



HAL
open science

S-nitrosoglutathion et perméabilité intestinale: de la mise en place d'un modèle de chambre de Ussing à l'étude de l'impact de ce donneur de monoxyde d'azote sur la barrière intestinale

Romain Schmitt

► To cite this version:

Romain Schmitt. S-nitrosoglutathion et perméabilité intestinale: de la mise en place d'un modèle de chambre de Ussing à l'étude de l'impact de ce donneur de monoxyde d'azote sur la barrière intestinale. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT: 2019LORR0342. tel-02960438

HAL Id: tel-02960438

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02960438v1>

Submitted on 7 Oct 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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

BioSE



ECOLE DOCTORALE BioSE
BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT
ED 266

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé » par

Romain SCHMITT

S-nitrosoglutathion et perméabilité intestinale : de la mise en place d'un modèle de chambre de Ussing à l'étude de l'impact de ce donneur de monoxyde d'azote sur la barrière intestinale

Le 13 Novembre 2019

Membres du jury :

Rapporteurs :	Frédéric LAGARCE	PU PH, Inserm U1066 Mint CNRS 6021, Université d'Angers, Angers, France
	Yann PELLEQUER	MCU, HDR, EA 4267 PÉPITE, Université de Bourgogne-Franche-Comté, Besançon, France
Examineurs :	Francès YEN POTIN	DR (membre du comité), UR AFPA USC INRA 340, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
	Emilie ROGER	MCU, Inserm U1066 Mint CNRS 6021, Université d'Angers, Angers, France
	Igor CLAROT	PR, EA3452 CITHEFOR, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
	Anne SAPIN	MCU, HDR (directrice de thèse), EA3452 CITHEFOR, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
Membres invités :	Pierre LEROY	PU émérite, UMR INRA 1136, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
	Arnaud BEDUNEAU	MCU (membre du comité), EA 4267 PÉPITE, Université de Bourgogne-Franche-Comté, Besançon, France

EA 3452 CITHEFOR "Cibles thérapeutiques, formulation et expertise préclinique du médicament", 9 Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Remerciements

A Frédéric LAGARCE et Yann PELLEQUER, merci d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux, et pour vos précieuses remarques,

A Francès YEN-POTIN et Arnaud BEDUNEAU, merci d'avoir suivi mes travaux pendant ces trois années, en tant que membres du comité de suivi individuel, ce qui m'a permis d'avoir d'autres visions plus larges du sujet de thèse,

A Emilie ROGER, merci d'avoir accepté de faire partie du jury, en tant qu'examinatrice de ces travaux,

A Anne SAPIN, merci pour ces trois années (et même davantage si nous prenons en compte le stage de M2) à tes côtés, merci pour ta gentillesse, ce ne fut pas toujours simple mais le travail réalisé ensemble a été très intéressant et enrichissant, et j'espère que nous aurons l'occasion de collaborer à l'avenir,

A Ariane BOUDIER et Igor CLAROT, merci d'une part en tant que directrice et directeur adjoint du laboratoire, mais surtout pour vos précieux conseils et votre écoute durant ces trois années, un merci particulier à Igor pour ton soutien sur tous les aspects de chimie analytique qui n'étaient pourtant pas ma tasse de thé,

A Pierre LEROY, merci de m'avoir permis de faire partie de l'équipe il y a plus de trois ans de cela, alors que vous étiez encore directeur, et merci pour les différents points de vue que vous m'avez exposé tout au long de ces années,

A Isabelle FRIES, merci pour ton aide et ta participation à ces travaux, et en particulier ton aide indispensable face aux aléas impondérables du sacré western blot,

A Isabelle LARTAUD, merci pour ton esprit critique sur ces travaux, et en particulier ton apport en matière d'analyse statistique, merci également à l'animalerie campus Brabois santé (ACBS) pour m'avoir permis de réaliser les expérimentations animales au sein de leur structure,

A Philippe GIUMMELLY, merci pour vos conseils en système qualité du laboratoire, et pour les synthèses de GSNO sans lesquelles une partie de ce travail n'aurait pu être réalisée,

A Nathalie DEGOUSEE, merci pour ta joie et ta bonne humeur au quotidien, tu es le rayon de soleil qui arrive chaque matin au laboratoire, et ce fut un réel plaisir de te connaître au sein de l'équipe,

A tous les autres collègues et doctorants de l'EA, merci à tous qui avez participé de près ou de loin à ces travaux, et qui avez d'une façon ou d'une autre permis leur aboutissement,

Aux collègues de l'UMRS 1256 NGERE, dont Jean-Louis GUEANT, Franck HANSMANNEL et Jean-Marc ALBERTO, merci pour l'accueil au sein de votre laboratoire durant les périodes de déménagement de notre équipe,

A Djésia ARNONE et Pauline MOSCA, merci pour votre soutien, vos conseils, votre écoute, votre bonne humeur, votre amitié si précieuse qui je l'espère perdurera avec les années, vous êtes formidables : tout le bonheur, autant dans vos thèses respectives que dans vos vies personnelles,

Enfin, merci à ma famille – en particulier à mes parents – sans qui tout cela ne pourrait être possible, c'est grâce à vous si tout cela arrive et je vous souhaite le meilleur pour l'avenir !

Table des matières

Remerciements	I
Table des matières	III
Travaux scientifiques	V
Liste des tableaux, figures, abréviations	VII
Introduction générale : Etat de l'art	1
1. L'Anatomie de l'intestin	3
2. Le système nerveux intestinal	4
3. La muqueuse intestinale	5
3.1. Description	5
3.2. Les voies de passage de la muqueuse intestinale	6
3.2.1. La voie paracellulaire	6
3.2.2. La voie transcellulaire	7
3.2.3. La translocation bactérienne : une voie de passage vers la pathologie ?	8
4. Les acteurs de la barrière intestinale	9
4.1. Les jonctions cellulaires	9
4.2. Les jonctions serrées	9
4.2.1. Présentation, rôles et composition	9
4.2.2. Occludines	10
4.2.3. Claudines	11
4.2.4. Junctional Adhesion Molecules (JAM)	12
4.2.5. Zonula Occludens	13
4.3. Jonctions adhérentes	15
4.3.1. Cadhérines et caténines	15
4.3.2. Régulation des jonctions adhérentes	16
4.4. Desmosomes	17
4.4.1. Cadhérines desmosomales : desmoglénines et desmocollines	18
4.4.2. Relation entre protéines de la famille armadillo et desmoplakines	18
4.5. Mucus	19
4.5.1. Présentation	19
4.5.2. Cellules caliciformes, mucines et bactéries	19
4.6. Immunité innée	20
4.6.1. Présentation	20
4.6.2. Récepteurs TLR, NOD et microbiote intestinal	20
Revue : Involved factors in the maintenance of intestinal barrier homeostasis: a review	22
5. Monoxyde d'azote et barrière intestinale	59
5.1. S-nitrosoglutathion (GSNO)	59
5.2. Voies d'action du NO	59
5.2.1. Nitration	59
5.2.2. Nitrosation	60
5.2.3. Nitrosylation	60
5.3. Liaison S-NO et sensibilité aux facteurs extérieurs	62
5.4. Potentiel thérapeutique du GSNO	63
6. Modèles d'étude de la barrière intestinale	64
6.1. <i>In vivo</i> : intestin perfusé, boucle intestinale et études pharmacocinétiques	64
6.2. <i>Ex vivo</i> : sac intestinal retourné et chambre de Ussing	66
6.3. <i>In vitro</i> : Caco-2 et PAMPA	67
1^{er} Chapitre : Mise en place et validation du modèle ex vivo de chambre de Ussing, et de la méthode analytique de quantification des espèces ¹⁵N	71

1.	La chambre de Ussing : un dispositif adapté à l'étude de la perméabilité intestinale	73
1.1.	Présentation et calcul	73
1.2.	Le recours à des « marqueurs de perméabilité »	74
2.	La chambre de Ussing : un dispositif adapté à l'évaluation de l'intégrité de la barrière intestinale ?	77
2.1.	Présentation de la résistance transépithéliale : un marqueur de viabilité tissulaire « universel »	79
2.2.	Le suivi de molécules « marqueurs de l'intégrité »	80
2.3.	D'autres méthodes de suivi de l'intégrité de la barrière intestinale	82
2.4.	Le suivi de l'intégrité de la barrière intestinale et de l'effet d'une molécule sur l'intestin par le modèle de Ussing : un véritable défi	82
Article 1 : « How to guarantee results from ex vivo studies based on Ussing chamber system for studying intestinal barrier integrity and function » (Journal of NeuroGastroenterology and Motility)		83
3.	Mise en place de la méthode analytique de quantification du S-nitrosoglutathion et des espèces dérivées marquées à l'azote 15	103
3.1.	Marquage isotopique du S-nitrosoglutathion	105
3.2.	Détermination de la perméabilité du GS ¹⁵ NO dans un modèle de Ussing	106
Article 2 : “Comparison between two derivatization methods of nitrite ion labelled with 15N applied to liquid chromatography-tandem mass spectrometry” (Analytical Methods)		108
4.	Conclusion	116
2^e Chapitre : Prise en charge du S-nitrosoglutathion par la barrière intestinale		117
1.	Mécanismes de métabolisme du GSNO	119
1.1.	GSNO réductase	120
1.2.	Gamma-glutamyltransférase (GGT) et L-aminotransférases (L-AT)	120
1.3.	Protéine disulfure isomérase (PDI) et implication des thiols	122
Article 3 : “Influence of S-nitrosoglutathione metabolism on its intestinal permeability” (Expert opinion on drug metabolism and toxicology)		124
2.	Conclusion	149
3^e Chapitre : Effets du GSNO sur la barrière intestinale		151
1.	Impact du GSNO sur la barrière intestinale	153
Article 4 : “ Luminal S-nitrosoglutathione effects on intestinal barrier in an ex vivo model of Ussing chamber” (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics).		154
2.	Conclusion	173
Discussion, Conclusion Générale et Perspectives		177
Références		189
Annexes		205
1.	Liste des protocoles :	205

Travaux scientifiques

Publications

- (1) **Schmitt Romain**, Sapin Anne, “Involved factors in the maintenance of intestinal barrier homeostasis” (Revue, *Journal of Gastroenterology*)
- (2) **Schmitt Romain**, Ming Hui, Hansmannel Franck, Clarot Igor, Gaucher Caroline, Fries Isabelle, Lartaud Isabelle, Sapin-Minet Anne, “ How to guarantee results from *ex vivo* studies based on Ussing chamber system for studying intestinal barrier integrity and function” (*Neurogastroenterology and Motility*)
- (3) Yu Haiyan, **Schmitt Romain**, Sapin Anne, Chaimbault Patrick and Leroy Pierre, “Comparison between two derivatization methods of nitrite ion labeled with ¹⁵N applied to liquid chromatography-tandem mass spectrometry” (*Analytical Methods*)
- (4) Yu Haiyan, **Schmitt Romain** (même contribution), Leroy Pierre, Gaucher Caroline, Fries Isabelle, Sapin Anne, “ Influence of S-nitrosoglutathione metabolism on its intestinal permeability” (*Expert opinion on drug metabolism and toxicology*)
- (5) **Schmitt Romain**, Ming Hui, Hansmannel Franck, Gaucher Caroline, Leroy Pierre, Lartaud Isabelle, Sapin-Minet Anne, “ Luminal S-nitrosoglutathione effects on intestinal barrier in an *ex vivo* model of Ussing chamber” (*European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*).

Présentations orales

- (1) 4e Edition du congrès DocSciLor, (Nancy, 15 Juin 2017) : S-nitrosoglutathione and intestine barrier integrity on an *ex vivo* rat model of LPS-induced inflammation. **Schmitt Romain**, Ming Hui, Hansmannel Franck, Gaucher Caroline, Lartaud Isabelle, Leroy Pierre, Sapin Anne.
- (2) 6e Edition NutriOx (Strasbourg, 27-29 Septembre 2017) : S-nitrosoglutathione and intestine barrier integrity on an *ex vivo* rat inflammation model. **Schmitt Romain**, Ming Hui, Hansmannel Franck, Gaucher Caroline, Leroy Pierre, Lartaud Isabelle, Sapin Anne.

(3) Journée de Rentrée de l'école doctorale BioSE (Nancy, 13 Novembre 2017): Luminal S-nitrosoglutathione impacts intestinal barrier permeability in an *ex vivo* model of Ussing Chamber.

Posters scientifiques

(1) BioBarriers 2016 (Saarbrücken, Allemagne, 07-09 Mars 2016) : Formulations of nitric oxide donors adapted to oral delivery: perspectives for intestinal bowel disease relapses prevention. Ming Hui, Wu Wen, Hansmannel Franck, **Schmitt Romain**, Gaucher Caroline, Maincent Philippe, Hu Xian-Ming, Leroy Pierre, Sapin Anne.

(2) DocLor – Doctorial de Lorraine 2018 (La Bolle, Saint-Dié, 15-20 avril 2018) : La barrière intestinale dans tous ses états. **Schmitt Romain**.

Liste des tableaux, figures, abréviations

Tableaux

Tableau 1: Valeurs de perméabilité apparente (P_{app} , cm \times s) de la fluorescéine sodique (NaFlu) et du propranolol référencées dans la littérature, obtenues sur le modèle ex vivo de chambre de Ussing 77

Tableau 2: Valeurs de résistance électrique transépithéliale (TEER, ohm \times cm²) référencées dans la littérature, obtenues sur le modèle ex vivo de chambre de Ussing 80

Table 1: Values of apparent permeability (P_{app} , cm \times s) of sodium fluorescein (NaFlu) and propranolol referenced in the literature, obtained in the ex vivo model of Ussing chamber..... 88

Table 2: Values of transepithelial electrical resistance (TEER, ohm \times cm²) referenced in the literature, obtained in the ex vivo model of Ussing chamber..... 88

Figures

- Figure 1 : Structure de la paroi intestinale (Netter, 2019) 4*
- Figure 2 : Les principaux acteurs de la barrière intestinale et les voies de passage pouvant être empruntées par une macromolécule A (voie paracellulaire) ou une macromolécule B (voie transcellulaire) souhaitant franchir la barrière intestinale de la lumière intestinale vers le tissu conjonctif..... 6*
- Figure 3 : Mécanisme d'ouverture de l'espace intercellulaire suite à une stimulation de la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK), menant à la phosphorylation de la myosine, à la contraction des filaments d'actines puis à l'élargissement de l'espace intercellulaire, modifié de (Hayashi and Tomita, 2007)..... 10*
- Figure 4 : Organisation des jonctions intercellulaires appartenant à la famille des occludines (4 domaines), des claudines (4 domaines) et des junctional adhesion molecules (JAM, 1 domaine), rattachées aux filaments d'actine via les domaine PDZ des zonula occludens de type 1 (ZO 1), de type 2 (ZO 2) et de type 3 (ZO 3), modifié de (Ulluwishewa et al., 2011)..... 14*
- Figure 1: Beneficial effects of the endogenously produced S-nitrosoglutathione on the intestinal barrier 43*
- Figure 6 : Les voies d'action du monoxyde d'azote (NO) avec (A) la nitration et la production de 3-nitrotyrosine, (B) la S-nitrosation et la formation de S-nitrosothiols (RSNO) via la fixation d'un NO sur une cystéine ou un thiol, et (C) la nytrosylation via la fixation du NO sur un groupement métallique, ici le fer de l'hème. 62*
- Figure 7 : Les différents facteurs environnants pouvant cliver la liaison S-NO de S-nitrosothiols (RSNO) ou de protéines portant une liaison S-NO (PSNO) : température, lumière, ions métalliques, oxygène et pH. Cela peut donner soit des ions peroxydites $ONOO^-$ après réaction avec l'anion superoxide O_2^- , soit des ions nitrite NO_2^- et ions nitrate NO_3^- après oxydations successives. 63*
- Figure 8 : Représentation du modèle in vivo d'intestin perfusé : le segment intestinal d'intérêt est ligaturé de part et d'autre puis canulé avec une entrée et une sortie*

sanguine, une perfusion de principe actif et un site de prélèvement à la sortie de l'intestin, modifié de (Faure et al., 2014)..... 66

Figure 9 : Représentation du modèle ex vivo de chambre de Ussing, composé de deux compartiments, donneur et accepteur, séparés par un insert sur lequel est fixé un segment intestinal : il est de ce fait orienté, avec la lumière intestinale d'un côté et le tissu conjonctif de l'autre. Les deux compartiments sont remplis d'une solution osmotique à 37°C. 67

Figure 10 : Représentation du modèle in vitro de cellules Caco-2, avec un Transwell® au fond duquel se forme le tapis cellulaire, et distinguant le compartiment supérieur = apical et le compartiment inférieur = basolatéral, ces deux compartiments étant immergés dans un tampon physiologique. 68

Figure 11 : Stratégie d'étude employée lors de ces travaux de thèse, avec une déclinaison en trois axes principaux..... 69

Figure 12 : La classification pharmaceutique selon Amidon et al, 1995, dénommée Biopharmaceutical Classification System (BCS), et permettant de définir un principe actif selon l'une des quatre classes en fonction de sa solubilité et de sa perméabilité. 73

Figure 13 : Principe de la méthode de dosage des ions nitrite par spectrofluorimétrie : réaction entre un réactif non-fluorescent, le 2,3-diaminonaphtalène (DAN) et l'ion nitrite (NO_2^-) en milieu acide, produisant le dérivé fluorescent 2,3-naphtotriazole (NAT). Les S-nitrosothiols (RSNO) après réaction avec les ions Hg^{2+} permettant de rompre la liaison S-NO, et les ions nitrate (NO_3^-) après réduction enzymatique, sont dosés par la même méthode..... 104

Figure 14 : Mécanisme de prise en charge du GSNO par la barrière intestinale. Le GSNO arrivant à la barrière intestinale est pris en charge par la GGT qui va déglutaminer le GSNO, libérant de la S-nitrosocystéinyglycine (CysGlyNO), permettant de relarguer du NO qui pourra diffuser au travers de la barrière intestinale. 121

Figure 15 : Evolution du flux de fluorescéine sodique (NaFlu, 2.7 mM) en présence ou non de SBC 20 mM, de Gly-Gly 20mM, de NEM 10 mM ou du mélange NEM+SBC,

<i>pendant 2 h en chambre de Ussing. p<0.05 vs Control; ANOVA à deux facteurs (temps et groupes).</i>	<i>123</i>
<i>Figure 16 : Evolution du flux de fluorescéine sodique (NaFlu, 2.7 mM) en présence ou non d'ascorbate 5.10⁻⁶ M et de GSNO (0.1 ou 100 µM), pendant 2 h en chambre de Ussing. p<0.05 vs Control; t test.....</i>	<i>175</i>
<i>Figure 17: Ussing chamber (Harvard Apparatus, Physiologic Instruments) (a); Scheme of the Ussing chamber system (b).....</i>	<i>207</i>
<i>Figure 18: Heating water bath (a) and circulating water bath (b).....</i>	<i>212</i>
<i>Figure 19: Setting of the Ussing chamber and inserts (a), placing inserts in the chambers (b), gas connections (c, d) and electrodes (e) with cables for TEER measurement (f).....</i>	<i>213</i>
<i>Figure 20: Measurement of TEER for blank values, from connecting blue cables for TEER measurements to the chambers (a), cables should be connected in a specific order (b) to multimeter (c).....</i>	<i>214</i>
<i>Figure 21: Rat dissection (a), Small intestine, right out of stomach-duodenum, middle section, jejunum, connects to cecum-ileum (b) and Large intestine, leaves cecum, connects to rectum and anus-colon (c).....</i>	<i>216</i>
<i>Figure 22: The intestine has to be mounted on pins of the serosal half of the Ussing chamber insert.....</i>	<i>217</i>
<i>Figure 23. Chromatograms of NAT resulting from derivatization of 12.5 µM GSNO in the (A) absence and (B) presence of rat intestine by HPLC-spectrofluorimetry at λ_{exc} = 375 nm and λ_{em} = 415 nm.....</i>	<i>256</i>

Abréviations

Abréviations	Noms entiers
5-ASA	Acide 5-aminosalicylique
A20	Protéine en doigt de zinc cytoplasmique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BCS	Biopharmaceutical Classification System
C10	Décanoate de sodium = sodium caprate
Caco-2	Lignée cellulaire d'adénocarcinome colique humain
Cellules M	Microfold cells
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires
DAF2-DA	Diaminofluorescéine-diacétate
DAN	2,3-diaminonaphtalène
DSC	Desmocolline (<i>dsc</i> = gène)
DSG	Desmogléine (<i>dsg</i> = gène)
DSS	Dextran sulfate sodium
EDTA	Ethylènediaminetétraacétique
eNOS	Epithelial NO synthase
ERNs	Espèces réactives de l'azote
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
ESI	Electrospray ionization
GCs	Guanylate cyclase soluble
GGT	Gamma-glutamyltransférase
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GS ¹⁵ NO	S-nitrosoglutathion marqué à l'azote 15
GSH	Glutathion réduit
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSSG	Glutathion disulfure
GTP	Guanosine triphosphate
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CLHP-FL	Chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrofluorimétrie

CLHP-SM	Chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse
IL-1 β	Interleukine-1 beta
IL-6	Interleukine-6
iNOS	Inducible NO synthase
JAM	Junctional Adhesion Molecules
L-AT	L-aminoacid transporter = L-aminotransférase
LC-ITMS/MS	Liquid chromatography-tandem ion trap mass spectrometry
L-NAME	ω -nitro-L-arginine méthyl ester
LOQ	Limit of Quantification
LPS	Lipopolysaccharide
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MLCK	Myosin-Light Chain Kinases
MMP	Matrix metalloprotease
NaFlu	Fluorescéine sodique
NaNO ₂	Nitrite de sodium
NAT	2,3-naphtotriazole
NED	<i>N</i> -(1-naphthyl)-éthylènediamine
NEM	<i>N</i> -éthylmaléimide
NF κ B	Nuclear Factor kappa B
nNOS	Neuronal NO synthase
NO	Monoxyde d'azote
NOD2 = CARD15	Nucleotide binding oligomerization domain 2 = caspase recruitment domain family number 15
NOS	NO synthase
ONOO-	Ions peroxydinitrite
P38/MAPK	Proteins p38 mitogen-activated protein kinase
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay
Papp	Perméabilité apparente
PDI	Protéine disulfure isomérase
PDZ	Post-synaptic density 95/drosophila disc large zonula occludens family

PGE2	Prostaglandine E2
PGF2	Prostaglandine F2
PKG	Protéine kinase G
PPAR γ	Peroxisome-proliférateur activé récepteur gamma
RedOx balance	Balance réduction/oxydation
RSNO	S-nitrosothiol
TEER	Trans Epithelial Electrical Resistance
TLR	Toll Like Receptors
TNF (α)	Tumor Necrosis Factor (alpha)
ZO 1-3	Zonula Occludens de type 1 à 3

Introduction générale : Etat de l'art

Chez les mammifères, la barrière intestinale est complexe et comprend plusieurs acteurs qui assurent une protection de l'ensemble de l'organisme, en maintenant l'homéostasie et en assurant un rôle de défense face à l'environnement extérieur. Une perturbation comme une hyperperméabilité de cette barrière est à l'origine de nombreuses pathologies locales mais aussi des conséquences au niveau systémique et des altérations d'organes même distants de l'intestin (Meng et al., 2017; Mittal and Coopersmith, 2014).

