraient plus marquées chez des sujets présentant une pathologie gastro-intestinale. C'est pourquoi nous avons utilisé deux modèles expérimentaux d'inflammation digestive, un modèle de gastrite induite par l'iodoacétamide et un modèle de colite induite par le TNBS, tous deux représentatifs de pathologies digestives fréquentes chez l'homme.

Concernant la viscérosensibilité chez le sujet sain, nous avons montré sur un modèle de réponse cardio-vasculaire (réflexe "pseudo-affectif") à la distension de l'estomac chez le rat, que l'ingestion de nitrate de potassium réduisait significativement la sensibilité gastrique à la distension, en favorisant la complaisance de la paroi gastrique par un mécanisme mettant en jeu une action du monoxyde d'azote (NO), libéré par le KNO₃, probablement sur les afférences nerveuses sensibles de l'estomac.

En ce qui concerne les modèles d'inflammation digestive, dans les deux cas l'ingestion de nitrates (modèle de gastrite), ou l'administration intraluminale d'un "donneur" de NO, le nitroprussiate de sodium (modèle de colite), atténuait significativement la réponse inflammatoire des organes concernés, à des doses que l'on peut retrouver dans une alimentation normale. Cet effet "protecteur" vis-a-vis de la muqueuse gastro-intestinale fait bien intervenir le NO exogène, libéré soit par les nitrates, soit par le donneur, car il est supprimé par l'hémoglobine, un "piégeur" de NO. Ces résultats nous ont conduits à mettre sur pied un programme de recherches visant à évaluer d'une part les effets cytoprotecteurs gastro-intestinaux de probiotiques donneurs de NO et, ultérieurement d'autre part, la pertinence de l'utilisation de ceux-ci comme compléments de l'alimentation.