1. L'Anatomie de l'intestin

Le tractus gastro-intestinal va de la bouche à l'anus, et est composé notamment de l'intestin. Ce dernier est classiquement séparé en deux parties : d'une part l'intestin grêle, et d'autre part le colon. C'est à travers ce tractus gastro-intestinal que s'effectue le transport du bol alimentaire.

L'intestin grêle, d'une longueur d'environ 5 mètres chez l'Homme, pour environ 5 cm de diamètre, est séparé en trois sections : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. C'est au niveau de l'intestin grêle que les nutriments sont absorbés et terminent d'être digérés. Du fait de sa composition, l'intestin grêle est une véritable surface d'échanges avec l'organisme : en effet, ses nombreux replis au sein desquels sont localisées les villosités permettent d'accroître de manière très importante cette surface. Il y a deux types de villosités au niveau de l'intestin grêle : des villosités classiques au niveau de la musculature, et des microvillosités au niveau des cellules épithéliales, permettant une surface totale d'échange de 30m² (Helander and Fändriks, 2014).

Le gros intestin fait suite à l'intestin grêle. Il est caractérisé par la présence du cæcum, un appendice (de volume limité chez l'homme) constituant la réserve de bactéries commensales, et le colon. Ce dernier a pour rôle d'absorber l'eau et les électrolytes provenant du bol alimentaire, qui passe le gros intestin, traverse le rectum, et accède au canal anal contrôlant l'étape de défécation. La motilité intestinale, mise en œuvre *via* le système nerveux entérique autonome, permet le transit du bol alimentaire tout au long du tractus gastro-intestinal (Amiot et al., 2012).

La barrière intestinale est délimitée physiquement par sa paroi : cette dernière est composée de 4 tuniques allant de la lumière intestinale vers l'organisme : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculature et la séreuse (Figure 1).

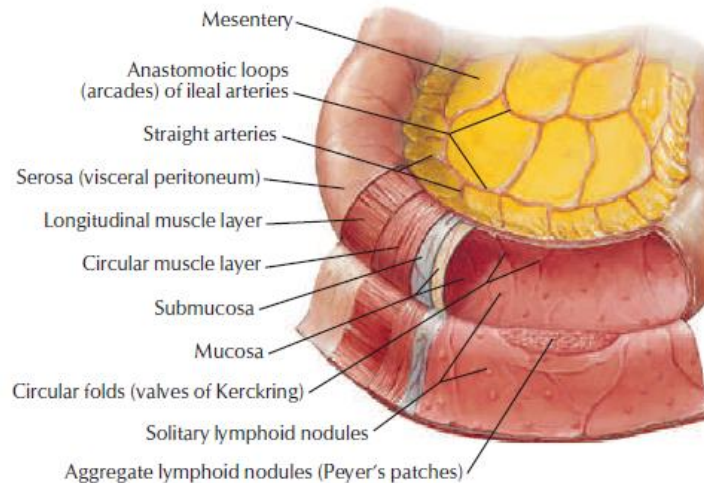


Figure 1 : Structure de la paroi intestinale (Netter, 2019)

La muqueuse (*mucosa*) est la couche la plus interne, et est composée d'un épithélium de revêtement et d'un tissu conjonctif sous-jacent, appelé chorion. La sous-muqueuse (*submucosa*) est composée du tissu conjonctif, et contient le plexus sous-muqueux de Meissner ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques alimentant la muqueuse. La musculature (*muscularis*), quant à elle, est caractérisée par deux couches de tissu musculaire lisse : la circulaire interne et la longitudinale externe, le plexus myentérique d'Auerbach étant entre ces deux couches et permettant de faire avancer le bol alimentaire de l'extrémité proximale à l'extrémité distale. La séreuse (*serosa*) est la tunique la plus externe de la paroi intestinale, et se caractérise par un tissu conjonctif tapissé par le mésothéliome ; selon qu'elle soit située aux abords du tube digestif ou en son centre, sa dénomination change : ainsi, elle est appelée adventice aux abords du tube digestif, et séreuse en son centre. Enfin, les cellules épithéliales intestinales ont une capacité de renouvellement rapide, tous les 3 à 5 jours (Collins and Badireddy, 2019; Turner, 2009).

2. Le système nerveux intestinal

La motilité intestinale est contrôlée par le système nerveux entérique, qui est un système autonome et particulièrement complexe du fait de sa composition : en effet, il est souvent dénommé comme étant le 2^{ème} cerveau de l'organisme avec pas moins de 100 millions de terminaisons nerveuses (Furness et al., 2014). Faisant partie du système nerveux central, il permet de contrôler les fonctions motrices, le flux sanguin, le transport muqueux et les fonctions endocrines intestinales (Costa, 2000).

Le système nerveux entérique est en étroite liaison avec le système nerveux central, et est représenté majoritairement par les deux plexus présents dans la musculature (plexus myentérique d'Auerbach) et dans la sous-muqueuse (plexus sous-muqueux de Meissner). La liaison entre le système nerveux entérique et le système nerveux autonome se fait par l'intermédiaire du nerf vague, ou nerf X.

Le système nerveux entérique permet la sécrétion de neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, la noradrénaline, ou encore la sérotonine, modulant le péristaltisme intestinal et l'activité motrice viscérale. Par ailleurs, la présence de mécanorécepteurs et de chémorécepteurs permet d'informer le système nerveux central du statut de la barrière intestinale en réponse à différents stimuli : abrasion de la muqueuse, stimulations chimiques telles que pH, osmolarité, concentration en nutriments.

Il existe également une étroite interaction entre le système nerveux entérique et les cellules immunitaires, ce qui permet entre autres une réponse inflammatoire adaptée lors de la réception d'un message ayant transité par les fibres nerveuses situées à proximité des mastocytes. C'est le cas par exemple d'une réponse immunitaire faisant suite à une infiltration bactérienne de la barrière intestinale (Yoo and Mazmanian, 2017).

3. La muqueuse intestinale

3.1. Description

La muqueuse intestinale est composée de trois zones : un épithélium monostratifié, la *lamina propria* et la *muscularis mucosae*. L'épithélium monostratifié de l'intestin grêle présente des invaginations, appelées cryptes de Lieberkühn, qui permettent le renouvellement de l'épithélium intestinal via deux types de cellules souches : des cellules souches exprimant le gène *lgr5* (production continue de cellules en prolifération) et des cellules souches exprimant le gène *bmi1* (mobilisation des cellules souches lors de dommages de l'endothélium, pour le reconstituer). Ce renouvellement intestinal a lieu tous les 3 à 5 jours et participe au maintien de l'intégrité de la barrière, primordial pour l'organisme (Potten et al., 2002).

Ces différents éléments structuraux de la barrière intestinale permettent de moduler sa perméabilité, de manière sélective, de molécules par deux voies principales : la voie paracellulaire et la voie transcellulaire.

3.2. Les voies de passage de la muqueuse intestinale

3.2.1. La voie paracellulaire

La voie paracellulaire consiste au passage d'une entité (chimique ou biologique) entre les entérocytes. L'intestin étant polarisé, une sélectivité de ces entités est permise et empêche notamment le passage de microorganismes depuis la lumière intestinale jusqu'au tissu conjonctif sous-jacent (qui risqueraient d'induire des phénomènes inflammatoires et immunitaires). (Tsukita et al., 2001).

Le passage entre deux cellules, est limité par la présence de nombreuses jonctions intercellulaires : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes seront ultérieurement décrits dans les paragraphes 4.2, 4.3 et 4.4, respectivement). La Figure 2 présente les principaux acteurs de la barrière intestinale, ainsi que les voies de passage empruntées par un composé au contact de la barrière.

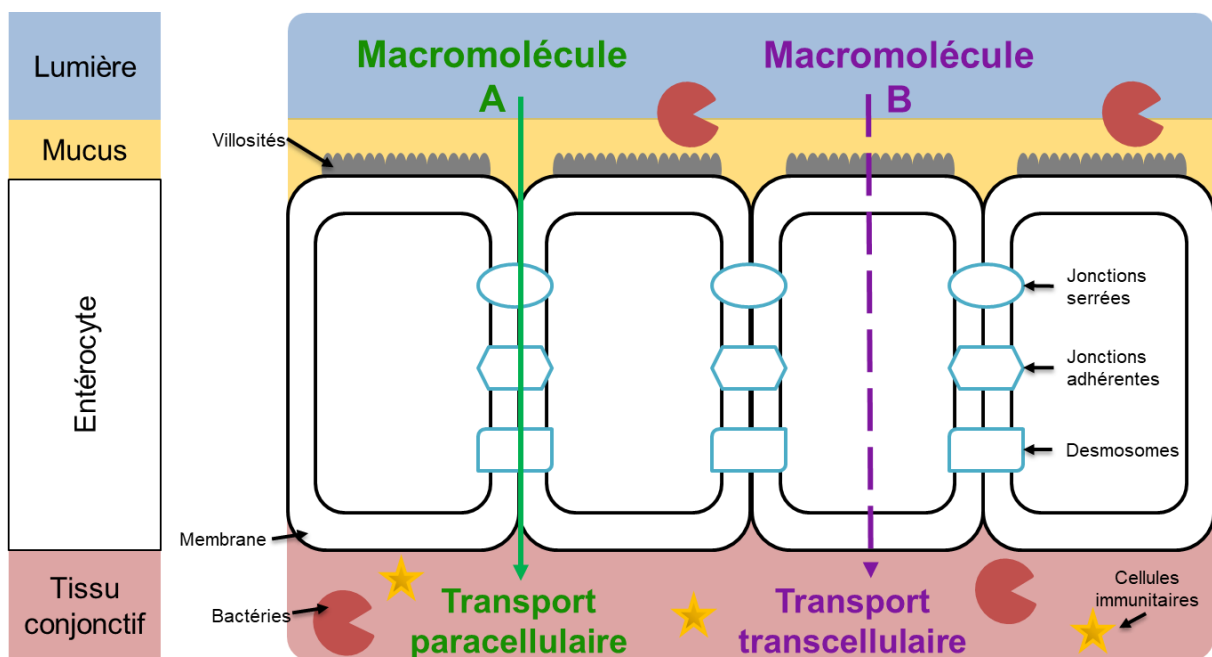


Figure 2 : Les principaux acteurs de la barrière intestinale et les voies de passage pouvant être empruntées par une macromolécule A (voie paracellulaire) ou une macromolécule B (voie transcellulaire) souhaitant franchir la barrière intestinale de la lumière intestinale vers le tissu conjonctif.

3.2.2. La voie transcellulaire

La voie transcellulaire est également une voie de transport des molécules : cette fois, les molécules traversent les entérocytes, en étant prises en charges par des transporteurs membranaires notamment, pour franchir l'épithélium de la lumière jusqu'au tissu conjonctif sous-jacent. Après invagination de la membrane intestinale, les macromolécules majoritairement concernées par cette voie de passage, subiront soit l'endocytose sélective médiée par des récepteurs, soit la pinocytose non sélective (indépendamment de la macromolécule souhaitant traverser la membrane).

L'endocytose commence par une invagination de la membrane plasmique puis fission, formant des vésicules cytoplasmiques à clathrine (protéine formant l'enveloppe vésiculaire). Ensuite, les clathrines vont se désassembler et quitter les vésicules pour fusionner avec les endosomes. L'une des trois voies suivantes sera alors empruntée : soit une dégradation de la macromolécule par les lysosomes, soit une transcytose (passage du pôle apical vers le pôle basolatéral), soit un recyclage de cette macromolécule vers la membrane apicale (Fletcher and Rappoport, 2009).

La pinocytose et la phagocytose non sélective par les cellules M (également appelées « *microfold cells* », situées au niveau des plaques de Peyer et permettant le passage d'une molécule de la lumière intestinale vers le tissu lymphoïde sous-jacent par endocytose), quant à elles, régulent la prise en charge de nutriments et d'antigènes protéiques solubles jusqu'à la membrane basolatérale (Conner and Schmid, 2003). Lors de la formation du complexe ligand-récepteur, et de la même manière que pour l'endocytose, la molécule sera soit dégradée, soit transportée à la membrane par transcytose, soit recyclée à la membrane (permettant l'assemblage de nouvelles protéines). Cependant, la majorité des macromolécules empruntant la voie transcellulaire subit une dégradation, puisque moins de 10% des protéines restent intactes et ne passent ni par la digestion, ni par la transcytose (Heyman and Desjeux, 2006). Cette minorité est alors prise en charge au niveau des plaques de Peyer de l'intestin grêle.

C'est au niveau de ces plaques de Peyer qu'il va également y avoir transport de microorganismes vers les cellules immunitaires : cela permet un contrôle fin de leur passage et des réponses inflammatoires associées (dans le contexte d'une invasion bactérienne par exemple) (Sansonetti, 2004).

3.2.3. La translocation bactérienne : une voie de passage vers la pathologie ?

La translocation bactérienne se caractérise par la traversée de la barrière intestinale d'une bactérie vivante ou de ses produits. Ce phénomène de passage bactérien est une invasion de bactéries intestinales à travers la muqueuse, avec des conséquences pathologiques plus ou moins importantes au niveau immunitaire et inflammatoire. La problématique principale soulevée par la translocation bactérienne est l'induction non seulement du passage de bactéries viables, mais également des endotoxines et antigènes de la lumière intestinale vers la circulation systémique : ceci induit des inflammations systémiques, et donc l'inflammation d'organes à distance du site originel de la réponse inflammatoire (Balzan et al., 2007).

Les entérotoxines et bactéries traversent de la lumière à la *lamina propria*, elles sont exprimées par les bactéries pathogéniques et ciblent les protéines des jonctions serrées : elles se servent de ces protéines comme récepteurs pour s'y attacher et s'internaliser, tandis que d'autres détruisent ces jonctions (en les désassemblant) favorisant inflammation et réponse immunitaire. Même si de nombreuses espèces bactériennes telles que *Salmonella*, *Escherichia* ou encore *Clostridia* expriment ces entérotoxines, elles n'induiront pas nécessairement des infections systémiques : cela dépendra de l'entérotoxine exprimée, mais également de l'intensité de cette expression (plus il y aura de bactérie, plus il y aura d'entérotoxine exprimée, et plus l'impact sera délétère) (Brenchley and Douek, 2012).

Les deux voies majeures de la perméabilité gastrointestinale citées précédemment, paracellulaire et transcellulaire participent à cette translocation, et la voie transcellulaire semble être la plus mobilisée et directe. Finalement, l'emprunt de ces voies par des entités pathologiques (bactéries, entérotoxines, virus) engendre une barrière intestinale plus fragile et plus perméable (soit elle est détruite, soit cela entraîne des phénomènes inflammatoires) : ce sont les acteurs de la barrière intestinale qui, déstabilisés ou désorganisés, n'arrivent plus à assurer leur rôle du maintien de l'homéostasie intestinale (Rombeau and Takala, 1996).

4. Les acteurs de la barrière intestinale

4.1. Les jonctions cellulaires

Situées entre les entérocytes, les jonctions cellulaires régulent la perméabilité intestinale, l'absorption intestinale et l'entrée des éléments présents dans la lumière vers le tissu conjonctif sous-jacent, et les vaisseaux qui s'y trouvent. Parmi ces jonctions intercellulaires, il existe – de la lumière intestinale au pôle basolatéral – les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. L'ensemble de ces jonctions participe au maintien de la polarité de l'épithélium intestinal (c'est-à-dire pôle apical du côté luminal et pôle basolatéral du côté muqueux), élément primordial de l'absorption (Klunder et al., 2017; Noach et al., 1993).

4.2. Les jonctions serrées

4.2.1. Présentation, rôles et composition

Les jonctions serrées conditionnent la perméabilité intercellulaire (voie paracellulaire) des éléments présents dans la lumière. Les jonctions serrées sont un complexe multiprotéique composé de 4 familles de protéines transmembranaires : les occludines, les claudines, les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM) et les tricellulines. Elles correspondent à un arrangement macromoléculaire des protéines transmembranaires associées à des protéines intracellulaires elles-mêmes liées au cytosquelette (principalement aux filaments d'actine).

Ces jonctions sont notamment régulées par la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine grâce à la kinase associée (kinase des chaînes légères de la myosine, MLCK), qui entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale par contraction du cytosquelette puis ouverture de l'espace intercellulaire au niveau de ces jonctions (Berglund et al., 2001; Moriez et al., 2005; Turner et al., 1997) (Figure 3). Les jonctions serrées sont particulièrement impliquées dans le transport paracellulaire puisqu'elles sont les premières en contact avec les molécules provenant de la lumière intestinale. Également, l'ouverture plus ou moins importante des jonctions serrées et la taille desdites molécules favorisera ou non leur passage à travers la barrière intestinale (Groschwitz and Hogan, 2009). Le passage paracellulaire est donc limité, dans les conditions normales, à de très petites molécules : en effet, selon la localisation des jonctions serrées au niveau de l'axe villosités-cryptes, le passage des molécules se

fera de façon différente en fonction de leur taille, soit au niveau des cryptes (taille des pores de 50-60 Å), soit au niveau des villosités (taille des pores inférieurs à 6 Å) (Fihn et al., 2000).

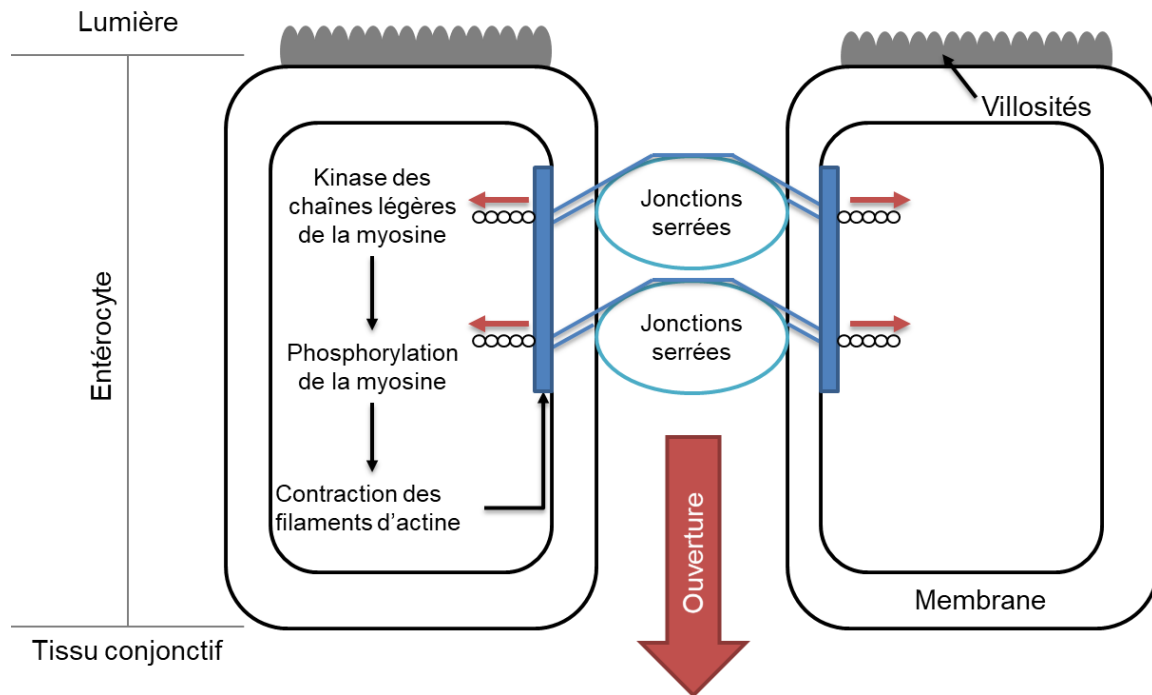


Figure 3 : Mécanisme d'ouverture de l'espace intercellulaire suite à une stimulation de la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK), menant à la phosphorylation de la myosine, à la contraction des filaments d'actines puis à l'élargissement de l'espace intercellulaire, modifié de (Hayashi and Tomita, 2007)

4.2.2. Occludines

Les occludines sont les premières protéines à avoir été identifiées au niveau des jonctions serrées ; elles sont exprimées au niveau des cellules épithéliales et endothéliales, mais également au niveau neurologique (astrocytes, neurones, cellules dendritiques) (Bauer et al., 1999). D'un point de vue structural, elles sont composées d'une courte boucle cytoplasmique N-terminale (riche en tyrosine et glycine) et d'une longue boucle cytoplasmique C-terminale (riche en sérine, thréonine et tyrosine) : ce sont ces boucles qui vont, avec les domaines transmembranaires de l'occludine, réguler la perméabilité paracellulaire. En effet, ces sites particulièrement riches en acides aminés vont être sujets à des phosphorylations/déphosphorylations permettant de moduler la conformation de la protéine, et donc de moduler la barrière intestinale (Chiba et al., 2008). En plus des phosphatases et kinases impliquées dans la modulation des occludines, elles peuvent être également sujettes à de nombreuses

modifications post-transcriptionnelles, post-traductionnelles ou encore subir des réactions de protéolyse, dimérisation, ubiquitination : ces aspects font l'objet d'une minirevue écrite par (Cummins, 2012), c'est pourquoi nous n'en aborderons que quelques-uns ci-après.

Il a été démontré dans plusieurs études que l'occludine ne serait cependant pas la seule modulatrice de la perméabilité intestinale : en effet, des analyses sur souris « knock-out » n'exprimant plus l'occludine ont montré qu'elles avaient des jonctions serrées similaires en nombre et en organisation, comparativement à des souris « sauvages ». De la même manière, ces souris ont démontré que le transport épithélial et la fonction de barrière n'étaient pas altérés (Schulzke et al., 2005).

D'autres études ont montré que la localisation des occludines au niveau des jonctions serrées est modulée par la phosphorylation de plusieurs de leurs sites tels que les résidus de la tyrosine, de la sérine, ou encore de la thréonine. Plus précisément, les occludines sont produites dans le cytoplasme puis subissent une translocation vers la membrane. Ensuite, la phosphorylation de ces protéines permet un assemblage des jonctions serrées sous stimulation en ions calcium Ca^{2+} favorisant entre autres la liaison entre occludine et zonula occludens 1. Ces phosphorylations sont régulées par des kinases telles que la tyrosine kinase c-Yes, et la protéine kinase C, mais également par des phosphatases dont la protéine phosphatase sérine/thréonine 2A (Nunbhakdi-Craig et al., 2002). Si la phosphorylation permet de maintenir des protéines actives, et donc des jonctions serrées efficaces, leur déphosphorylation induit une augmentation de leur perméabilité et donc une altération de la barrière intestinale (Nunbhakdi-Craig et al., 2002).

4.2.3. Claudines

Les claudines présentent une structure similaire aux occludines, avec deux boucles extracellulaires cytoplasmiques, N-terminale et C-terminale, ainsi que 4 domaines transmembranaires. Le rôle des boucles extracellulaires est de contrôler les interactions protéine-protéine et la formation de canaux ioniques sélectifs. Le domaine C-terminal permet d'ancrer la claudine au cytosquelette par des interactions avec les protéines de type *zonula occludens* (ZO-1 à 3) (Itoh et al., 1999). Les claudines sont une grande famille composée de 24 membres qui possèdent des caractéristiques spécifiques en fonction de leur localisation, selon le tissu ou la cellule où elles sont

exprimées (Lal-Nag and Morin, 2009).

Certaines claudines proposent des interactions homophiliques (claudine-claudine), tandis que d'autres ont des interactions hétérophiliques (claudine-autres protéines), davantage restrictives. Ces interactions variables expliquent une hétérogénéité dans la formation des jonctions serrées, et donc de la fonction de barrière selon les tissus (Piontek et al., 2008; Turksen and Troy, 2004).

Par ailleurs, des études ont montré sur des souris knock-out n'exprimant plus la claudine une mortalité très précoce : les souris meurent dans la journée suivant leur naissance du fait d'une perte d'eau importante (Furuse et al., 2002). Il a également été démontré que ces claudines sont impliquées dans le cancer gastrique : la claudine-4 activant la métalloprotéase matricielle de type 2 (MMP2), elle favorise l'invasion de cellules cancéreuses. Ainsi, de l'expression en MMP2, en MMP9 ou en claudine-4 dépendra le type de cancer gastrique qui sera soit intestinal (tumeurs bien différenciées) soit diffus (tumeurs peu différenciées) (Lee et al., 2008).

De la même façon que pour les occludines, les claudines sont modulées par leur phosphorylation sur les résidus sérine et thréonine : une mutation des kinases de la sérine-thréonine entraîne leur perte de fonction, engendrant une augmentation de la phosphorylation des claudines 1-4 et donc une perméabilité accrue (Yamauchi et al., 2004).

Ces éléments indiquent une importance cruciale de la famille des claudines, avec des propriétés propres à chaque sous-type et une hétérogénéité qui permet là encore d'avoir une modulation précise et spécifique de la barrière intestinale. Ainsi, les claudines sont les premières à déterminer, de manière sélective, la perméabilité par rapport à la charge et la taille des molécules. Les voies de passage sont donc très finement régulées et dynamiques, permettant des passages contrôlés, le tout étant permis par la polarité apical – basolatéral, mais également en fonction du tissu ou de la cellule où les claudines sont exprimées, et du sous-type de claudine exprimé (Salim and Söderholm, 2011).

4.2.4. Junctional Adhesion Molecules (JAM)

Cette troisième catégorie de protéines membranaires, les Junctional Adhesion Molecules (JAMs), appartient à la superfamille des immunoglobulines, et sont exprimées dans une multitude de types cellulaires telles que les cellules épithéliales,

les cellules endothéliales et les cellules immunitaires (Ebnet et al., 2004). Il existe 4 types de JAMs qui sont réparties selon leur motif de liaison en type I (JAM 1 à 3, également nommé JAM A à C) ou type II (JAM 4, également nommé JAM-D).

Les interactions homophiliques et hétérophiliques sont permises par la région extracellulaire des JAMs, pouvant se lier à plusieurs ligands (liaisons homophiliques avec les autres types de JAM A à C ; liaisons hétérophiliques avec des intégrines telles que $\alpha 4\beta 1$ ou $\alpha M\beta 2$), et modulant les fonctions cellulaires et la perméabilité intestinale (Bazzoni, 2003; Ebnet et al., 2004). Plus précisément il a été démontré que les interactions homophiliques des JAM A et B sont nécessaires à la formation de jonctions serrées fonctionnelles, tandis que les interactions hétérophiliques permettent l'adhésion des cellules endothéliales aux leucocytes (Bazzoni, 2003).

Sur un modèle *ex vivo* de chambre de Ussing, en utilisant un segment intestinal de colon de souris knock-out (KO) pour le gène *Jam-A* (*JAM-A^{-/-}*), il a été montré une augmentation de la perméabilité tissulaire par augmentation du flux de dextran et une diminution de la résistance électrique transépithéliale (Cera et al., 2004; Laukoetter et al., 2007). Sur ce même phénotype de souris *JAM-A^{-/-}*, celles-ci ont montré une augmentation de leur susceptibilité à l'induction d'une inflammation au niveau du colon : l'exposition au sulfate de dextran sodique (DSS) génère davantage de lésions (score clinique aggravé, diminution de poids, ...) comparativement à des souris exprimant correctement les JAMs.

4.2.5. Zonula Occludens

Les zonula occludens jouent un rôle primordial, et ce notamment du fait qu'elles sont en étroite interaction avec les autres protéines des jonctions serrées, dont les occludines et les JAMs (Figure 4).

Leur importance vient des domaines de liaison PDZ (pour Post synaptic density-95/*Drosophila disc large*/Zonula occludens-1 protein). D'une taille d'environ 85 acides aminés, ces domaines ont pour fonction d'attacher les protéines transmembranaires au cytosquelette. Ces domaines sont indispensables pour la liaison entre l'extrémité C-terminale de l'occludine et le domaine PDZ des *zonula occludens* de type 1, 2 et 3 : sans cette liaison, l'occludine ne pourrait pas être liée au cytosquelette d'actine, et ne pourrait donc pas être fonctionnelle (Furuse et al., 1994). Il en est de même pour l'ancrage de la claudine (Morita et al., 1999) et des JAMs au cytosquelette d'actine

(Ebnet, 2008).

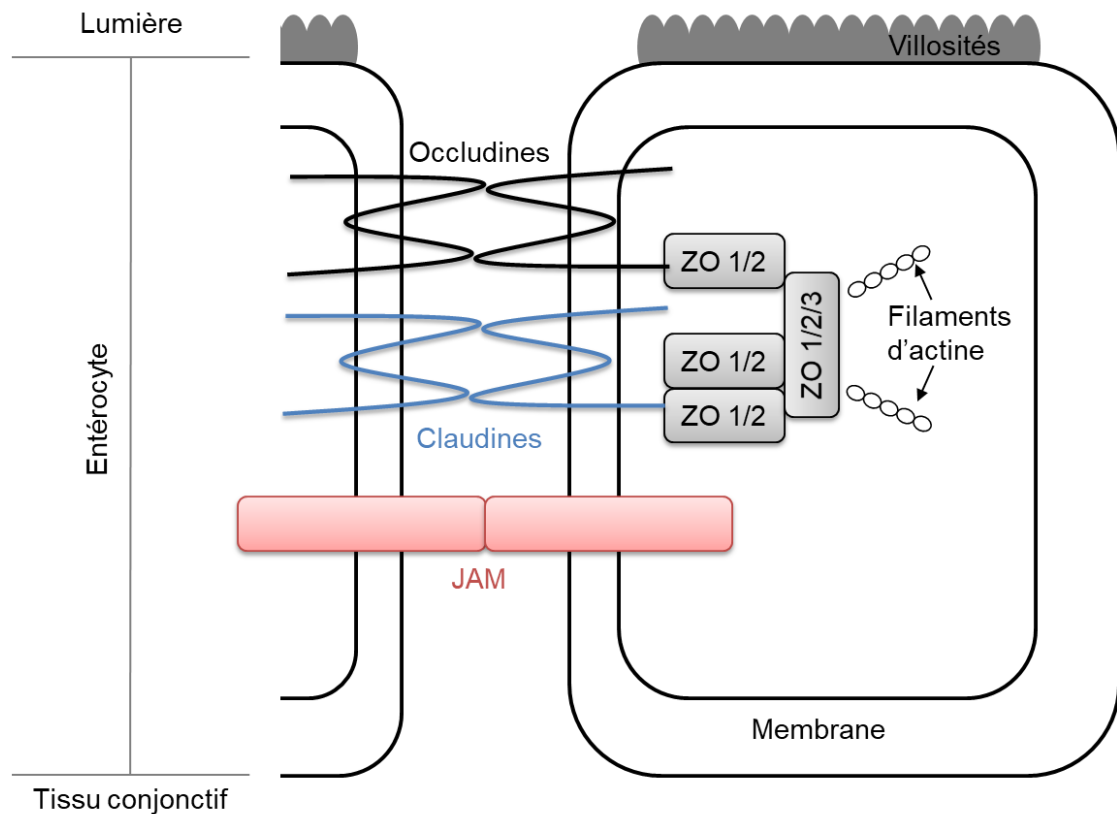


Figure 4 : Organisation des jonctions intercellulaires appartenant à la famille des occludines (4 domaines), des claudines (4 domaines) et des *junctional adhesion molecules* (JAM, 1 domaine), rattachées aux filaments d'actine *via* les domaine PDZ des *zonula occludens* de type 1 (ZO 1), de type 2 (ZO 2) et de type 3 (ZO 3), modifié de (Ulluwishewa et al., 2011)

Ces protéines (occludine, claudine, JAMs) possèdent chacune plusieurs domaines transmembranaires : ceux-ci permettent soit une liaison avec le domaine PDZ d'une autre protéine, soit avec les parties C-terminales d'autres protéines transmembranaires afin de permettre leur ancrage cytoplasmique. Dans l'étude de Ulluwishewa en 2011, ceux-ci expliquent par exemple que les *zonula occludens* possèdent chacune trois domaines PDZ, et que chacun de ces domaines joue un rôle spécifique : ainsi, le premier permet la liaison avec l'occludine, le second avec d'autres protéines de la famille des *zonula occludens* permettant une dimérisation, et le troisième avec les JAM-A. Ces domaines sont donc des éléments clés dans la structuration et la fonction de la barrière intestinale.

4.3. Jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont, avec les desmosomes, des jonctions d'ancrage. Ces jonctions ont un rôle principalement structural puisqu'elles permettent l'ancrage entre la membrane cellulaire et les filaments d'actine. Parmi ces jonctions adhérentes, les cadhérines et les caténines représentent deux familles de protéines qui travaillent en étroite collaboration, participant au maintien de l'homéostasie intestinale.

4.3.1. Cadhérines et caténines

Ce sont les cadhérines qui composent majoritairement les jonctions adhérentes, dénommées en fonction de leur tissu principal d'expression : ainsi, il existe la E-cadhérine (E pour épithéliale), la VE-cadhérine (VE pour endothélium vasculaire), la N-cadhérine (N pour neurale) et la P-cadhérine (P pour placentaire). Parmi ces membres de la superfamille de glycoprotéines transmembranaires, la E-cadhérine est majoritaire, capable de se lier aux caténines (alpha et beta) pour effectuer une liaison entre les entérocytes, formant les jonctions adhérentes (Rubinfeld et al., 1995). L'importance de ces protéines est d'autant plus évidente lorsqu'il est constaté une déficience de ces mêmes protéines dans le cas de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Mehta et al., 2015), ou encore de tumeurs au niveau du colon (Breen et al., 1995). Par ailleurs, une inactivation de la E-cadhérine (*via* son gène *Cdh1*) a montré une diminution de jonctions adhérentes et desmosomales, mais également une diminution de la maturation des cellules de Paneth et des cellules caliciformes responsables de la formation du mucus, ceci favorisant l'invasion de la lumière intestinale par les bactéries et engendrant une inflammation (Schneider et al., 2010).

Un des éléments récurrents de la régulation de l'organisme est la concentration en calcium Ca^{2+} , et les cadhérines n'en font pas exception, puisqu'elles possèdent des sites de captation du calcium, et la fixation du Ca^{2+} permet d'obtenir une rigidité structurale des E-cadhérines, pourtant initialement flexibles (Häussinger et al., 2002; Koch et al., 1997). Ces cadhérines possèdent également deux domaines : un domaine extracellulaire / transmembranaire de type amino-terminal, et un domaine cytoplasmique : ce dernier est crucial puisqu'il possède lui-même deux domaines

(domaine juxtamembranaire et domaine C-terminal) permettant notamment la liaison de la cadhérine à la caténine p120 (Huber and Weis, 2001; Thoreson et al., 2000). Cette caténine p120 est indispensable pour le bon fonctionnement des cadhérines, puisqu'une déficience en caténine p120 a montré qu'il y avait une diminution des trois isoformes de cadhérine (E-, N- et P-cadhérines), et ce sur plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* (Davis and Reynolds, 2006; Smalley-Freed et al., 2010), avec des conséquences tant physiques que fonctionnelles sur l'épithélium intestinal. Ces aspects étant déjà bien abordés en 2013 par (Ivanov and Naydenov, 2013; Kourtidis et al., 2013), nous nous intéressons plus particulièrement aux voies de signalisation empruntées dans la régulation des jonctions adhérentes.

4.3.2. Régulation des jonctions adhérentes

Il n'est pas possible de parler des jonctions adhérentes sans parler de leur régulation, dont laquelle sont impliquées entre autres l'AMPc, les sphingosines ou encore la voie Wnt-caténine.

L'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) a été mise en évidence dans la régulation des jonctions adhérentes, et ce au niveau de leur intégrité et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. L'équipe canadienne de Boucher en 2005 (Boucher et al., 2005) a mis en évidence cette relation entre AMPc et jonctions adhérentes sur des cellules Caco-2, en utilisant un analogue de l'AMPc, la 8Br-cAMP : son utilisation a permis d'inhiber la différenciation des cellules épithéliales intestinales, d'inhiber négativement l'intégrité des jonctions adhérentes (par empêchement des contacts cellule-cellule), et de favoriser la phosphorylation de la E-cadhérine.

Également, la sphingosine, ou plus particulièrement la sphingosine-1-phosphate, a été démontrée comme étant impliquée dans l'amélioration des fonctions de barrière de nombreux types de tissu, dont le tissu intestinal, favorisant l'expression de E-cadhérine (Greenspon et al., 2011).

La voie Wnt-caténine est également impliquée dans l'homéostasie de nombreux tissus (Clevers, 2006), dont le tissu intestinal, du fait de sa relation avec la β -caténine qui en est le transducteur de signal cytoplasmique essentiel. De ce fait, la mutation de cette voie sur des souris, par inactivation de la β -caténine, induit leur mort par blocage de l'homéostasie intestinale : des altérations phénotypiques rapides des cryptes empêchent la prolifération cellulaire entérocytaire, ce qui induit une réduction de

l'épithélium intestinal (Fevr et al., 2007).

Enfin, un autre élément s'est montré primordial dans la régulation des jonctions adhérentes, il s'agit des polyamines naturelles : bien qu'elles soient déjà connues pour leur régulation de la concentration intracellulaire en calcium, il se trouve que leur déplétion induit une diminution de ce calcium cytoplasmique, entraînant l'inhibition de l'expression des ARNm d'E-cadhérine, ainsi qu'une réduction de la demi-vie des E-cadhérines (par augmentation de leur dégradation) (Guo et al., 2003). Ces polyamines sont donc manifestement impliquées dans les voies d'expression des jonctions adhérentes.

4.4. Desmosomes

Les desmosomes sont le troisième type de jonctions intercellulaires permettant de faire le lien entre deux entérocytes. Situées le plus profondément comparativement aux jonctions serrées et aux jonctions adhérentes, leur proximité avec la lumière intestinale en font un élément majeur de la barrière intestinale. Les desmosomes ayant fait l'objet d'une revue très intéressante et complète en 2013 par (Kowalczyk and Green, 2013), nous allons faire une présentation relativement simple et rapide de ce type de jonctions intercellulaires, qui n'en restent pas moins primordiales pour le maintien de l'homéostasie intestinale. Ce sont des jonctions cellule-cellule médiées par les cadhérines, dites cadhérines desmosomales, qui contrairement aux autres types de jonction préalablement citées, sont liées non pas aux filaments d'actine, mais au réseau de filaments intermédiaires et de kératine : ceci permet d'apporter une force mécanique aux cellules épithéliales (Perez-Moreno et al., 2003). Les protéines desmosomales sont composées des superfamilles de cadhérines desmosomales dont les membres sont les desmoglérines (gènes *Dsg* de 1 à 4) et de desmocollines (gènes *Dsc* de 1 à 3), dont l'adhésion cellule-cellule est dépendante de la concentration en calcium (Getsios et al., 2004; Kottke et al., 2006; Nava et al., 2007). Les desmosomes sont également composés des membres de la famille protéique dite « *armadillo* », représentée par les plakoglobines et les desmocollines. Enfin, la famille des plakines, permettant la liaison entre plaque desmosomale et filaments intermédiaires est le troisième et dernier élément primordial composant les desmosomes (Kowalczyk and Green, 2013).

4.4.1. Cadhérines desmosomales : desmogléines et desmocollines

Les cadhérines desmosomales sont un point clé des desmosomes, et sont représentées par les familles des desmogléines (Dsg) et des desmocollines (Dsc). Ces deux familles protéiques sont en étroite interaction, si bien que des interactions tant hétéro- que homophiliques ont été décrites entre elles, et il a été montré que ces deux familles sont indispensables à l'adhésion cellulaire (Nekrasova and Green, 2013). Parmi ces familles, les Dsg2 et Dsc2 sont les plus représentatives et permettent la liaison aux protéines *armadillo*, et donc au cytosquelette (Harrison et al., 2016). Cependant, il a été montré en 2018 que, de ces deux représentantes, seulement Dsg2 semble être cruciale pour le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (Gross et al., 2018). Renforçant cette idée, il a été montré que Dsg2 est diminuée chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Spindler et al., 2015), or, Dsg2 est capable de moduler la voie p38/MAP kinase, voie étant connue comme étant largement impliquée dans ce type de pathologie et devant être très finement équilibrée (l'activation comme l'inhibition de cette voie induisent une déstabilisation de la barrière intestinale) (Ungewiß et al., 2017).

4.4.2. Relation entre protéines de la famille armadillo et desmoplakines

Les plakoglobines et plakophilines font partie de la famille *armadillo*, ce sont les points d'accroche pour les interactions cellule-cellule, puisque les cadhérines desmosomales vont venir se fixer sur ces protéines, pour ensuite se lier au réseau de filaments intermédiaires de cytokératine et s'ancrer au cytosquelette. Plus précisément, les cadhérines desmosomales préalablement décrites interagissent avec les plakophilines et les plakoglobines, qui vont-elles-mêmes s'associer aux desmoplakines permettant l'ancrage au cytosquelette. La plakoglobine est en réalité présente tant au niveau desmosomale qu'au niveau des jonctions adhérentes, mettant en relief son implication dans l'adhésion cellule-cellule. Cependant ce n'est pas son unique rôle car elle est aussi impliquée dans les régulations de la tumorigenèse et des métastases, ces éléments faisant l'objet d'une revue complète et écrite par (Aktary et al., 2017).

4.5. Mucus

4.5.1. Présentation

En plus des jonctions intercellulaires largement décrites précédemment, permettant de lier les entérocytes deux à deux, ces derniers sont recouverts par un tapis, une couche de mucus. Ce tapis est formé par les cellules caliciformes (« goblet cells »), capables de sécréter du mucus, et qui sont distribuées le long de l'épithélium intestinal. Le mucus est constitué de glycoprotéines (des mucines principalement) formant un gel recouvrant l'épithélium (Kim and Ho, 2010). Cependant, le mucus ne se limite pas à un rôle protecteur, mais est également une interface d'échanges : ainsi, il permet à la fois de fournir une niche aux bactéries commensales et d'empêcher l'infiltration, de manière sélective, de certains microorganismes jusqu'à l'épithélium intestinal. Ce mucus est donc non seulement primordial pour le maintien de la barrière physique intestinale, mais également pour le contrôle du microbiote intestinal.

4.5.2. Cellules caliciformes, mucines et bactéries

Les cellules caliciformes, ou *goblet cells*, sont les cellules permettant de sécréter du mucus à la surface des entérocytes. Ce mucus est composé d'environ 50 protéines, et principalement de la mucine 2 (ou MUC2), qui est une mucine formant un gel et sécrétée par les cellules caliciformes. Le tapis de mucus est indispensable du fait qu'il incarne une surface d'échange avec les bactéries commensales, les empêchant d'envahir la lumière intestinale. Les différentes manières dont le mucus est régulé font l'objet d'une partie de la revue (*Cf. Revue « Involved factors in the maintenance of intestinal barrier homeostasis: a review », partie 3 « Modulation of intestinal mucus properties »*). Dans des études plus récentes, de 2019 (Macierzanka et al., 2019; Schroeder, 2019), portant sur le mucus intestinal et ses interactions avec les bactéries, soulignent d'une part l'impact délétère du régime de type « western diet », pauvre en fibres, sur la barrière intestinale ; et d'autre part, le maillage de la couche de mucus avec une porosité d'environ 100 nm n'est pas le seul facteur permettant le passage d'entités à travers la barrière intestinale : en effet, les bactéries se servent des composants de la couche de mucus, notamment des glycanes, en tant que nutriments : cette utilisation fragilise et perméabilise la couche de mucus, et donc la barrière

intestinale. Par ailleurs, la charge négative de certaines molécules – déterminée par la sécrétion des sels biliaires – permet d'éviter leur mucoadhésion,

4.6. Immunité innée

4.6.1. Présentation

L'immunité innée est notamment régie par les cellules immunitaires présentes au niveau des plaques de Peyer mais aussi dans le tissu conjonctif sous l'épithélium : elles permettent de renforcer le rôle de la barrière intestinale et de maintenir son intégrité. Dans le cas d'une agression par les bactéries commensales par exemple, et dans des conditions physiologiques, l'immunité innée permet d'intervenir de manière adaptée et pondérée, avec une inflammation contrôlée (Hooper and Macpherson, 2010).

4.6.2. Récepteurs TLR, NOD et microbiote intestinal

Les récepteurs dits « Toll-like receptors » ou TLR sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie intestinale, notamment en favorisant la formation de la couche de mucus. Cependant, la signalisation induite par les TLR doit être un élément contrôlé de manière fine puisque, si une activité normale ou modérée est indispensable pour l'homéostasie, une activité excessive peut être pathologique et être source d'inflammation intestinale. Les récepteurs TLR peuvent être modulés par un nombre important d'inhibiteurs, dont PPAR- γ , A20 et NOD2 : le rôle de modulation de ces trois éléments font également l'objet d'une partie de la revue (*Cf. Revue « Involved factors in the maintenance of intestinal barrier homeostasis: a review », partie 4 « Modulation of intestinal immunity »*).

Par ailleurs, il ne faut pas oublier un des composants importants de la barrière intestinale, qui est le microbiote intestinal : les bactéries commensales permettent de prendre en charge un certain nombre de nutriments apportés par l'alimentation, tels que les fibres ou les saccharides qui ne peuvent pas être absorbés au niveau intestinal. De plus, le microbiote présente également un rôle de barrière physiologique, en

empêchant le développement et l'adhésion de bactéries pathogènes au niveau de l'endothélium. Il est aussi indispensable pour la maturation de l'épithélium intestinal, ceci dans le but d'avoir une réponse immunitaire innée adaptée. Ainsi, les bactéries modulent à la fois le renouvellement de l'épithélium, la différenciation cellulaire et l'immunité innée (Payros et al., 2014).

Afin de mieux comprendre la barrière intestinale, nous avons vu les différents acteurs qui permettaient de maintenir son homéostasie, sur des plans plutôt morphologiques et caractéristiques physiques. Cependant, il est intéressant de noter que ces acteurs peuvent être modulés, et c'est là tout le secret du maintien de l'homéostasie qui se fait dans une régulation à la fois fine et équilibrée : c'est ce que nous avons souhaité traiter dans la revue ci-après, en nous basant sur les travaux de recherche passés et actuels. Cette revue permet, de plus, de dégager de potentielles nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques afin de pouvoir maintenir – ou même rétablir – l'homéostasie de la barrière intestinale dans le cadre notamment des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Revue : Involved factors in the maintenance of intestinal barrier homeostasis: a review

Involved factors in the maintenance of intestinal barrier homeostasis: a review

Schmitt Romain¹, Sapin Anne^{1*}

¹ Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

* Correspondence to: Sapin Anne, Université de Lorraine, CITHEFOR EA 3452, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

E-mail: anne.sapin@univ-lorraine.fr

Abstract:

Abbreviations:

Keywords:

Table of contents

<u>1.</u>	<u>Introduction</u>	26
<u>2.</u>	<u>Modulation of intestinal tight junctions</u>	28
<u>2.1</u>	<u>Action on constitutive proteins from tight junctions</u>	28
<u>2.1.1</u>	<u>Claudins</u>	28
<u>2.1.2</u>	<u>JAM-A</u>	30
<u>2.2</u>	<u>Action on myosin-light chains</u>	31
<u>2.2.1</u>	<u>Calcium-calmodulin complex</u>	31
<u>2.2.2</u>	<u>Rho/ROCK</u>	31
<u>2.3</u>	<u>Modulation by cytokines</u>	32
<u>2.3.1</u>	<u>Pro-inflammatory cytokines</u>	32
<u>2.3.2</u>	<u>Anti-inflammatory cytokines</u>	34
<u>3.</u>	<u>Modulation of intestinal mucus properties</u>	35
<u>3.1</u>	<u>Goblet cells</u>	35
<u>3.2</u>	<u>Mucus and bacterial regulation</u>	36
<u>4.</u>	<u>Modulation of intestinal immunity</u>	37
<u>4.1</u>	<u>Toll-Like-Receptors (TLR) family</u>	37
<u>4.2</u>	<u>TLR modulators</u>	38
<u>4.2.1</u>	<u>Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-γ)</u>	38
<u>4.2.2</u>	<u>A20</u>	39
<u>4.2.3</u>	<u>NOD2/CARD15</u>	39
<u>5.</u>	<u>Modulation by pharmacological molecules and potential innovative therapeutics</u>	41
<u>5.1</u>	<u>Pharmacological drugs on the market</u>	41
<u>5.2</u>	<u>Nitric oxide and role at the intestinal level</u>	41
<u>5.3</u>	<u>Nitric oxide donors</u>	42
<u>5.4</u>	<u>Therapeutic potential of GSNO</u>	43

<u>6.</u>	<u>Conclusion and perspectives</u>	44
<u>7.</u>	<u>Appendices</u>	45
<u>8.</u>	<u>Acknowledgements</u>	47
<u>9.</u>	<u>References</u>	47

1. Introduction

The intestinal barrier is the main interface which controls the exchanges between the inner organism (the host) and the environment. Because of its structure, it is a real frontier keeper which allows the crossing of indispensable molecules (such as ions and nutrients, [1]), while blocking non-desirable ones (such as bacteria, [2]). This role of the intestinal barrier is crucial to maintain a homeostasis, and so to prevent the occurrence of intestinal pathologies, such as inflammatory bowel diseases (classically subdivided in two forms, Crohn's disease, and ulcerative colitis, [3]).

Cell junctions are at the first line in this barrier: situated between enterocytes, they regulate the intestinal permeability (paracellular transport, [4]), the intestinal absorption, and the entry of elements which are present in the lumen to the underlying conjunctive tissue, and to vessels in this area. As parts of these cell junctions, there are three type of junctions, from up to bottom, tight junctions, adherent junctions, and desmosomes which control the intestinal absorption [5].

Tight junctions are the main junctions which modulate the entry of molecules – or bacteria – through intercellular space, as there are the firstly exposed to these elements. There are in a strong relation with transmembrane proteins and intracellular proteins attached to the cytoskeleton through actin filaments: this relationship allows the crossing of very small molecules only [4], and bigger molecules should be taken in charge by transporters to cross the cells [6]. Four protein families compose this type of junctions: occludins, claudins, junctional adhesion molecules and *zonula occludens*.

- Occludins, which were the first proteins identified on tight junctions, are expressed on epithelial and endothelial cells. These are not only intestinal but also neurological as it was found on astrocytes, neurons and dendritic cells [7];
- Claudins, are like occludin in their structure. It is a big family of proteins composed of 24 members which are expressed differentially according to the specie, and which have specific roles, sometime opposite [8].
- Junctional adhesion molecules, which take part to the immunoglobulin family, are also expressed on a lot of cell types (epithelial, endothelial and immune cells, [9]). There are 3 types of JAMs, which can modulate cell functions and intestinal permeability by specific interactions, homophilic and heterophilic [10].

- *Zonula occludens*, which are directly linked with the 3 other tight junctions previously mentioned, and permit to link these proteins to actin cytoskeleton, and so to be functional [11–13].

Enterocytes are recovered by a layer of mucus: this mucus is secreted by goblet cells and is located all along the intestinal epithelioma. This substance is composed of glycoproteins, mainly of mucins, forming a gel that recover the epithelioma [14]. However, it has not only a protective role, but is also an exchange interface: indeed, it permits to bring a niche for commensal bacteria and to avoid infiltration, in a selective manner, of some microorganisms until the intestinal epithelioma [15]. This mucus is not only crucial for intestinal barrier physical maintenance, but also for the control of intestinal microbiota: *Elderman and colleagues* has shown in 2017 that ageing contributes to the thickness of the mucus layer, with a downregulation of genes involved in mucus biosynthesis, and modification of microbiota population (decrease of *Lactobacillus* and *Clostridiales*, increase of *Bacteroides*) leading to an increased immune system activity [16].

Intestinal immunity is the third main actor of the intestinal homeostasis and is leaded by immune cells located in Peyer's patches and in the conjunctive tissue under the epithelioma, reinforcing the role and the maintenance of barrier integrity. When an external aggression occurs, these cells can intervene and respond, in a balanced manner, by an innate immune response and a controlled inflammation. From 1965, Peyer's patches were described and studied in the small intestine, and noteworthy by *Cornes*, showing that their number increase largely in human at the puberty [17]. Then, these lymphoid aggregations were shown to be linked with mast cells in the mucosa [18], to have receptors for transmitters of enteric neurons on lymphocytes in the *lamina propria* [19], and to manage lymphocytes recruitment, through innervation of lymphoid tissue (= Peyer's patches, [20]).

All these pre-cited actors can be modulated, and not only by chemical reactions in the organism, but also by some active molecules and drugs. The modulation can go through the direct modification of the intestinal barrier actors, but also through activation or inactivation of some signaling pathways that defines a dynamic intestinal barrier maintenance. Here, the focus will be done on nitric oxide, or NO, a specific radical produced by enteric glial cells and known to have several roles in the intestinal physiology and pathology [21].

The structures of the intestinal barrier, and its main factors (cell junctions, mucus layer and immune cells) are the key points in this intestinal homeostasis, as they can be modulated in several ways. The purpose of this review is to have an overview of the different ways by which these actors are modulated, and so to emerge some potential therapeutic targets for the prevention of intestinal barrier disruption.

2. Modulation of intestinal tight junctions

As seen before, cell junction, and particularly tight junction, are crucial for the maintenance of intestinal barrier homeostasis. These tight junctions can be modulated in several ways, by modifying their constitutive proteins, by enlargement or narrowing of the intercellular space through myosin-light chains, and by action of some cytokines, such as anti- or pro-inflammatory interleukins.

2.1. Action on constitutive proteins from tight junctions

2.1.1. Claudins

Claudins are largely studied as it is a big family of 24 mammalian proteins, and interestingly, all these proteins have not the same role and the same effects. Moreover, these proteins are not expressed in all the organs, some of them are organ-specifics and specie-specifics. *Nag and Morin* [22] clearly described in 2009 the expression of these claudins according to the specie and noticed that only claudin-13 is not present in the human genome, whereas rodents have all the 24 members. These claudins are very small, with around 20 kilobases. It seems that these claudins are often paired and expressed in the same way: for example, claudin-1 [23] and claudin-7 [24] expressions are reduced in breast cancer, while claudin-3 and claudin-4 are overexpressed [25].

These transmembrane proteins composing tight junction are crucial for the modulation of intestinal permeability, through their linking to the actin cytoskeleton which stabilizes the tight junctions [26]. The relation with the cytoskeleton is permitted due to the claudins structure, composed of cytoplasmic N-terminus and C-termini: the latter is composed of a motif, called “PDZ binding motif”, which permits directly

interactions with other proteins that compose the tight junctions (such as *zonula occludens*, [27]). Moreover, claudins are also composed of two extracellular loops: the first extracellular loop seems to oversee paracellular permeability, with the creation of charge-selective channels [28]. For example, to substitute a charge from negative to positive will favorize the crossing of Na^+ , while substituting positive for negative charge will promote the crossing of Cl^- through intercellular space [29]. The second extracellular loop is involved in dimerization between claudins of both sides of the membrane, by homophilic interactions: it permits to constrict the paracellular space with the binding of two claudins at aromatic and hydrophilic residues [30].

Because of the presence of serine, threonine and tyrosine, claudins can be modulated in several ways, mainly by chemical reactions such as palmitoylation [31] or phosphorylation [32]: these modifications will modify localization and function of claudins, and so of tight junctions. Palmitoylation consists in a post translational modification, with the attachment of a fatty acid to a protein: for claudins, the inhibition of this reaction by mutation of palmitoylation sites alters claudin intracellular localization, and so its delivery to the membrane. Phosphorylation consists in an addition of a phosphate on proteins: for claudins, it has both good and bad effect in tight junction assembly and function, and this duality is due to several possible phosphorylation and to the variety of claudins. For example, the phosphorylation of claudin-1 through protein kinase C is crucial for the assembly of epithelial tight junction [33] while the phosphorylation of claudin-3 through protein kinase A induces a disassembly of tight junction [34]. Moreover, myosin-light chain kinases (MLCK, [35]) and rho kinase [36] are also involved in this process, as a phosphorylation *via* these pathways induces a disassembly of tight junctions, and so an increase in intestinal permeability. Last, and not the least, inflammation is also involved in this phosphorylation phenomenon: it was shown that a stimulation by tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF}\alpha$) leads to an activation of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), inducing an increase of claudin-2 expression [37]. On another hand, the stimulation by interferon gamma induces a decrease in claudin-1, -5 and -7 expressions [38]. Both inflammation ways were shown to increase the activity of MLCK and decreasing the intestinal barrier function [39].

2.1.2. JAM-A

The family of Junctional Adhesion Molecules (JAM) has 3 subtype members, called JAM-A, -B and -C. There are glycoproteins located in intercellular junctions, composed of two extracellular domains which play a role in homophilic interactions, and so in the regulation of intestinal barrier [9,10]. These transmembrane proteins are a part of immunoglobulin superfamily and are expressed in many cell types, such as epithelial, endothelial and immune cells [9].

It was shown, by *Laukoetter et al* in 2007 [40], that the selective inhibition of JAM-A in the mice induced an increase of mucosal permeability through an increase of dextran flux and a decrease of transepithelial electrical resistance. In this same study, it was shown that there was an increase of knock-out mice susceptibility to chemical colic induction: exposure to sodium dextran induced more lesions compared to normal JAM-expressing mice. More recently, the deficiency of JAM-A in mice showed an impairment of macrophage-dependent neutrophil recruitment, under increased intestinal permeability [41]. Moreover, the use of antibiotics such as bacitracin or neomycin, to deplete the microbiota, showed an increased expression of JAM-A and a decrease of intestinal permeability [42]. A lot remains to be studied about JAM family, and especially according to their interaction with the intestinal microbiota.

The regulation of JAM-A can be operated through phosphorylation of its tyrosine: it has been shown that, especially under inflammation after cytokine exposure of human intestinal cell monolayer, this inflammation induced an increase of intestinal permeability, correlated with an increase of phosphorylated tyrosine (Y280). This phosphorylation is Src-kinase dependent and is performed by Yes-1, which is increased in presence of pro-inflammatory cytokines. Indeed, the use of Src-kinase inhibitor reduced the tyrosine Y280 phosphorylation. Interestingly, the phosphorylation of JAM-A is very low and almost undetectable in physiologic conditions, and Src-kinase activity is counterbalanced by the activity of PTPN13 tyrosine phosphatase [43].

2.2. Action on myosin-light chains

Myosin light chain kinases (MLCK) are known to play a crucial role in the maintenance of intestinal barrier, and especially at cell junction: its activation induces an increase in intestinal permeability. It can be regulated by several actors: recently, *Al-Sadi* clearly discussed in 2008 the various actors which modulate MLCK activity: some signaling pathways increase its activity (calcium-calmodulin, protein kinase C, rho kinase, MAP kinase, phosphatidylinositol triphosphate kinase) while some others decrease it (MLC phosphatase, protein kinase A, protein kinase G) [44].

2.2.1. Calcium-calmodulin complex

One of the better-known ways, explaining how MLCK works is directly related to the intracellular concentration of calcium: it is well-documented that MCLK are dependent to the Ca^{2+} -calmodulin complex, and are serine-threonine protein kinases. There are crucial in the transport of nutrients through the barrier, managing the regulation of tight junctions [45]. From 1993, sodium decanoate (C10) was described as a enhancer of drug absorption by the paracellular route [46], and was then studied to better understand tight junction mechanism. In 2007, *Hayashi and Tomita* [47] clearly explained the exact mechanism of tight junction modulation consecutive to an increase in intracellular concentration of calcium, and showed this using C10: it will activate phospholipase C, inducing an increase in intracellular calcium concentration, activating the calcium-calmodulin complex which activate MLCK by its phosphorylation. Finally, there is a contraction of actin filaments that extends the intercellular space. This mechanism, reversibly, increases the intestinal permeability and reduces the transepithelial electrical resistance of the intestine, and this is the reason why it is used on *in vitro* and *ex vivo* intestinal models for the study of drugs effects [48–50].

2.2.2. Rho/ROCK

It is known that protein kinases have an important role in various cellular functions regulation. As a part of these proteins, there is the serine-threonine kinase, and one of its members is the rho-associated kinase (ROCK). The rho/ROCK pathway is already known to phosphorylate many substrates and to inhibit the axonal growth in neurodegenerative diseases and is very promising as a potential therapeutic target [51–53]. Here, we want to focus to its role in the intestinal tract regulation: in 2015,

Huang reviewed about the role of rho kinase, especially in inflammatory bowel diseases [54], and highlighted that ROCK is able to phosphorylate myosin-light chains, as MLCK can do, and engender intestinal barrier impairment, as much as regulating the intestinal barrier integrity (through cytoskeleton actin filaments contraction). An increase of intracellular calcium concentration (by ethanol stimulation) activates RhoA kinase, which activate the Rho/ROCK pathway and MLCK, leading to reorganization of actin filaments, and so in intercellular junction and barrier disruptions [55]. The inhibition of ROCK, using its inhibitor Y-27632, increased the number of L cells, the intestinal secretory cells differentiation, and the hormonal secretion of insulin also showing some potential benefits in glucose-tolerance phenomenon [56].

There are already some studies trying to investigate how it is possible to modulate this rho/ROCK pathway: for example, it has been shown, on a sepsis model, that the use of simvastatin to inhibit this pathway, is able to reduce intestinal barrier dysfunction, and other impairments such as inflammation and oxidative stress. It also permits to increase the expression of tight junction proteins [57]. In 2018, the naringin, a natural glycoside from grapes and citrus fruits, on a sepsis model, showed a protection of intestinal mucosal barrier function by reducing oxidative stress and inflammation markers, and authors hypothesizes that these results are maybe regulated by the Rho/ROCK pathway [58]. From these results, it is an evidence that all these points are linked together and should be further investigated, to better understand the rho/ROCK role in intestinal physiology but also to highlight some potential new therapeutic targets for intestinal diseases, but not only.

2.3. Modulation by cytokines

2.3.1. Pro-inflammatory cytokines

Many pro-inflammatory cytokines such as Tumor necrosis factor (TNF) are involved in the barrier regulation, and especially in the opening of tight junctions, by the stimulation of MLCK, inducing a phosphorylation of myosin-light chains and a decrease in intestinal barrier function [59]. Precisely, TNF activity is stimulated by the immune system response to an infection, which induces an increase of mucosal TNF, and so an increase in intestinal permeability: this pathway seems to not be mediated

by NF- κ B [60]. However, in 2016, the NF- κ B p50/p65 dimer was shown to be activated by TNF: when TNF is bonded to its receptor, it induces the phosphorylation and degradation of inhibitory κ B (I κ B), and the activation of the p50/p65 dimer [61].

Moreover, a stimulation of TNF induces an increase in claudin-2 expression which can explain this permeability enhancement as explained earlier [37]. It has been also shown that the phosphorylation of MLC, induced by TNF stimulation, provokes a reorganization of actin filaments, and a cytosolic translocation of occludin by the caveolin-1 process. Also, another subfamily of TNF, called LIGHT (for lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for herpes virus entry on T cells) has been shown to enhance TNF release from T cells, activate MLCK and stimulate occludin endocytosis, leading to an intestinal barrier impairment [62].

Another pro-inflammatory cytokine, interferon gamma (IFN γ) was seen to activate MLCK and to act on commensal bacteria (promoting their adhesion and internalization mediated by caveolins) [63]. It also decreases the expression of tight junctions (through tight junctions' proteins internalization by a macropinocytosis-like process) and rearranges the cytoskeleton [64], impairing the intestinal barrier.

Some interleukins such as interleukin-1 β (IL-1 β) or interleukin-6 (IL-6) are involved in a decrease in the intestinal barrier function, and it is correlated with their increased expression in patients with inflammatory bowel diseases [65,66]. On a Caco-2 monolayer model, IL-1 β was shown to increase MLCK activity, and so MLC phosphorylation, maybe by the NF- κ B pathway as its inhibition abolished MLCK expression [44]. IL-1 β acts also directly on the barrier by increasing its permeability and decreasing its resistance: it is linked to a decrease of tight junction expressions, and to an increase of MLC phosphorylation. IL-6 is linked to a specific tight junction, claudin-2, whose expression is increased in presence of IL-6, increasing the tight junction permeability of cation specifically: IL-6 and TNF-alpha inhibition permitted to recover claudin-2 basal expression [67,68]. IL-22 has also a role in many pathologies, included IBD, and acts by increasing the expression of claudin-2, causing an impairment of the intestinal barrier [69]. IL-23 seems to have a large part in the onset of inflammation in IBD patients, as its inhibition has a protective effect: recently, some clinical trials with Ustekinumab – a monoclonal antibody targeting IL-12 and IL-23 – showed an improvement of patients with Crohn's disease, and is very promising as an

alternative to anti-TNF treatments (around 40% of patients are anti-TNF resistant) [70–72] .

2.3.2. Anti-inflammatory cytokines

Not all interleukins are pro-inflammatory, but some are also anti-inflammatory, such as IL-10 which is known to restore the intestinal barrier disruption, at least by countering the effects of pro-inflammatory cytokines: *Saraiva and O'Garra*, in 2010, has reviewed the production of IL-10 by macrophages and its beneficial actions to maintain intestinal homeostasis [73]. Moreover, the production of IL-10 is linked to the diet and especially to the subsequent amino-acids supplementation [74].

IL-17 is firstly described as a pro-inflammatory cytokine and is clearly increased in IBD patients [75,76]. IL-17 seems also to have protective effects on the intestinal barrier but is subject to a lot of discussions: IL-17 is secreted by Th17 cells located mainly in the lamina propria, and this secretion is induced by intestinal dendritic cells (depending of their TGF- β production) [77]. It was showed in a clinical trial especially, that IL-17 (and its subtype IL-17A) is crucial to human health, as the use of Secukinumab, a monoclonal antibody anti-IL-17A, in IBD patients increased consequently the inflammatory markers and developed additional infections [78].

IL-35 is a member of IL-12 cytokine family secreted by regulatory T-cells and by lymphocyte B cells [79]. It has shown very promising proofs in as a potential novel therapeutic strategy: *Shen et al* has shown in 2014 that this secretion of IL-35 induced an inhibition of anti-microbial immunity, and so a protective effect in infectious diseases (*i.e. Salmonella* infection), conjointly with IL-10 secretion [80]. More recently, a study has shown the efficacy of IL-35 recombinant protein in many inflammatory diseases, by promoting the secretion of anti-inflammatory cytokine IL-10 while inhibiting the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-17 and TNF [81].

Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) is another anti-inflammatory cytokine which permits to enhance the intestinal barrier, avoiding the dysfunctions caused by the pro-inflammatory cytokines. It is described as a protective cytokine as its lack is observed in patients with IBD: at low concentration of TGF- β , Th17 cells are stimulated through IL-23; and, at high concentration, there is no more stimulation of IL-23 receptor *i.e.* this inhibition induce the activation of IL-22: finally, we can say that TGF- β permits

to control a balance between IL-22 (pro-inflammatory) and IL-23 (anti-inflammatory) [82]. Moreover, on intestinal epithelial monolayers (T84 and Caco-2), TGF- β preserved the barrier from dysfunctions caused by hypoxia-reoxygenation (HR) or by Reactive Oxygen Species (ROS) exposure, through a lowering of HR impacts on transepithelial resistance and permeability when cells are pretreated with TGF- β [83]. It is also in strong interaction with the intestinal microbiota, as it was already well-reviewed [84].

3. Modulation of intestinal mucus properties

Mucus is composed of around 50 proteins, and mainly of MUC2 which is a gel-forming mucin secreted by goblet cells: it is known that there is a turn-over of intestinal epithelium of 3 to 7 days, permitted by intestinal stem cells which can differentiate to enterocytes but also goblet cells [85].

3.1. Goblet cells

Goblets cells are known to be the secreting cells of intestinal mucus, and the formation of this mucus layer is crucial as it avoid the invasion of the intestine by commensal bacteria. From 1982, it was shown that mucus secretion provided from goblet cells in the crypts of small intestine went through the parasympathetic neurotransmitters and histamine and resulted in an exocytosis of the compound (mucus) [86]. That was explained more recently that histamine and acetylcholine were mobilizing agents of calcium, and this regulation / decrease of intracellular Ca^{2+} induced the control of mucin exocytosis: stimulation of acetylcholine induced an increase in mucus secretion of goblet cells located in the small intestine [87]. Interestingly, the goblets cells in the colon did not respond to acetylcholine but to histamine, and so a histamine stimulation induced a colonic mucus secretion [88].

There are also some Paneth cells which are responsible of antimicrobial proteins to regulate the bacterial population. Both are primordial because the function of the mucus layer can be regulated through the inhibition of MUC2: knock-out mice to MUC2 were unenabled to secrete mucus layer anymore and showed a development of intestinal inflammation [89,90]. Furthermore, the stimulation of NF κ B induced the

dysfunction of goblet cells, causing a reduction of mucus layer, a bacterial translocation and so a severe colitis development [90,91].

As it was explained earlier, IL-10 is an anti-inflammatory cytokine, and one part of this property is due to its action on goblet cells: indeed, it prevents the protein misfolding and the endoplasmic reticulum stress in goblet cells, promoting the intestinal secretory cell function and the maintenance of mucosal barrier [92]. Moreover, IL-10-deficient mice showed a decrease of MUC2 production, leading to a permeable barrier to bacteria, inducing inflammation [93]. Some pro-inflammatory cytokines can also be involved in the stimulation of goblet cells and in mucus secretion, such as IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 and TNF α [94–97]. In 2015, *Birchenough et al* reviewed that there are various populations of goblet cells according to their locations, in the different sections of the intestine, and that these populations can be differently stimulated [98].

3.2. Mucus and bacterial regulation

The mucus layer recovering the intestinal epithelium is the first which encounter the bacteria, and more generally the microbiota. This microbiota is known to be very crucial and controlled in the organism, with about 10^{14} bacterial cells and mainly represented by these species: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Firmicutes* [99]. The microbiota is very sensitive to the environment, but also to the host: the maintenance of intestinal homeostasis is a way to protect from this sensitivity. In a specific and interesting manner, there are more *Firmicutes* in the mucus layer than in the intestinal lumen [100]. There are, of course, the mucus layer but also other actors such as enzymes, antimicrobial peptides, and immunologic contribution [101]. The mucus is known to be involved as an important carbohydrate supplier of the organism and especially to the microbiota, and this is important because it permits to feed the microorganisms as well as the yoghurt we can take for *Lactobacillus* [102].

The relation between mucus and microbiota is very close and consists in the colonization of the mucus by the bacteria. It induces the formation of two layers: the outer layer – permeable by bacteria – and the inner layer (lumen) – which is a coating and impermeable layer [87]. This organization provides a bacterial niche from the outer layer, where commensal bacteria can proliferate and use resources to growth [103].

The antimicrobial peptides secreted by the Paneth cells have a direct impact on the bacteria, by killing them, and opening a breach in the bacterial wall favorizing the bacterial translocation and inflammation phenomenon; moreover, it is possible to have enzymatic activity in the membrane which will attack bacteria [101]. The dysbiosis of the microbiota is also permitted by a deficiency of the immune system and particularly of immunoglobulin-A (IgA): it has been shown that secretory IgA limits the exposure of the epithelial wall to the bacteria. More precisely, a deficiency in IgA highlighted will damage the epithelium by a strong recruitment and activation of immune system [104,105].

More recently, it has been described that the NLRP6 inflammasome is also involved in the goblet cells function, as knock-out mice to NLRP6 showed an increase in bacterial growth and colonization [106]. Furthermore, we have earlier introduced MUC2, and it is important to note that a O-glycosylation of MUC2 also leads to a weaker mucus layer because of shorter glycoproteins composing the mucus: this phenomenon participates also to the dysbiosis of the microbiota, altering the adherence and colonization of bacteria to the mucus layer [107].

4. Modulation of intestinal immunity

This part is a short part focusing more particularly on two types of immune system modulators which are involved in the intestinal barrier regulation, and to complete previous information already presented in this review, but also by other reviewers [108].

4.1. Toll-Like-Receptors (TLR) family

The family of Toll-Like Receptors (TLR) is involved in the homeostasis promotion, helping the formation of the mucus layer. The TLR signaling is before all a question of balance: if a “normal” or “moderate” TLR signaling is indispensable for health homeostasis, an excessive signaling is pathological and source of intestinal inflammation [109]. TLR family is a part of pattern recognition receptors (PRR), in charge to intestinal innate immunity and to barrier function proteins expression. TLR adaptor protein MyD88 is a crucial cytoplasmic protein, as knock-out mice to MyD88 showed a decrease of immunoglobulin receptor regulation, a decrease of MUC2 expression and an increase of bacteria translocation, traducing an impairment of intestinal barrier functions [110]. Also, MyD88-deficient mice exerted higher

susceptibility to inflammation induction (by agents like dextran sulfate sodium, DSS) This deficiency is also a perturbation factor of environment, and especially about the gut microbiota with an increase in *Proteobacteria* and a decrease in *Bacteroidetes* [111].

The regulation and attenuation of toll-like receptors is due in the organism to the action of many inhibitors, such as Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR- γ), A20 and NOD2. As these inhibitors were already reviewed by *Shibolet and Podolsky* in 2007 [112], we just give some clues and updated information about these inhibitors.

4.2. TLR modulators

4.2.1. Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR- γ)

PPAR- γ was firstly discovered in 1993, it is a nuclear receptor which is involved in regulation of insulin resistance and is so activated by antidiabetic drugs such as thiazolidinedione [113]. This drug permitted to reduce intestinal lesions and inflammation and have so showed beneficial effects in prevention or treatment: it seems that it acts via a reduction of Th1 immune response and not through NF κ B pathway [114]. At the intestinal level, PPAR- γ is linked to colon cancer and intestinal inflammation, highlighting an interest in the study of the role of this receptor to intestinal barrier homeostasis [115,116]. Moreover, a supplementation in PPAR- γ and RXR (retinoid X receptor) showed beneficial effects on mice induced-colitis (increased survival rate, improved histological scores, decreased pro-inflammatory cytokines expression), but a modification in PPAR expression on heterozygous PPAR- $\gamma^{+/-}$ mice showed a higher inflammation induction [117]. In 2017, studies have shown that PPAR- γ has also an impact on the intestinal microbiota, [118,119]: bacterial metabolites modulate PPAR- γ -dependent transcriptional activity as *Roseburia hominis* or *Fusobacterium naviforme* which increased 5-fold PPAR- γ activity. It is not surprising as these two species are producers of butyrate, and that butyrate is responsible of gene regulation in intestinal epithelial cells [120]. The team of *Lu* in 2018 also showed that PPAR gamma is closely linked to TLR4, a member of TLR family: a deficiency of

TLR4 is linked to a decrease of PPAR expression, and the use of a PPAR agonist can reverse this effect [121].

4.2.2. A20

A20 is a cytoplasmic zinc finger protein which is involved after its stimulation by a pro-inflammatory cytokine (TNF, NF- κ B, IL-1). A20 is a crucial protective entity to inflammation, as its lack or inhibition leads to a exacerbate inflammation on A20-deficient mice. It is essential as it permits the de-ubiquitination of TRAF6 (tumor necrosis factor associated factor 6) to have a TLR signaling and without it, there is no TLR response termination [122,123]. More precisely, A20 is a negative regulator of TLR, and it was showed that its upregulation permitted the intestinal epithelial cell recovery and function, especially in HIV infection [124]. A20-homozygous deficient mice showed also an increased response to lipopolysaccharide-induced inflammation, due to macrophages which produced significantly more TNF [122]. This modulation of TLR-induced NF- κ B activation by A20 indicates that it is a promising way for future therapeutic innovations, and as A20 seems to be one of the gatekeepers of gut homeostasis. From 2016, some study like *Malcomson et al* are looking to the potential of A20-inducing drugs in inflammation diseases, to have anti-inflammatory actions [125].

4.2.3. NOD2/CARD15

NOD2 (nucleotide binding oligomerization domain 2), also called CARD15 (caspase recruitment domain family member 15) is known to be muted in intestinal pathologies like Crohn's disease: it seems that it is a frameshift mutation in NOD2 which is responsible with a higher susceptibility to Crohn's disease [126]. When it is linked to the muramyl peptides from the bacterial cell wall, it will induce the recruitment of IL-10, leading to a protection of the intestinal barrier (by a decrease of inflammation, particularly of TNF secretion). But, when NOD2 is muted, it permits the action of TNF leading to intestinal inflammation diseases such as inflammatory bowel diseases [127]. Moreover, it has been shown that NOD2 mutation leads to an activation in Rick/Rip2

pathway, which will later activate NF- κ B pathway, leading to the recruitment of pro-inflammatory cytokines (such as IL-1 β) and to autophagy [128]. At last, but not the least, the dysfunction of NOD2 induced an increased immune response and an increased bacterial translocation, and this breach of the intestinal barrier is particularly located at Peyer's patches [129]. There is also a modification of the microbiota composition, and this dysbiosis is characterized by an increase of *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*, and a decrease of *Firmicutes* [130–132].

5. Modulation by pharmacological molecules and potential innovative therapeutics

5.1. Pharmacological drugs on the market

Actual proposed treatments present low efficacy/cost ratio, leading to a necessity in the development of new research axis, for chronic treatments to prevent inflammatory recurrences (by maintenance of intestinal barrier integrity), and so to ameliorate quality of life of the patients touched by these diseases, reducing cancer development risk. Conventional actual treatments of IBDs included aminosalicylates, corticosteroids, antibiotics, and immunosuppressive agents which are necessarily administered for long periods and consequently, can induce adverse effects [133].

Moreover, last purposed innovative therapeutics, as the use of anti-tumor necrosis factor (anti-TNF) showed strong anti-inflammatory effects but have for disadvantage a loss of response for a long period of treatment. Only a third of patients showed a total clinic remission after a year of treatment. The identification of new targets, of new agents produced naturally by the healthy organism, could open new therapeutic perspectives for these pathologies.

5.2. Nitric oxide and role at the intestinal level

During inflammation, nitric oxide (NO) plays a crucial and paradoxical role, discussed in many studies: in many tissues and in many circumstances, NO acts simultaneously in physiologic processes as in pathologic processes. It is the same at the gastro-intestinal tract, where NO intervenes as an important mediator in the preservation and repairing of the mucosa but contributes also directly to damages observed in digestive pathologies, by a pro-inflammatory action. For example, an excessive NO production is correlated with a prolonged colon inflammation, and particularly at epithelial cells closely to inflammation sites [134]. This inflammatory effect is due to an increased peroxynitrites (ONOO⁻) activity, which was measured by nitrotyrosine quantification in inflamed tissues [135,136].

However, NO has various beneficial effects on gastro-intestinal functions: indeed, NO is the most abundant neurotransmitter in the gastro-intestinal tract, allowing to

control gastric motility. It allows also to control intestinal mucus secretion, and to ameliorate absorption in healthy conditions (by an opening of potassium channels of enterocytes localized at the basolateral level [137]).

To have beneficial effects of nitric oxide, many points are required: low concentrations of NO should be brought (nM to μ M) and, in a poorly engaged environment in the inflammation. It permits to have a usable NO by anti-inflammatory actors» (the oxidative balance should not be disturbed) [137]. NO supplementation at gaseous state is very difficult because of its very short half-life (few seconds) and for its very high reactivity: it reacts very rapidly with all the elements in an uncontrollable way [138]. The access of NO to the intestine is very difficult to follow, especially because there is difficult to distinguish between endogenous production by NO synthase enzymes activities (three isoforms, endothelial NOS = eNOS, neuronal NOS = nNOS and inducible NOS = iNOS). Moreover, NO is rapidly metabolized and transformed to other species: nitrite ions (NO_2^-) and nitrate ions (NO_3^-), but also some S-nitrosothiols (or RSNOs).

Indeed, because NO is not usable under its radical form, there are developed some nitric oxide donor, to increase the half-life of NO. Some molecules are actually used in therapeutic (in cardiovascular disease for example, [139]) and are also studied in a context of gastro-intestinal use since the 1990s to promote beneficial effects of NO (*Table 1 in appendices*). As a part of these NO donors, there are developed some S-nitrosothiols, and from this family there is the famous S-nitrosoglutathione (GSNO).

5.3. Nitric oxide donors

S-nitrosothiols (RSNOs) represent a compounds class particularly interesting for a treatment of many chronic inflammatory diseases (cerebrovascular, cardiovascular, pulmonary, and intestinal) associated to important disturbances of physiological barriers. Indeed, when NO is combined with a thiol group to form a RSNO, its half-life is increased (from few seconds to many hours) and NO is so delivered to cells and tissues in a controlled manner. It is even more interesting in an inflammatory context, when the RSNO is an antioxidant molecule naturally produced by the organism, for example the S-nitrosoglutathione (GSNO).

This is a derived compound from the most abundant thiol at the intracellular level, the glutathione (GSH). The latter is a tripeptide (gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine) which intervenes in RedOx balance by the glutathione/reduced glutathione couple (GSH/GSSG).

5.4. Therapeutic potential of GSNO

GSNO has a real interest in therapeutic as a nitric oxide donor: indeed, it has already been studied in more than 20 clinical trials, with a special targeting in cardiovascular diseases. It has also been shown that secreted GSNO from enteric glial cells, after vagus nerve stimulation, can prevent an inflammatory event at the intestinal level and prevent barrier integrity [21,140] through many actions.

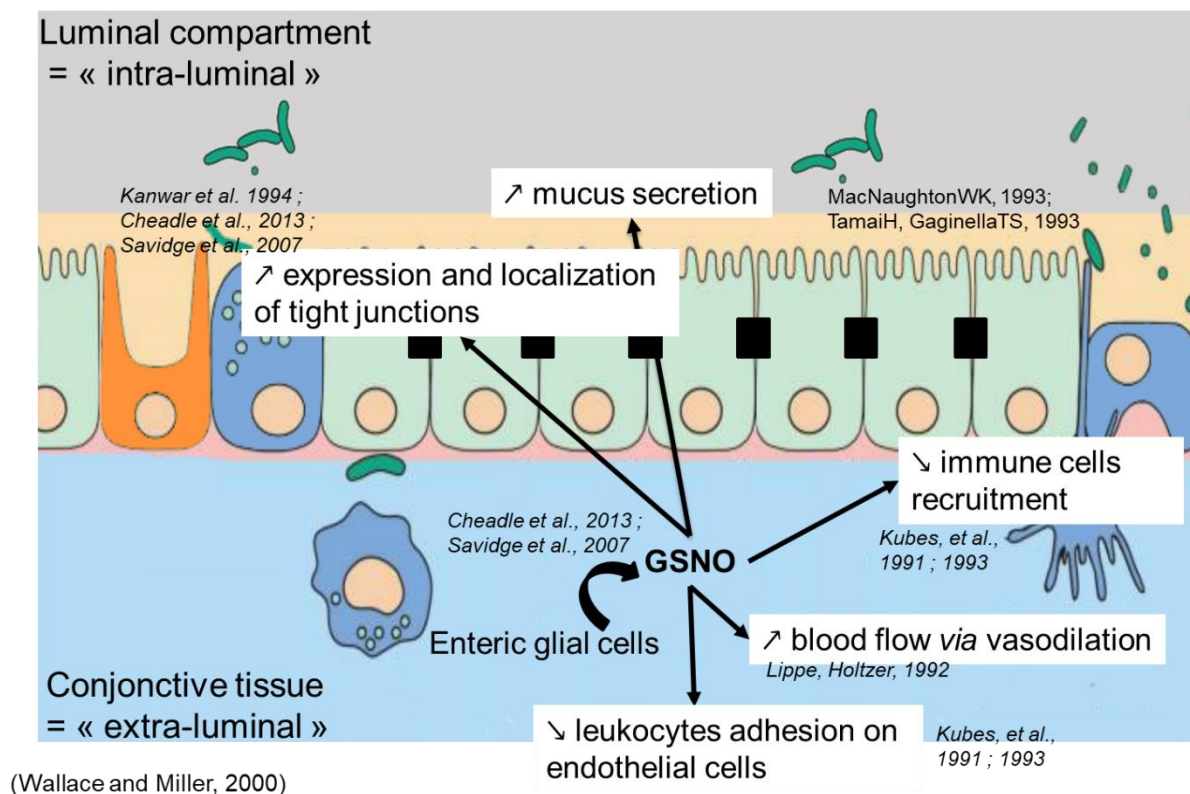


Figure 5: Beneficial effects of the endogenously produced S-nitrosoglutathione on the intestinal barrier

Concerning these actions of GSNO: after its production by enteric glial cells [21,140], it can modulate several actors that we described earlier in this review. For example, nitric oxide can increase the expression and localization of tight junctions [21,140,141]. No is also able to stimulate goblet cells, and so to increase the mucus

secretion, inducing an increase in mucus layer thickness [142,143]. It induces an increase of blood flow by its vasodilation effect [144], it can reduce immune cells recruitments and decrease leukocyte adhesion on endothelial cells [145,146].

More recently, intravenous administration of GSNO (1 mg/kg) to sepsis rats (model induced by intravenous injection of lipopolysaccharides, LPS) permits to attenuate the inflammatory response at the intestinal level, and to reduce epithelioma damages by inhibition of the NF- κ B pathway [147]. This relation of GSNO with NF- κ B pathway was also highlighted in a model of rat sepsis in 2018 by *Turan et al*, by reducing NF- κ B expression, and inhibiting inflammatory response and oxidative stress [148]. All these beneficial effects of GSNO reinforce the idea to consider GSNO as a drug candidate, for the prevention of inflammation recurrences in Inflammatory Bowel Diseases (IBD).

6. Conclusion and perspectives

The maintenance of the intestinal barrier homeostasis is crucial for the health, but it is depending on a lot of factors, environmental factors but also a lot of intestinal actors in the organism. As we have seen with this review, the maintenance of the barrier is a very complex result of a multifactorial and synergic work between many actors, and it is harder as the barrier is permanently under attack of bacteria, stress, ...

Despite this difficulty, we have seen that these actors could also be modulated in several way and it is the key point, as these modulation ways are potential therapeutic innovative strategies. If a lot of studies have already been done, a lot remains to be done, for a better understanding of the physiopathology of intestinal diseases like inflammatory bowel disease, and to develop new therapeutics for improving patient quality of life.

7. Appendices

Table 1: The actual use of different nitric oxide donors in therapeutic

<i>Compound</i>	<i>Study/specie</i>	<i>Location</i>	<i>Concentration / dose</i>	<i>Administration route</i>	<i>Observations</i>	<i>References</i>
GSNO	<i>In vivo</i> / Healthy rabbit	Intestine	6 mM	Intraperitoneal	Reinforcement of intestinal barrier	[149]
GSNO	<i>In vivo</i> / Transgenic mice	Intestine	10 mg/kg/day	Intraperitoneal	Reinforcement of intestinal barrier	[21]
NACNO	<i>Ex vivo</i> / Healthy rat	Stomach	600 μ M / 12 mM	Gastric mucosa incubation	Increase of blood flow in gastric mucosa	[150]
NO-NSAIDs (NO-diclofenac; NO-naproxen; NO-aspirin, ...)	<i>In vivo</i> / Rat	Stomach; intestine	-	-	Potentiated effect of NSAIDs; Decrease of intestinal mucosa damages: <ul style="list-style-type: none"> - Decrease of leukocytes infiltration - Increase of mucus secretion - Maintenance of local blood flow 	[151,152]; Numerous patents

Gaseous NO and acidified NaNO ₂	<i>In vivo</i> / Cat	Intestine	-	Intravenous	Decrease of neutrophils adhesion at mesenteric endothelium	[153]
SNAP	<i>In vitro</i> / Caco-2 (human adenocarcinoma)	-	5 mM	-	Epithelial intestinal hyperpermeability	[135]
SNAP	<i>In situ</i> / Healthy rat	Intestine	2 / 4 / 6 mg/mL	Closed loop model	Increase of intestinal absorption	[154]
SNAP	<i>Ex vivo</i> / Healthy rat <i>In vitro</i> / IEC-6 (enterocytes monolayer)	Intestine	1 / 2 mM	-	Increase of bacterial translocation through the intestinal membrane	[155]
SNAP	<i>In vivo</i> / Rat	Intestine	20 µg/kg/h	Intravenous	Avoid the increase of P-selectin on neutrophils membrane Inhibits endothelium dysfunction	[156]
SNAP; ISDN	<i>In vivo</i> / Healthy rat	Stomach	0,1-1 mM 0,3 mM	Gastric lumen instillation	Increase of mucus layer thickness	[157]
Trinitrin	Clinical trial (23 women, from 16 to 54 yo.)	Rectal	Ointment based on trinitrin 0,2%, 2x/day	Apply on the skin	Better wound healing of rectal fissures associated to Crohn's disease	[158]

8. Acknowledgements

Authors are grateful to the colleagues of EA3452 CITHEFOR laboratory, who took time for correcting the English style of the present review.

9. References

- [1] Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003;422:37–44. doi:10.1038/nature01451.
- [2] Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology* 2004;4:953–64. doi:10.1038/nri1499.
- [3] Kökten T, Hansmann F, Melhem H, Peyrin-Biroulet L. Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). *HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale* 2016. doi:10.4267/2042/60106.
- [4] Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, Fioramonti J, Eutamene H, Bueno L. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol* 2005;167:1071–9. doi:10.1016/S0002-9440(10)61196-0.
- [5] Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases: *Inflammatory Bowel Diseases* 2011;17:362–81. doi:10.1002/ibd.21403.
- [6] Fletcher SJ, Rappoport JZ. The role of vesicle trafficking in epithelial cell motility. *Biochem Soc Trans* 2009;37:1072–6. doi:10.1042/BST0371072.
- [7] Bauer H, Stelzhammer W, Fuchs R, Weiger TM, Danninger C, Probst G, et al. Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. *Exp Cell Res* 1999;250:434–8. doi:10.1006/excr.1999.4558.
- [8] Turksen K, Troy T-C. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 2004;117:2435–47. doi:10.1242/jcs.01235.
- [9] Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 2004;117:19–29. doi:10.1242/jcs.00930.
- [10] Bazzoni G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:525–30.
- [11] Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 1994;127:1617–26.
- [12] Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:511–6.
- [13] Ebnet K. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem Cell Biol* 2008;130:1–20. doi:10.1007/s00418-008-0418-7.
- [14] Kim YS, Ho SB. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Current Gastroenterology Reports* 2010;12:319–30. doi:10.1007/s11894-010-0131-2.
- [15] Hansson GC. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Current Opinion in Microbiology* 2012;15:57–62. doi:10.1016/j.mib.2011.11.002.
- [16] Elderman M, Sovran B, Hugenholtz F, Graversen K, Huijskes M, Houtsma E, et al. The effect of age on the intestinal mucus thickness, microbiota composition

and immunity in relation to sex in mice. *PLOS ONE* 2017;12:e0184274. doi:10.1371/journal.pone.0184274.

- [17] Cornes JS. Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. *Gut* 1965;6:225–9.
- [18] Stead RH, Dixon MF, Bramwell NH, Riddell RH, Bienenstock J. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* 1989;97:575–85.
- [19] Ichikawa S, Eda N, Uchino S. Close association of peptidergic nerves with lymphocytes in canine and monkey ileal villi. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1992;69:199–207.
- [20] Vulchanova L, Casey M, Crabb G, Kennedy W, Brown D. Anatomical evidence for enteric neuroimmune interactions in Peyer's patches. *Journal of Neuroimmunology* 2007;185:64–74. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.01.014.
- [21] Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, et al. Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 2007;132:1344–58. doi:10.1053/j.gastro.2007.01.051.
- [22] Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biology* 2009;10:235. doi:10.1186/gb-2009-10-8-235.
- [23] Krämer F, White K, Kubbies M, Swisshelm K, Weber BH. Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum Genet* 2000;107:249–56.
- [24] Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 2003;22:2021–33. doi:10.1038/sj.onc.1206199.
- [25] Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 2004;164:1627–33. doi:10.1016/S0002-9440(10)63721-2.
- [26] Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 2006;126:741–54. doi:10.1016/j.cell.2006.06.043.
- [27] Nomme J, Antanasijevic A, Caffrey M, Van Itallie CM, Anderson JM, Fanning AS, et al. Structural Basis of a Key Factor Regulating the Affinity between the Zonula Occludens First PDZ Domain and Claudins. *Journal of Biological Chemistry* 2015;290:16595–606. doi:10.1074/jbc.M115.646695.
- [28] Krug SM, Günzel D, Conrad MP, Lee I-FM, Amasheh S, Fromm M, et al. Charge-selective claudin channels: Charge-selective claudin channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012;1257:20–8. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06555.x.
- [29] Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2002;283:C142-147. doi:10.1152/ajpcell.00038.2002.
- [30] Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C, et al. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *The FASEB Journal* 2008;22:146–58. doi:10.1096/fj.07-8319com.
- [31] Van Itallie CM, Gambling TM, Carson JL, Anderson JM. Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci* 2005;118:1427–36. doi:10.1242/jcs.01735.
- [32] Van Itallie CM, Tietgens AJ, LoGrande K, Aponte A, Gucek M, Anderson JM. Phosphorylation of claudin-2 on serine 208 promotes membrane retention and

- reduces trafficking to lysosomes. *Journal of Cell Science* 2012;125:4902–12. doi:10.1242/jcs.111237.
- [33] Banan A, Zhang LJ, Shaikh M, Fields JZ, Choudhary S, Forsyth CB, et al. theta Isoform of protein kinase C alters barrier function in intestinal epithelium through modulation of distinct claudin isotypes: a novel mechanism for regulation of permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:962–82. doi:10.1124/jpet.104.083428.
- [34] D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2005;280:26233–40. doi:10.1074/jbc.M502003200.
- [35] Turner JR, Angle JM, Black ED, Joyal JL, Sacks DB, Madara JL. PKC-dependent regulation of transepithelial resistance: roles of MLC and MLC kinase. *Am J Physiol* 1999;277:C554-562. doi:10.1152/ajpcell.1999.277.3.C554.
- [36] Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest* 2005;85:1139–62. doi:10.1038/labinvest.3700316.
- [37] Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, Fromm A, Amasheh S, Hillenbrand B, et al. TNF α up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell and Tissue Research* 2009;336:67–77. doi:10.1007/s00441-009-0751-8.
- [38] Amasheh M, Grotjohann I, Amasheh S, Fromm A, Söderholm JD, Zeitz M, et al. Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: a novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:1226–35. doi:10.1080/00365520903131973.
- [39] Luettig J, Rosenthal R, Barmeyer C, Schulzke JD. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers* 2015;3:e977176. doi:10.4161/21688370.2014.977176.
- [40] Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbitt BA, et al. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 2007;204:3067–76. doi:10.1084/jem.20071416.
- [41] Luissint A-C, Williams HC, Kim W, Flemming S, Azcutia V, Hilgarth RS, et al. Macrophage-dependent neutrophil recruitment is impaired under conditions of increased intestinal permeability in JAM-A-deficient mice. *Mucosal Immunology* 2019. doi:10.1038/s41385-019-0143-7.
- [42] Nevado R, Forcén R, Layunta E, Murillo MD, Grasa L. Neomycin and bacitracin reduce the intestinal permeability in mice and increase the expression of some tight-junction proteins. *Rev Esp Enferm Dig* 2015;107:672–6. doi:10.17235/reed.2015.3868/2015.
- [43] Fan S, Weight CM, Luissint A-C, Hilgarth RS, Brazil JC, Eitel M, et al. Role of JAM-A tyrosine phosphorylation in epithelial barrier dysfunction during intestinal inflammation. *Mol Biol Cell* 2019;mbcE18080531. doi:10.1091/mbc.E18-08-0531.
- [44] Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY. Mechanism of IL-1 β -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2008;180:5653–61.
- [45] Turner JR, Rill BK, Carlson SL, Carnes D, Kerner R, Mrsny RJ, et al. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol* 1997;273:C1378-1385.
- [46] Anderberg EK, Lindmark T, Artursson P. Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route. *Pharm Res* 1993;10:857–64.

- [47] Hayashi M, Tomita M. Mechanistic Analysis for Drug Permeation Through Intestinal Membrane. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2007;22:67–77. doi:10.2133/dmpk.22.67.
- [48] Bergmann H, Rogoll D, Scheppach W, Melcher R, Richling E. The Ussing type chamber model to study the intestinal transport and modulation of specific tight-junction genes using a colonic cell line. *Molecular Nutrition & Food Research* 2009;53:1211–25. doi:10.1002/mnfr.200800498.
- [49] Krug SM, Amasheh M, Dittmann I, Christoffel I, Fromm M, Amasheh S. Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials* 2013;34:275–82. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.051.
- [50] Brayden DJ, Maher S, Bahar B, Walsh E. Sodium caprate-induced increases in intestinal permeability and epithelial damage are prevented by misoprostol. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015;94:194–206. doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.013.
- [51] Chico LK, Van Eldik LJ, Watterson DM. Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 2009;8:892–909. doi:10.1038/nrd2999.
- [52] Fujita Y, Yamashita T. Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system. *Frontiers in Neuroscience* 2014;8. doi:10.3389/fnins.2014.00338.
- [53] Feng Y, LoGrasso PV, Defert O, Li R. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *Journal of Medicinal Chemistry* 2016;59:2269–300. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00683.
- [54] Huang Y, Xiao S, Jiang Q. Role of Rho kinase signal pathway in inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:3089–97.
- [55] Elamin E, Masclee A, Dekker J, Jonkers D. Ethanol disrupts intestinal epithelial tight junction integrity through intracellular calcium-mediated Rho/ROCK activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2014;306:G677–85. doi:10.1152/ajpgi.00236.2013.
- [56] Petersen N, Frimurer TM, Terndrup Pedersen M, Egerod KL, Wewer Albrechtsen NJ, Holst JJ, et al. Inhibiting RHOA Signaling in Mice Increases Glucose Tolerance and Numbers of Enteroendocrine and Other Secretory Cells in the Intestine. *Gastroenterology* 2018;155:1164-1176.e2. doi:10.1053/j.gastro.2018.06.039.
- [57] Wang Y, Wang X, Yang W, Zhao X, Zhang R. Effect of Simvastatin on the Intestinal Rho/ROCK Signaling Pathway in Rats With Sepsis. *Journal of Surgical Research* 2018;232:531–8. doi:10.1016/j.jss.2018.07.016.
- [58] Li Z, Gao M, Yang B, Zhang H, Wang K, Liu Z, et al. Naringin attenuates MLC phosphorylation and NF- κ B activation to protect sepsis-induced intestinal injury via RhoA/ROCK pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;103:50–8. doi:10.1016/j.biopha.2018.03.163.
- [59] Zolotarevsky Y, Hecht G, Koutsouris A, Gonzalez DE, Quan C, Tom J, et al. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterology* 2002;123:163–72.
- [60] Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 2005;166:409–19.
- [61] Al-Sadi R, Guo S, Ye D, Rawat M, Ma TY. TNF- α Modulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by NIK/IKK- α Axis Activation of the Canonical NF- κ B Pathway. *The American Journal of Pathology* 2016;186:1151–65. doi:10.1016/j.ajpath.2015.12.016.

- [62] Schwarz BT, Wang F, Shen L, Clayburgh DR, Su L, Wang Y, et al. LIGHT Signals Directly to Intestinal Epithelia to Cause Barrier Dysfunction via Cytoskeletal and Endocytic Mechanisms. *Gastroenterology* 2007;132:2383–94. doi:10.1053/j.gastro.2007.02.052.
- [63] Wu L-L, Peng W-H, Kuo W-T, Huang C-Y, Ni Y-H, Lu K-S, et al. Commensal bacterial endocytosis in epithelial cells is dependent on myosin light chain kinase-activated brush border fanning by interferon- γ . *Am J Pathol* 2014;184:2260–74. doi:10.1016/j.ajpath.2014.05.003.
- [64] Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, Hopkins AM, Parkos CA, Nusrat A. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J* 2005;19:923–33. doi:10.1096/fj.04-3260com.
- [65] Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994;8:1314–25.
- [66] Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, Shinoda M, Haruta J, Kuroiwa A, et al. Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Dig Dis Sci* 1995;40:949–59.
- [67] Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) Regulates Claudin-2 Expression and Tight Junction Permeability in Intestinal Epithelium. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:31263–71. doi:10.1074/jbc.M111.238147.
- [68] Xiao Y-T, Yan W-H, Cao Y, Yan J-K, Cai W. Neutralization of IL-6 and TNF- α ameliorates intestinal permeability in DSS-induced colitis. *Cytokine* 2016;83:189–92. doi:10.1016/j.cyto.2016.04.012.
- [69] Wang Y, Mumm JB, Herbst R, Kolbeck R, Wang Y. IL-22 Increases Permeability of Intestinal Epithelial Tight Junctions by Enhancing Claudin-2 Expression. *The Journal of Immunology* 2017;199:3316–25. doi:10.4049/jimmunol.1700152.
- [70] Furfaro F, Gilardi D, Allocca M, Cicerone C, Correale C, Fiorino G, et al. IL-23 Blockade for Crohn's disease: next generation of anti-cytokine therapy. *Expert Review of Clinical Immunology* 2017;13:457–67. doi:10.1080/1744666X.2017.1279055.
- [71] Neurath MF. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2019;45:1–8. doi:10.1016/j.cytogfr.2018.12.002.
- [72] Cătană C-S, Berindan Neagoe I, Cozma V, Magdaş C, Tăbăran F, Dumitraşcu DL. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015;21:5823–30. doi:10.3748/wjg.v21.i19.5823.
- [73] Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology* 2010;10:170–81. doi:10.1038/nri2711.
- [74] Ochi T, Feng Y, Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Kuffa P, Atarashi K, et al. Diet-dependent, microbiota-independent regulation of IL-10-producing lamina propria macrophages in the small intestine. *Scientific Reports* 2016;6. doi:10.1038/srep27634.
- [75] Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 2013;64:477–85. doi:10.1016/j.cyto.2013.07.022.
- [76] Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes & Infections* 2013;2:1–5. doi:10.1038/emi.2013.58.
- [77] Denning TL, Wang Y, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature Immunology* 2007;8:1086–94. doi:10.1038/ni1511.
- [78] Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PDR, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-

- blind placebo-controlled trial. *Gut* 2012;61:1693–700. doi:10.1136/gutjnl-2011-301668.
- [79] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;450:566–9. doi:10.1038/nature06306.
- [80] Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 2014;507:366–70. doi:10.1038/nature12979.
- [81] Wang Y, Mao Y, Zhang J, Shi G, Cheng L, Lin Y, et al. IL-35 recombinant protein reverses inflammatory bowel disease and psoriasis through regulation of inflammatory cytokines and immune cells. *J Cell Mol Med* 2018;22:1014–25. doi:10.1111/jcmm.13428.
- [82] Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, Ivanov II, Min R, Victora GD, et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature* 2008;453:236–40. doi:10.1038/nature06878.
- [83] Howe KL, Lorentz RJ, Assa A, Pinnell LJ, Johnson-Henry KC, Sherman PM. Transforming Growth Factor- β 1 Protects Against Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction Caused By Hypoxia-Reoxygenation: *Shock* 2015;43:483–9. doi:10.1097/SHK.0000000000000333.
- [84] Bauché D, Marie JC. Transforming growth factor β : a master regulator of the gut microbiota and immune cell interactions. *Clinical & Translational Immunology* 2017;6:e136. doi:10.1038/cti.2017.9.
- [85] Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:19–33. doi:10.1038/nrm3721.
- [86] Neutra MR, O'Malley LJ, Specian RD. Regulation of intestinal goblet cell secretion. II. A survey of potential secretagogues. *Am J Physiol* 1982;242:G380-387. doi:10.1152/ajpgi.1982.242.4.G380.
- [87] Gustafsson JK, Ermund A, Johansson MEV, Schütte A, Hansson GC, Sjövall H. An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G430-438. doi:10.1152/ajpgi.00405.2011.
- [88] Halm DR, Halm ST. Secretagogue response of goblet cells and columnar cells in human colonic crypts. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2000;278:C212-233. doi:10.1152/ajpcell.2000.278.1.C212.
- [89] Vereecke L, Vieira-Silva S, Billiet T, van Es JH, Mc Guire C, Slowicka K, et al. A20 controls intestinal homeostasis through cell-specific activities. *Nature Communications* 2014;5. doi:10.1038/ncomms6103.
- [90] Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology* 2006;131:117–29. doi:10.1053/j.gastro.2006.04.020.
- [91] Lu P, Burger-van Paassen N, van der Sluis M, Witte-Bouma J, Kerckaert J-P, van Goudoever JB, et al. Colonic gene expression patterns of mucin muc2 knockout mice reveal various phases in colitis development1: *Inflammatory Bowel Diseases* 2011;17:2047–57. doi:10.1002/ibd.21592.
- [92] Hasnain SZ, Tauro S, Das I, Tong H, Chen AC –H., Jeffery PL, et al. IL-10 Promotes Production of Intestinal Mucus by Suppressing Protein Misfolding and Endoplasmic Reticulum Stress in Goblet Cells. *Gastroenterology* 2013;144:357-368.e9. doi:10.1053/j.gastro.2012.10.043.
- [93] van der Sluis M, Bouma J, Vincent A, Velcich A, Carraway KL, Büller HA, et al. Combined defects in epithelial and immunoregulatory factors exacerbate the

- pathogenesis of inflammation: mucin 2-interleukin 10-deficient mice. *Lab Invest* 2008;88:634–42. doi:10.1038/labinvest.2008.28.
- [94] Plaisancié P, Barcelo A, Moro F, Claustre J, Chayvialle JA, Cuber JC. Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am J Physiol* 1998;275:G1073-1084. doi:10.1152/ajpgi.1998.275.5.G1073.
- [95] Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999;162:6233–7.
- [96] Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989;245:308–10.
- [97] Enss ML, Cornberg M, Wagner S, Gebert A, Henrichs M, Eisenblätter R, et al. Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. *Inflamm Res* 2000;49:162–9. doi:10.1007/s000110050576.
- [98] Birchenough GMH, Johansson ME, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology* 2015;8:712–9. doi:10.1038/mi.2015.32.
- [99] Liévin-Le Moal V, Servin AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:315–37. doi:10.1128/CMR.19.2.315-337.2006.
- [100] Van den Abbeele P, Belzer C, Goossens M, Kleerebezem M, De Vos WM, Thas O, et al. Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *The ISME Journal* 2013;7:949–61. doi:10.1038/ismej.2012.158.
- [101] Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* 2010;10:159–69. doi:10.1038/nri2710.
- [102] Arike L, Hansson GC. The Densely O-Glycosylated MUC2 Mucin Protects the Intestine and Provides Food for the Commensal Bacteria. *J Mol Biol* 2016;428:3221–9. doi:10.1016/j.jmb.2016.02.010.
- [103] Li H, Limenitakis JP, Fuhrer T, Geuking MB, Lawson MA, Wyss M, et al. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nature Communications* 2015;6. doi:10.1038/ncomms9292.
- [104] Rogier E, Frantz A, Bruno M, Kaetzel C. Secretory IgA is Concentrated in the Outer Layer of Colonic Mucus along with Gut Bacteria. *Pathogens* 2014;3:390–403. doi:10.3390/pathogens3020390.
- [105] Suzuki K, Meek B, Doi Y, Muramatsu M, Chiba T, Honjo T, et al. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;101:1981–6. doi:10.1073/pnas.0307317101.
- [106] Wlodarska M, Thaiss CA, Nowarski R, Henao-Mejia J, Zhang J-P, Brown EM, et al. NLRP6 Inflammasome Orchestrates the Colonic Host-Microbial Interface by Regulating Goblet Cell Mucus Secretion. *Cell* 2014;156:1045–59. doi:10.1016/j.cell.2014.01.026.
- [107] Vigsnaes LK, van den Abbeele P, Sulek K, Frandsen HL, Steenholdt C, Brynskov J, et al. Microbiotas from UC patients display altered metabolism and reduced ability of LAB to colonize mucus. *Sci Rep* 2013;3:1110. doi:10.1038/srep01110.
- [108] Johansson MEV, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews Immunology* 2016;16:639–49. doi:10.1038/nri.2016.88.

- [109] Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1583–97. doi:10.1002/ibd.21282.
- [110] Frantz AL, Rogier EW, Weber CR, Shen L, Cohen DA, Fenton LA, et al. Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2 and antibacterial peptides. *Mucosal Immunology* 2012;5:501–12. doi:10.1038/mi.2012.23.
- [111] Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell* 2004;118:229–41. doi:10.1016/j.cell.2004.07.002.
- [112] Shibolet O, Podolsky DK. TLRs in the Gut.IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007;292:G1469–73. doi:10.1152/ajpgi.00531.2006.
- [113] Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995;270:12953–6.
- [114] Schaefer KL, Denevich S, Ma C, Cooley SR, Nakajima A, Wada K, et al. Intestinal Antiinflammatory Effects of Thiazolidinedione Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Ligands on T Helper Type 1 Chemokine Regulation Include Nontranscriptional Control Mechanisms: Inflammatory Bowel Diseases 2005;11:244–52. doi:10.1097/01.MIB.0000160770.94199.9b.
- [115] Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, et al. Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nat Med* 1998;4:1058–61. doi:10.1038/2042.
- [116] Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, et al. A novel therapy for colitis utilizing PPAR- γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:383–9. doi:10.1172/JCI7145.
- [117] Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, et al. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001;193:827–38.
- [118] Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, et al. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* 2017;357:570–5. doi:10.1126/science.aam9949.
- [119] Nepelska M, de Wouters T, Jacouton E, Béguet-Crespel F, Lapaque N, Doré J, et al. Commensal gut bacteria modulate phosphorylation-dependent PPAR γ transcriptional activity in human intestinal epithelial cells. *Scientific Reports* 2017;7. doi:10.1038/srep43199.
- [120] Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O’Connell TM, Bunger MK, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab* 2011;13:517–26. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.018.
- [121] Lu P, Sodhi CP, Yamaguchi Y, Jia H, Prindle T, Fulton WB, et al. Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 prevents metabolic syndrome by regulating interactions between microbes and intestinal epithelial cells in mice. *Mucosal Immunology* 2018;11:727–40. doi:10.1038/mi.2017.114.
- [122] Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad R-C, Wheeler MT, Tsui C, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature Immunology* 2004;5:1052–60. doi:10.1038/ni1110.
- [123] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Seminars in Immunology* 2007;19:24–32. doi:10.1016/j.smim.2006.12.004.

- [124] Chitre AS, Kattah MG, Rosli YY, Pao M, Deswal M, Deeks SG, et al. A20 upregulation during treated HIV disease is associated with intestinal epithelial cell recovery and function. *PLOS Pathogens* 2018;14:e1006806. doi:10.1371/journal.ppat.1006806.
- [125] Malcomson B, Wilson H, Veglia E, Thillaiyampalam G, Barsden R, Donegan S, et al. Connectivity mapping (ssCMap) to predict A20-inducing drugs and their antiinflammatory action in cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016;113:E3725–34. doi:10.1073/pnas.1520289113.
- [126] Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603–6. doi:10.1038/35079114.
- [127] Buhner S. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006;55:342–7. doi:10.1136/gut.2005.065557.
- [128] Al Nabhani Z, Dietrich G, Hugot J-P, Barreau F. Nod2: The intestinal gate keeper. *PLOS Pathogens* 2017;13:e1006177. doi:10.1371/journal.ppat.1006177.
- [129] Barreau F, Meinzer U, Chareyre F, Berrebi D, Niwa-Kawakita M, Dussailant M, et al. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS ONE* 2007;2:e523. doi:10.1371/journal.pone.0000523.
- [130] Rehman A, Sina C, Gavrilova O, Häsler R, Ott S, Baines JF, et al. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011;60:1354–62. doi:10.1136/gut.2010.216259.
- [131] Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, et al. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:179–84. doi:10.1002/ibd.21339.
- [132] Li E, Hamm CM, Gulati AS, Sartor RB, Chen H, Wu X, et al. Inflammatory bowel diseases phenotype, *C. difficile* and NOD2 genotype are associated with shifts in human ileum associated microbial composition. *PLoS ONE* 2012;7:e26284. doi:10.1371/journal.pone.0026284.
- [133] Cars T, Wettermark B, Löfberg R, Eriksson I, Sundström J, Lördal M. Healthcare Utilisation and Drug Treatment in a Large Cohort of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis* 2016;10:556–65. doi:10.1093/ecco-jcc/jjv243.
- [134] Kolios G, Valatas V, Ward SG. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* 2004;113:427–37. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01984.x.
- [135] Menconi MJ, Unno N, Smith M, Aguirre DE, Fink MP. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1998;1425:189–203.
- [136] Tepperman BL, Whittel BJR. Physiological and Pathophysiological Roles of Nitric Oxide in Gastrointestinal Function. *Nitric Oxide*, Elsevier; 2000, p. 725–31.
- [137] Kochar NI, Chandewal AV, Bakal RL, Kochar PN. Nitric Oxide and the Gastrointestinal Tract. *International Journal of Pharmacology* 2011;7:31–9. doi:10.3923/ijp.2011.31.39.
- [138] Dattilo JB, Makhoul RG. The Role of Nitric Oxide in Vascular Biology and Pathobiology. *Annals of Vascular Surgery* 1997;11:307–14. doi:10.1007/s100169900052.
- [139] Parent M, Dupuis F, Maincent P, Vigneron C, Leroy P, Boudier A. Quel avenir en thérapeutique cardiovasculaire pour le monoxyde d'azote et ses dérivés ? *Annales Pharmaceutiques Françaises* 2013;71:84–94. doi:10.1016/j.pharma.2012.12.004.

- [140] Cheadle GA, Costantini TW, Lopez N, Bansal V, Eliceiri BP, Coimbra R. Enteric Glia Cells Attenuate Cytomix-Induced Intestinal Epithelial Barrier Breakdown. *PLoS ONE* 2013;8:e69042. doi:10.1371/journal.pone.0069042.
- [141] Kanwar S, Wallace JL, Befus D, Kubes P. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1994;266:G222–9. doi:10.1152/ajpgi.1994.266.2.G222.
- [142] MacNaughton WK. Nitric oxide-donating compounds stimulate electrolyte transport in the guinea pig intestine in vitro. *Life Sci* 1993;53:585–93.
- [143] Tamai H, Gaginella TS. Direct evidence for nitric oxide stimulation of electrolyte secretion in the rat colon. *Free Radic Res Commun* 1993;19:229–39.
- [144] Lippe IT, Holzer P. Participation of endothelium-derived nitric oxide but not prostacyclin in the gastric mucosal hyperaemia due to acid back-diffusion. *Br J Pharmacol* 1992;105:708–14.
- [145] Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651–5.
- [146] Kubes P, Kanwar S, Niu XF, Gaboury JP. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J* 1993;7:1293–9.
- [147] Li Z, Zhang X, Zhou H, Liu W, Li J. Exogenous S-nitrosoglutathione attenuates inflammatory response and intestinal epithelial barrier injury in endotoxemic rats: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 2016;80:977–84. doi:10.1097/TA.0000000000001008.
- [148] Turan I, Sayan Ozacmak H, Ozacmak VH, Barut F, Ozacmak ID. The effects of S-nitrosoglutathione on intestinal ischemia reperfusion injury and acute lung injury in rats: Roles of oxidative stress and NF- κ B. *Tissue and Cell* 2018;52:35–41. doi:10.1016/j.tice.2018.03.012.
- [149] Flamant M, Aubert P, Rolli-Derkinderen M, Bourreille A, Neunlist MR, Mahe MM, et al. Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* 2011;60:473–84. doi:10.1136/gut.2010.229237.
- [150] de Souza G, Taladriz-Blanco P, Velloso L, de Oliveira M. Nitric Oxide Released from Luminal S-Nitroso-N-Acetylcysteine Increases Gastric Mucosal Blood Flow. *Molecules* 2015;20:4109–23. doi:10.3390/molecules20034109.
- [151] Wallace JL, Elliott SN, Del Soldato P, McKnight W, Sannicola F, Cirino G. Gastrointestinal-sparing anti-inflammatory drugs: The development of nitric oxide-releasing NSAIDs. *Drug Development Research* 1997;42:144–9. doi:10.1002/(SICI)1098-2299(199711/12)42:3/4<144::AID-DDR5>3.0.CO;2-Q.
- [152] Muscará MN, Wallace JL. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 1999;276:G1313–6.
- [153] Aoki N, Johnson G, Lefer AM. Beneficial effects of two forms of NO administration in feline splanchnic artery occlusion shock. *Am J Physiol* 1990;258:G275-281.
- [154] Numata N, Takahashi K, Mizuno N, Utoguchi N, Watanabe Y, Matsumoto M, et al. Improvement of Intestinal Absorption of Macromolecules by Nitric Oxide Donor. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000;89:1296–304. doi:10.1002/1520-6017(200010)89:10<1296::AID-JPS7>3.0.CO;2-K.
- [155] Xu D-Z, Lu Q, Deitch EA. Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function. *Shock* 2002;17:139–45.
- [156] Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1994;267:G562-568.

- [157] Brown JF, Hanson PJ, Whittle BJR. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. *European Journal of Pharmacology* 1992;223:103–4. doi:10.1016/0014-2999(92)90824-N.
- [158] Lund JN, Scholefield JH. A randomised, prospective, double-blind, placebo-controlled trial of glyceryl trinitrate ointment in treatment of anal fissure. *Lancet* 1997;349:11–4. doi:10.1016/S0140-6736(96)06090-4.

5. Monoxyde d'azote et barrière intestinale

Grâce à la revue sur la modulation des acteurs de la perméabilité intestinale, nous avons pu dégager un certain nombre d'éléments intéressants pour de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une de ces nouvelles pistes est l'utilisation du monoxyde d'azote (NO), un gaz radicalaire qui s'est vu attribué de nombreux effets non seulement sur un plan cardiovasculaire, mais également sur l'intestin : ce NO n'étant pas utilisable tel quel (notamment du fait de sa réactivité avec les espèces environnantes et de sa très courte demi-vie, de l'ordre de la seconde), ils sont développés des donneurs de monoxyde d'azote, ou S-nitrosothiols (RSNOs) dont le chef de file est le S-nitrosoglutathion (GSNO).

5.1. S-nitrosoglutathion (GSNO)

Le S-nitrosoglutathion (GSNO) est un donneur de monoxyde d'azote particulièrement intéressant, puisqu'il est naturellement produit par les cellules entériques gliales et a démontré ses effets sur plusieurs acteurs de la barrière intestinale : ces différents effets font l'objet d'une partie de la revue (*Cf. Revue « Involved factors in the maintenance of intestinal barrier homeostasis: a review », partie 5 « Modulation by pharmacological molecules and potential innovative therapeutics »*).

5.2. Voies d'action du NO

Il existe plusieurs voies permettant d'expliquer les effets observés du NO au niveau cellulaire : ces trois voies sont la nitration, la nitrosation et la nitrosylation. Ces trois termes sont parfois considérés comme identiques et utilisés à mauvais escient dans la littérature, cependant il existe clairement des différences d'un point de vue chimique. Cette partie est une mise au point sur ces terminologies, afin d'éviter toute confusion, et se base sur les travaux de (Heinrich et al., 2013) (Figure 6).

5.2.1. Nitration

La réaction de nitration s'explique par l'insertion dans une molécule d'un groupement -NO₂ : le rôle physiologique de cette réaction n'est pas encore démontré.

Cependant, il s'avère que l'ion peroxyxynitrite (ONOO-) est à l'origine de cette réaction au niveau protéique, par nitration des acides aminés. C'est cette réaction, sur une tyrosine, qui permet la formation de 3-nitrotyrosine. Cette dernière engendre des modifications structurales et fonctionnelles des protéines, modifications qui sont mises en cause dans de nombreuses pathologies telles que l'infarctus du myocarde, le diabète ou encore l'athérosclérose. Des phénomènes de nitration peuvent s'opérer à partir des nitrites et nitrates apportés par l'alimentation : en effet, il a été notamment démontré par (Rocha et al., 2016) que, en donnant de la laitue à manger à des rats, cela induit une nitration des occludines de l'épithélium gastrique. Une autre étude menée en 2018 sur les excès de l'alcool a mis en évidence une nitration des protéines du complexe jonctionnel (pour rappel, interaction entre jonctions adhérentes et desmosomes) favorisant la fragilité intestinale et l'endotoxémie (Cho et al., 2018).

5.2.2. Nitrosation

La réaction de nitrosation s'explique par l'insertion de NO (ou d'un dérivé de NO) sur un résidu cystéine, afin de former des RSNO. Cette réaction a lieu préférentiellement sur des protéines possédant un résidu cystéine sur leur chaîne latérale. Cette réaction est réversible, et est reconnue pour engendrer des modifications post-traductionnelles et donc régulant l'activité protéique. La réaction de nitrosation de groupements thiols d'acides aminés, de peptides ou encore de protéines permet la formation de RSNO. Ainsi, une étude sur le tryptophane a montré qu'il pouvait être nitrosé autant à pH neutre qu'à pH intestinal, et que la présence d'antioxydants pouvait influencer sur l'efficacité de la nitrosation en fonction de la quantité de fer présente (de La Pomélie et al., 2018a). Par ailleurs, la même équipe a montré que la cuisson de la viande concomitante à la présence d'une importante quantité de nitrites induit une hausse des nitrosamines et une mauvaise digestion protéique (de La Pomélie et al., 2018b). Il est à distinguer cependant la *N*-nitrosation qui a lieu par interaction avec des nitrosamines, par rapport à la *S*-nitrosation qui est due à une interaction avec des thiols.

5.2.3. Nitrosylation

La réaction de nitrosylation s'explique par la réaction entre le NO et les métaux de transition présents dans les protéines. Ainsi, cette réaction est clairement établie

dans le processus de relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Cela est induit par l'activation de la guanylate cyclase soluble (GCs), par liaison du NO avec le fer héminique de l'enzyme. Cela engendrera toute une cascade d'activation, faisant intervenir la guanosine triphosphate (GTP), la GMPc, puis la protéine kinase G (PKG), permettant la déphosphorylation des chaînes légères de la myosine et entraînant la relaxation des CMLV. Cette réaction de nitrosylation, établie comme étant très importante sur le plan physiologique, intervient également dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la migration/adhésion des monocytes ou encore dans le remodelage vasculaire. La revue de (Treuer and Gonzalez, 2015) faisant un état de l'art sur la relation entre la S-nitrosylation et la santé cardiovasculaire, nous nous intéressons donc plus particulièrement au niveau gastro-intestinal. Une étude sur la nitrosylation de l'hème ferrique a montré, sur un modèle gastro intestinal *in vitro*, que la réaction s'opérait préférentiellement en conditions acides (pH 6,5 à 4,7), avec jusqu'à 20% de nitrosylation de la myoglobine dans ces conditions, et que la consommation d'aliments riches en antioxydants pouvait limiter ce phénomène (de La Pomélie et al., 2018a). Par ailleurs, l'utilisation de GSNO a montré une nitrosylation favorisée – et donc une régulation négative - du cytochrome P2J2, lui-même impliqué dans la régulation de la génération de NO à partir de dinitrate d'isosorbide ou encore de nitroglycérine (Park et al., 2018). Un grand nombre d'autres études sur la S-nitrosylation sont réalisées ces dernières années, et ont montré l'implication du NO dans la pathogenèse de la maladie de Barrett (Asanuma et al., 2016), dans le stress oxydant et la modification des cellules interstitielles de Cajal intestinales (Kaji et al., 2016), ou encore dans la protection contre l'ulcère gastrique (Han et al., 2017). La nitration et la nitrosylation de protéines intestinales ont également été mis en cause dans le cadre des effets néfastes d'un traitement au méthotrexate sur l'intestin (Natarajan and Abraham, 2016).

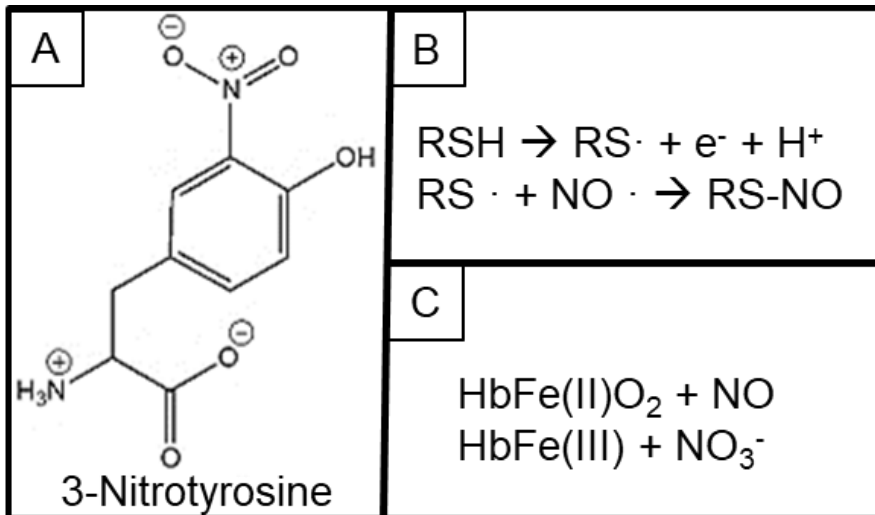


Figure 6 : Les voies d'action du monoxyde d'azote (NO) avec (A) la nitration et la production de 3-nitrotyrosine, (B) la S-nitrosation et la formation de S-nitrosothiols (RSNO) *via* la fixation d'un NO sur une cystéine ou un thiol, et (C) la nytrosylation *via* la fixation du NO sur un groupement métallique, ici le fer de l'hème.

5.3. Liaison S-NO et sensibilité aux facteurs extérieurs

La liaison S-NO est extrêmement sensible à son environnement, et c'est ce qui explique par ailleurs le développement de nouvelles molécules donatrices de NO afin de pouvoir augmenter la demi-vie du principe actif. Parmi les facteurs pouvant impacter cette liaison, il y a bien entendu la lumière et la température, l'oxygène, mais également le pH, puisqu'un environnement acide sera davantage favorable à conserver cette liaison (Figure 7). Par ailleurs, la présence d'ions métalliques est quelque chose de bien connu dans l'organisme, et il en est de même au niveau gastro-intestinal : ainsi, il est connu que le GSNO – et plus largement la liaison S-NO – est très sensible au contact d'ions métalliques (Smith and Dasgupta, 2000). Or, il se trouve qu'il y a une présence particulière d'ions métalliques dans l'intestin, et notamment de fer Fe^{2+} et de cuivre Cu^{2+} (Anderson and Frazer, 2017; Linder et al., 2003). Afin d'empêcher ces ions de cliver la liaison S-NO, et donc de dégrader le GSNO, il est possible d'utiliser des chélateurs d'ions métalliques tels que l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). L'utilisation de ce type de molécules peut permettre également de mettre en évidence, d'un point de vue expérimental, l'implication de ces ions métalliques dans la prise en charge du GSNO au niveau intestinal. La dégradation de la liaison S-NO engendrera par des réactions d'oxydation soit la formation d'ions peroxy-nitrites (ONOO^-), soit la formation de produits de dégradation terminaux que sont les ions nitrite (NO_2^-) et les ions nitrate (NO_3^-).

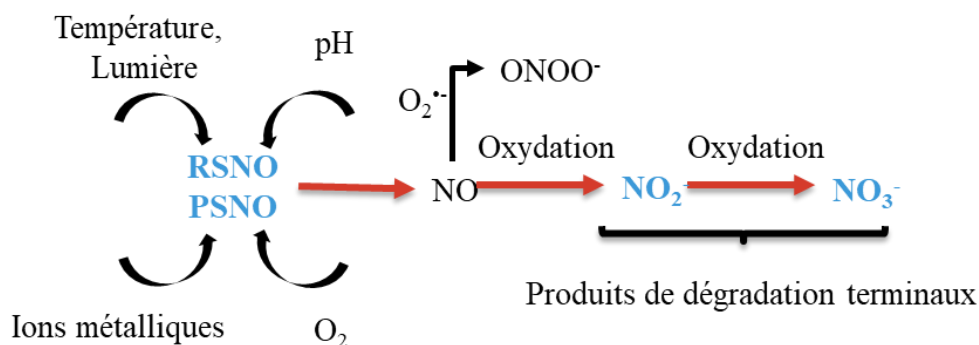


Figure 7 : Les différents facteurs environnants pouvant cliver la liaison S-NO de S-nitrosothiols (RSNO) ou de protéines portant une liaison S-NO (PSNO) : température, lumière, ions métalliques, oxygène et pH. Cela peut donner soit des ions peroxyntrites ONOO⁻ après réaction avec l'anion superoxyde O₂^{•-}, soit des ions nitrite NO₂⁻ et ions nitrate NO₃⁻ après oxydations successives.

5.4. Potentiel thérapeutique du GSNO

Le GSNO a un véritable intérêt en thérapeutique en tant que donneur de NO : en effet, il a déjà été étudié dans plus de 20 essais cliniques, avec un ciblage particulier des pathologies cardiovasculaires. Il a aussi été démontré que le GSNO sécrété par les cellules gliales entériques à la suite d'une stimulation du nerf vague permet de prévenir un épisode inflammatoire au niveau intestinal et de préserver l'intégrité de la barrière (Cheadle et al., 2013; Savidge et al., 2007) au travers de différentes actions : au niveau du tissu conjonctif intestinal, il augmente la réparation de la muqueuse et l'élimination des toxines, diminue l'infiltration et le recrutement des cellules immunitaires ; au niveau de l'épithélium intestinal, il permet d'augmenter la sécrétion de mucus, l'expression et la localisation des protéines des jonctions serrées, ou encore de diminuer l'apoptose induite par les antiinflammatoires non-stéroïdiens ou le TNF. Plus récemment, l'injection intraveineuse de GSNO (1mg/kg) à des rats en choc septique (induit par injection intraveineuse de lipopolysaccharides, LPS), a permis d'atténuer la réponse inflammatoire au niveau intestinal et les dommages au niveau de l'épithélium par inhibition de la voie NF-κB (Li et al., 2016). Il devient donc intéressant de considérer le GSNO comme un médicament candidat potentiel pour la prise en charge des MICI. Ces différents éléments cités préalablement font l'objet d'une partie de la revue (*Cf. Revue « Involved factors in the maintenance of intestinal barrier homeostasis: a review », partie 5.4 « Therapeutic potential of GSNO »*).

Le monoxyde d'azote, et plus particulièrement sous sa forme de donneur, le S-

nitrosoglutathion, semble donc présenter un véritable intérêt en thérapeutique. Dans le cadre d'un traitement chronique, il est préférable de privilégier une administration par voie orale, aussi cela permettrait sous certaines formulations, de pouvoir apporter le GSNO de manière contrôlée et locale, où l'on pourrait souhaiter en voir l'action, donc par exemple au niveau des entérocytes dans le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Si, comme il a été mentionné précédemment, le GSNO produit de manière endogène par les cellules entériques gliales a montré un certain nombre d'avantages, du fait de ses actions sur les différents acteurs de la barrière intestinale, il ne lui en reste pas moins beaucoup de chemin à faire avant de se voir dispensé dans les officines.

Afin de pouvoir poursuivre sur cette voie, et comme pour toute nouvelle piste thérapeutique, il est indispensable d'utiliser des modèles afin de mieux comprendre l'effet des principes actifs, et d'identifier leurs réels potentiels comme leur dangerosité, dans le cadre d'études précliniques du médicament.

6. Modèles d'étude de la barrière intestinale

L'étude de l'impact d'une molécule sur la barrière intestinale, et plus précisément son impact sur la perméabilité intestinale, peut être évaluée à l'aide de multiples modèles d'étude, présentant chacun des avantages et des inconvénients, qu'il convient de connaître avant de lancer une telle étude. Ci-après, nous allons donc lister les principaux modèles utilisés dans ce cadre, et en faire une brève présentation basée sur les travaux de (Faure et al., 2014), mais également sur une revue plus récente de (Billat et al., 2017) qui en fait un état de l'art plutôt complet et bien descriptif.

6.1. *In vivo* : intestin perfusé, boucle intestinale et études pharmacocinétiques

L'intérêt d'utiliser ce type de modèles *in vivo* est bien d'avoir l'organisme dans son intégralité, et, de ce fait, tous les éléments pouvant interagir avec le médicament ou encore empêcher / favoriser son passage à travers les barrières physiologiques.

Parmi ces modèles, le plus communément utilisé est celui de l'intestin perfusé, qui consiste à identifier une zone d'intérêt pour l'étude et de l'isoler par ligatures en

amont et en aval de la section intestinale d'intérêt : il est alors possible d'y injecter un composé par perfusion *via* canulation de la veine mésentérique, et de le doser dans le sang (Figure 8). Cette technique permet l'étude du transport et du métabolisme intestinal, l'étude de perméabilité et la cinétique de nouvelles molécules. Les études ne peuvent être envisagées que sur des modèles animaux anesthésiés, à qui des solutions de concentrations connues en principe actif seront administrées dans un segment intestinal cathétérisé. Pour ce qui est des études sur animal entier, elles sont réalisées sur deux espèces animales différentes incluant un rongeur et un non rongeur (chat, chien, mini-porc...). Le modèle de rongeur utilisé pour les études d'absorption est le rat, qui reflète bien la physiologie humaine. Le principal avantage de la technique est de pouvoir évaluer en conditions « réelles » les mécanismes d'absorption de principes actifs.

Une variante de ce modèle de perfusion intestinale est le modèle de boucle fermée : ce modèle est similaire au précédent, mais diffère par le fait que l'administration se fait dans l'intestin, et le dosage de médicament se fait à la fin de l'expérimentation par dosage dans l'intestin, et en déduisant un taux d'absorption à partir de la concentration initiale en principe actif administrée.

Par ailleurs, des modèles plus simples d'étude pharmacocinétique peuvent être utilisés, consistant simplement en l'administration orale d'un principe actif et son dosage dans le flux sanguin : ces modèles s'avèrent être plutôt corrélés entre les rongeurs et l'Homme, et sont donc relativement fiables et pratiques. Il ne faut cependant pas oublier qu'il y a une variabilité non négligeable, tant inter-individuelle qu'intra-individuelle, qui peut influencer sur la prise en charge d'un principe actif, et qui doit être prise en compte, en incluant un plus grand effectif d'individus dans l'étude.

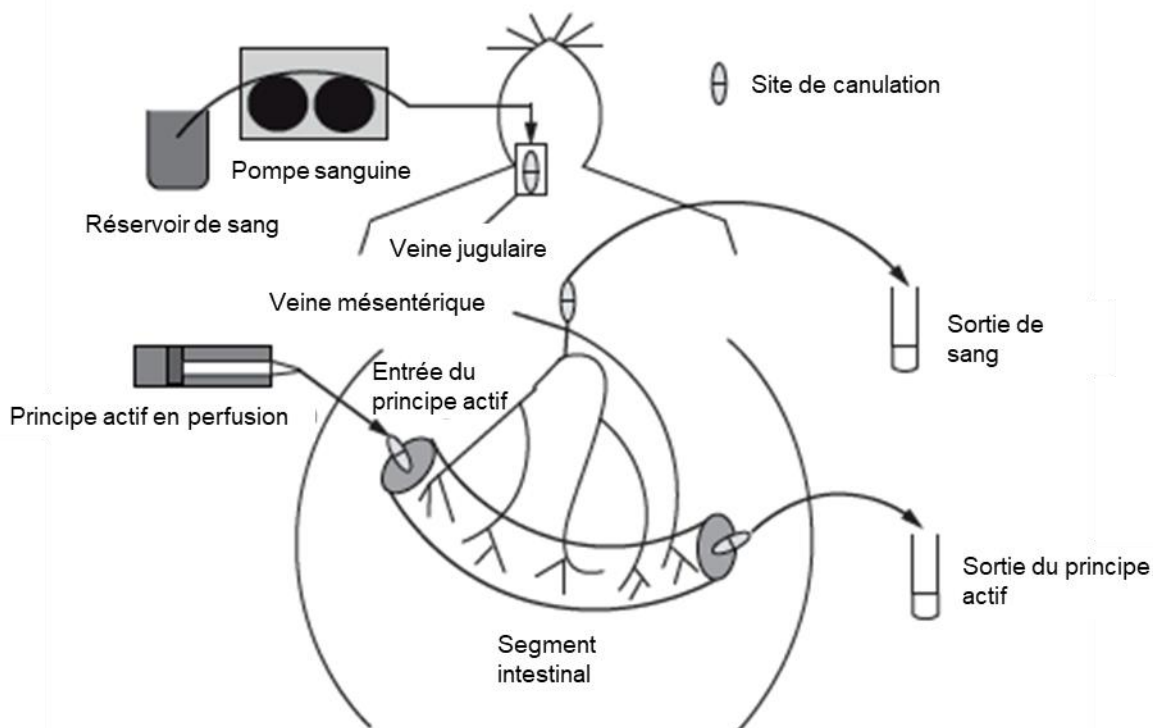


Figure 8 : Représentation du modèle *in vivo* d'intestin perfusé : le segment intestinal d'intérêt est ligaturé de part et d'autre puis canulé avec une entrée et une sortie sanguine, une perfusion de principe actif et un site de prélèvement à la sortie de l'intestin, modifié de (Faure et al., 2014)

6.2. *Ex vivo* : sac intestinal retourné et chambre de Ussing

Le modèle de sac intestinal retourné, mis en place initialement pour étudier le transport de sucres et d'acides aminés, est plus difficile à mettre en œuvre, mais permet également d'évaluer la perméabilité d'un principe actif. L'intestin de l'animal est prélevé, isolé, et retourné sous forme de sac ; la région étudiée est plongée dans un soluté physiologique salin contenant la molécule à étudier. Bien que ce modèle permette l'analyse de l'absorption bidirectionnelle, il présente des limites puisqu'il n'est pas innervé ni vascularisé et que l'éversion du tissu intestinal peut provoquer des lésions morphologiques, notamment au moment du positionnement du tissu, modifiant les capacités d'absorption. Et de ce fait, la viabilité tissulaire dans ce modèle est également mise en cause et limitée.

Le modèle *ex vivo* de chambre de Ussing est plus répandu et a été développé en 1946 par le zoologiste et physiologiste danois Hans Henriksen Ussing. C'est un modèle de chambre de diffusion, permettant d'étudier le transport d'ions, de nutriments ou de principes actifs à travers des tissus épithéliaux divers, des modèles de barrière cellulaire ou encore des membranes synthétiques. Une chambre de Ussing est

composée d'un compartiment donneur et d'un compartiment accepteur, tous deux séparés par un insert, sur lequel est monté le tissu intestinal. Les deux faces du fragment de tissu intestinal d'animal plongent chacune dans des solutions osmotiques maintenues à 37 °C (Figure 9). Cette technique permet l'étude des différences d'absorption, par dosage des composés dans les deux compartiments et le tissu, en fonction des différents segments intestinaux et nécessite une faible quantité de principe actif. Ce modèle présente également des inconvénients tels que les variabilités inter- et intra-individuelles, une viabilité limitée et la perte d'un certain nombre de composants physiologiques du tissu, même de manière substantielle (dont le mucus, les bactéries, ...). Cela reste néanmoins l'un des meilleurs modèles d'étude à l'heure actuelle pour l'étude de l'absorption de principes actifs.

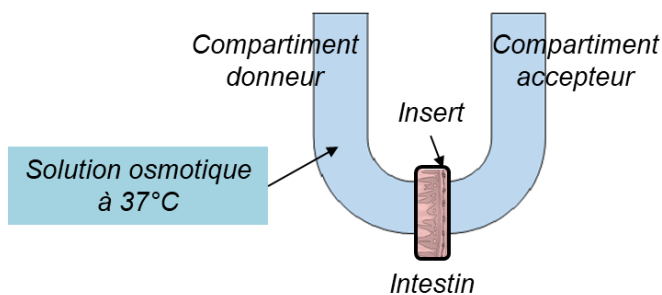


Figure 9 : Représentation du modèle *ex vivo* de chambre de Ussing, composé de deux compartiments, donneur et accepteur, séparés par un insert sur lequel est fixé un segment intestinal : il est de ce fait orienté, avec la lumière intestinale d'un côté et le tissu conjonctif de l'autre. Les deux compartiments sont remplis d'une solution osmotique à 37°C.

6.3. *In vitro* : Caco-2 et PAMPA

Parmi les modèles *in vitro*, les principaux modèles sont sur des lignées cellulaires. Bien qu'ils soient assez largement utilisés du fait de leur praticité et simplicité, ils n'en restent pas moins des modèles limités car souvent des monocouches cellulaires simples, perdant le lien avec les conditions physiologiques que peuvent apporter les modèles préalablement cités. Ainsi, le modèle de culture cellulaire Caco-2 est le modèle de référence pour l'étude de perméabilité intestinale *in vitro*, consistant en une lignée d'adénocarcinome colique humain : il permet d'étudier le passage de molécules à travers un tapis cellulaire en monocouche, et d'évaluer la perméabilité tant active que passive de principes actifs. Ces cellules sont cultivées sur des systèmes de Transwell® pendant une vingtaine de jours, jusqu'à obtenir une monocouche bien définie et jointive (évaluée par mesure de la résistance électrique transépithéliale, TEER). Ensuite, ce tapis cellulaire séparant deux compartiments peut être exposé à

un principe actif déposé dans l'un ou l'autre de ces compartiments, et ce dernier est dosé dans le second compartiment (Figure 10). Comme mentionné un peu plus tôt, la principale limitation de ce modèle est sa simplicité, puisqu'il n'y a ni mucus, ni muqueuse, ni cellules immunitaires, ... (Kauffman et al., 2013). Pour tenter de renforcer ce type de modèles, certaines équipes n'hésitent pas à développer des modèles plus complexes en coculture double ou triple afin d'approcher au mieux les conditions physiologiques.

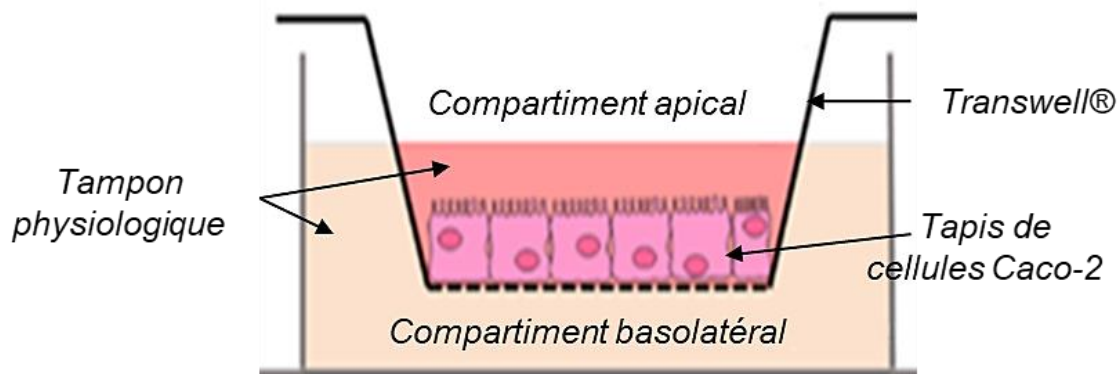


Figure 10 : Représentation du modèle *in vitro* de cellules Caco-2, avec un Transwell® au fond duquel se forme le tapis cellulaire, et distinguant le compartiment supérieur = apical et le compartiment inférieur = basolatéral, ces deux compartiments étant immergés dans un tampon physiologique.

Afin d'évaluer la perméabilité passive de principes actifs, des modèles artificiels ont été développés tel que le modèle PAMPA « Parallel Artificial Membrane Permeability Assay ». Dans ce cas, un filtre synthétique lipidique est utilisé, dont la composition peut varier en fonction de l'étude : de nombreux lipides peuvent être utilisés pour composer ce filtre, telle que la phosphatidylcholine. Cependant, ce modèle n'est pas sans inconvénient puisqu'il est relativement statique, sans système d'agitation, fait intervenir des solvants et il est difficile d'atteindre les conditions sink propres à la diffusion (les conditions sink permettant justement d'éviter tout phénomène de saturation du principe actif, qui est contraire au principe de diffusion).

Après avoir introduit les notions majeures abordées dans ce sujet de thèse, notamment à travers une étude bibliographique sur la modulation de la barrière intestinale (Cf. Revue « *Involved factors in the maintenance of intestinal barrier homeostasis: a review* »), il s'ensuit une présentation des travaux scientifiques réalisés,

sous la forme de trois chapitres (Figure 11) : un premier chapitre abordant la mise en place d'un modèle *ex vivo* de chambre de Ussing au sein du laboratoire (Cf. Article 1 « Precautions for the evaluation of intestinal barrier permeability in an *ex vivo* model of Ussing chamber »), ainsi que la mise au point d'une méthode analytique de quantification des espèces NO marquées à l'azote 15 (Cf. Article 2 « Comparison between two derivatization methods of nitrite ion labelled with ^{15}N applied to liquid chromatography-tandem mass spectrometry »). Ensuite, le second chapitre traite de la perméabilité des espèces NO, en utilisant ces deux méthodologies préalablement mises en place, et permettant de suivre le passage des espèces ^{15}N à travers la barrière intestinale (Cf. Article 3 « Influence of S-nitrosoglutathione metabolism on its intestinal permeability »). Enfin, le troisième et dernier chapitre traite plus spécifiquement des mécanismes de prise en charge de ce GSNO par la barrière intestinale, d'un point de vue davantage mécanistique et enzymatique (Cf. Article 4 « Mechanism of action and GSNO effects on the intestinal barrier »). L'ensemble de ces travaux de recherche sont alors discutés, et des perspectives sont proposées afin de mieux comprendre l'interaction entre S-nitrosoglutathion et perméabilité intestinale, et surtout d'approfondir l'étude de l'impact de ce donneur de monoxyde d'azote sur la barrière intestinale.

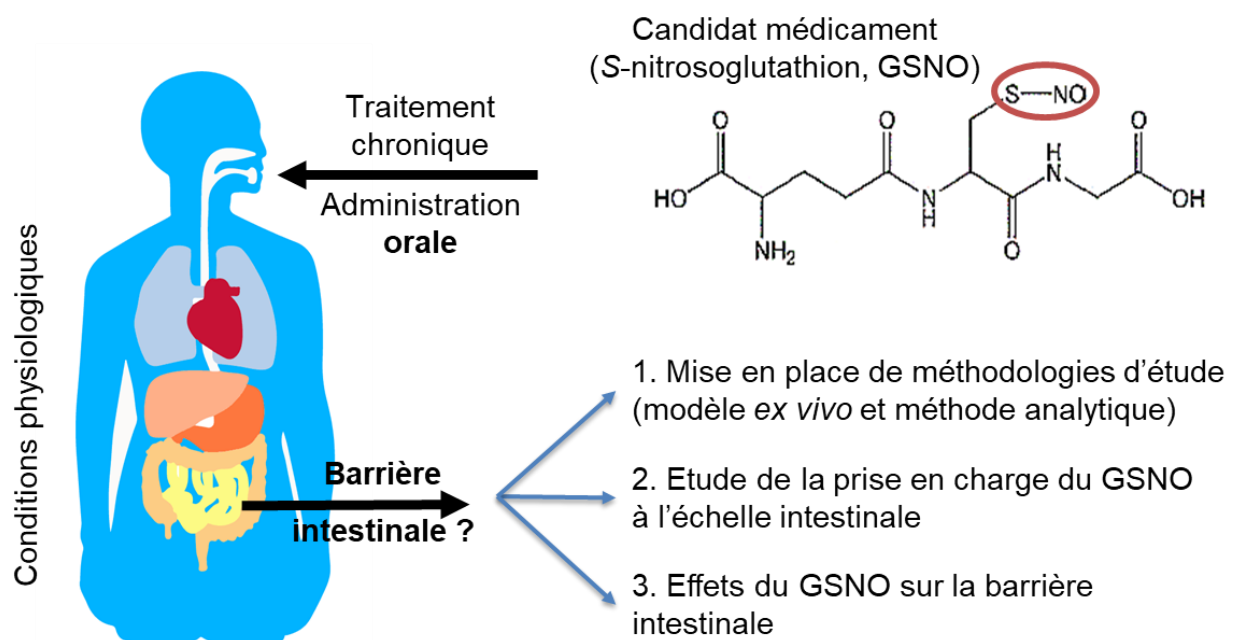
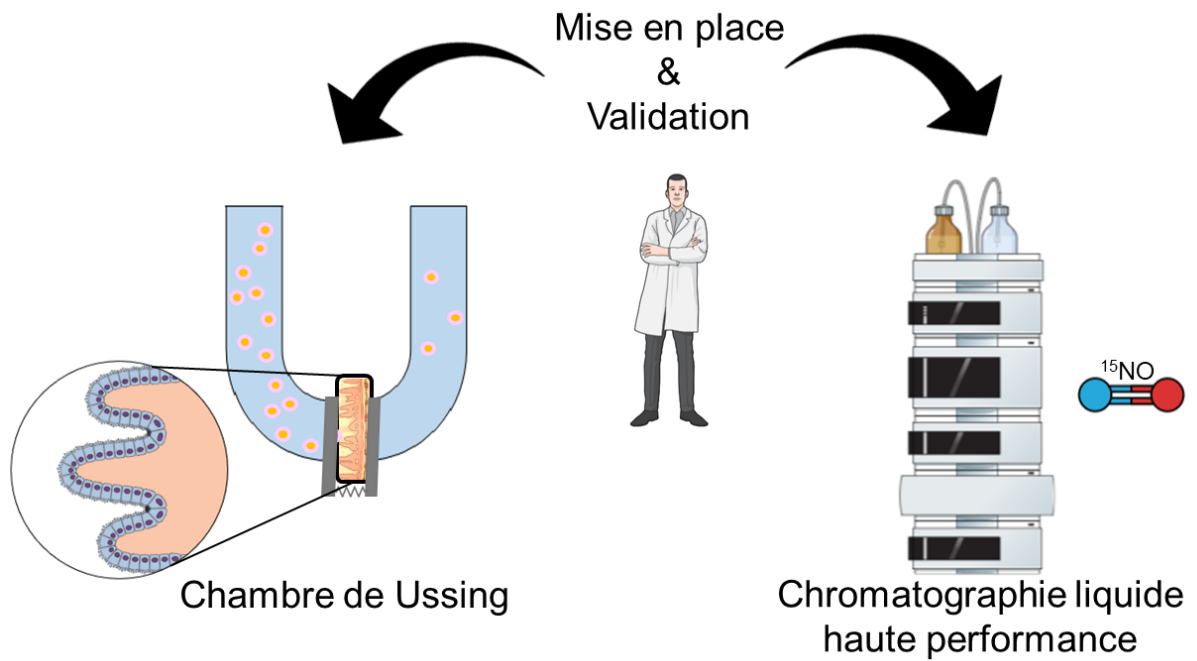


Figure 11 : Stratégie d'étude employée lors de ces travaux de thèse, avec une déclinaison en trois axes principaux

1^{er} Chapitre : Mise en place et validation du modèle *ex vivo* de chambre de Ussing, et de la méthode analytique de quantification des espèces ¹⁵N



1. La chambre de Ussing : un dispositif adapté à l'étude de la perméabilité intestinale

1.1. Présentation et calcul

L'utilisation des modèles d'étude de la barrière intestinale présentés en introduction permettent d'évaluer le passage d'un principe actif d'intérêt à travers la barrière intestinale et de déterminer un des deux paramètres importants de la classification biopharmaceutique décrite par Gordon Amidon (Amidon et al., 1995) : la perméabilité. Cette classification « Biopharmaceutical Classification System » (BCS) est issue de travaux de recherche récents qui font aujourd'hui encore office de référence. Les autorités pharmaceutiques américaines et européennes recommandent de suivre la démarche décrite dans ces travaux pour la détermination de la classe biopharmaceutique d'un nouveau composé, et ce avant de le proposer comme molécule thérapeutique. Les critères de classification BCS permettent de classer les médicaments en fonction de leur solubilité (à différents pH) et de leur perméabilité (à hauteur de 90% de la dose). Ainsi les quatre classes suivantes sont définies : classe 1, fortement soluble et fortement perméable ; classe 2, faiblement soluble et hautement perméable ; classe 3, fortement soluble et faiblement perméable ; et classe 4, faiblement soluble et faiblement perméable (Figure 12).

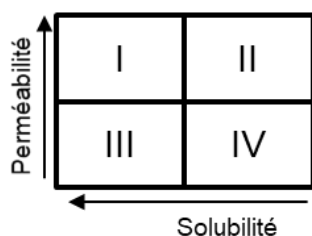


Figure 12 : La classification pharmaceutique selon Amidon et al, 1995, dénommée Biopharmaceutical Classification System (BCS), et permettant de définir un principe actif selon l'une des quatre classes en fonction de sa solubilité et de sa perméabilité.

Par ailleurs, sont également pris en compte la présence de métabolites, leur identité, leur quantité, la pureté de la molécule active, ou encore la dose maximale par prise utilisable en clinique.

Pour définir la perméabilité intestinale d'un composé, le flux de principe actif traversant le tissu intestinal d'un compartiment donneur (lieu de dépôt du composé) à un compartiment récepteur est suivi. Une modélisation mathématique permet l'expression des résultats du passage de la molécule en flux de matière (J) ou en perméabilité apparente (P_{app}) selon les formules suivantes :

$$J = \left(\frac{dQ}{A \cdot dt} \right)$$

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \times \left(\frac{1}{AC_0} \right) = \frac{J}{C_0}$$

Où $\frac{dQ}{dt}$ est le gradient de matière Q dans le tissu intestinal en fonction du temps t, A la surface de tissu séparant les compartiments et C₀ la concentration initiale en molécule (unités classiquement utilisées : P_{app} en cm.s⁻¹ ; Q en mg; t en s ; A en cm² ; C₀ en mg.cm⁻³).

La terminologie de perméabilité apparente se distingue de la perméabilité effective (ou réelle) : en effet, la perméabilité apparente est un moyen de prédire sur un modèle expérimental (animal ou cellulaire) la perméabilité qu'aurait un composé par extrapolation chez l'Homme. Bien que cette méthode de calcul soit la plus répandue et la plus utilisée, elle assume néanmoins une évolution linéaire du flux de matière. Aussi, certaines équipes ont développé des méthodologies de calcul basées sur des modèles mathématiques plus complexes que nous n'aborderons pas ici, mais prenant en compte une évolution non linéaire (Ozeki et al., 2015; Palumbo et al., 2008). Si le modèle cellulaire en monocouche de cellules Caco-2 cultivées en Transwell® est le plus souvent utilisé pour ces études de perméabilité, le modèle de chambre de Ussing a par exemple permis de déterminer la perméabilité de la phénylalanine et de la caféine et de participer ainsi à la détermination de leur classe BCS de type 1 ; ou encore la perméabilité du furosémide déterminant son appartenance à la classe BCS de type 4 (Lennernas, 2007; Li et al., 2013).

1.2. Le recours à des « marqueurs de perméabilité »

Des molécules appelées « marqueurs de perméabilité » sont régulièrement utilisées lors de ces études (souvent à la fin d'une étude de mesure d'un flux de matière) pour vérifier la viabilité du tissu intestinal placé dans la chambre. Cette perte de viabilité ayant pour conséquence une perte de la fonction de barrière, cela augmente de façon erronée la valeur du flux et donc de la perméabilité calculée. Il est donc primordial d'utiliser un « marqueur » pour s'assurer de l'intégrité de la barrière intestinale pendant la détermination du flux à travers cette barrière.

Sont par exemple utilisés comme des marqueurs de passage paracellulaire (entre les cellules), la fluorescéine sodique (NaFlu, 0,38 kDa) ou l'inuline couplée à la fluorescéine-isothiocyanate (Inuline-FITC, 3,5 kDa), du fait de leur faible taille et de leur hydrophilie, ce qui leur permet de passer par les jonctions intercellulaires. Pour évaluer le passage transcellulaire (à travers les cellules), le propranolol, le furosémide

ou le mannitol (ce dernier pouvant être utilisé tel quel, marqué au carbone 14, ^{14}C -mannitol, ou encore tritié, [3H]-mannitol) sont couramment utilisés (Greenspon et al., 2011; Guo et al., 2003; Turner et al., 1997). L'utilisation de ces marqueurs permet de mettre en évidence un passage à travers l'épithélium, ou encore une interaction spécifique avec les cellules (par exemple, avec le marquage fluorescent de transporteurs permettant la localisation de types cellulaires spécifiques *in situ*, Clarke, 2009). Le modèle PAMPA bien que peu utilisé car ne permettant que des études de diffusion passive et faisant intervenir une membrane lipidique synthétique, a permis par exemple d'étudier la perméabilité intestinale du pentyl gallate, un composé anti-herpétique, qui est aussi perméable que la carbamazépine (contrôle de perméabilité élevée) et 56 fois plus perméable que le furosémide (contrôle de perméabilité faible), résultats corrélés sur le modèle Caco-2 (Kratz et al., 2013).

Lors des études réalisées au cours de ce projet, deux marqueurs de perméabilité sont utilisés : la fluorescéine sodique et le propranolol. Un marqueur est déposé dans le compartiment donneur, et est quantifié tout au long de l'expérimentation par mesure de l'intensité de fluorescence en spectrofluorimétrie (avec longueur d'onde d'excitation $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$ et longueur d'onde d'émission $\lambda_{\text{ém}} = 415 \text{ nm}$ pour la NaFlu) ou en chromatographie liquide haute performance couplée à de la spectrofluorimétrie (CLHP-FL, avec $\lambda_{\text{ex}} = 230 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 340 \text{ nm}$ pour le propranolol) dans le compartiment accepteur.

La fluorescéine sodique et le propranolol étant deux marqueurs de passage couramment utilisés dans les études *ex vivo* de chambre de Ussing, il est possible de se référer aux données de la littérature pour pouvoir interpréter les valeurs expérimentales obtenues. Ainsi, la perméabilité de la NaFlu est comprise dans la littérature entre $6,1 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$ (iléon, Elginaid Osman et al., 1998) et $3,7 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ (jéjunum, Forsgård et al., 2014) pour de l'intestin de rat présentant toutes les structures depuis la séreuse et jusqu'à la muqueuse. La perméabilité du propranolol est, quant à elle, située dans la littérature autour de $3,0 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ (Tableau 1). Les fluctuations observées (surtout pour la perméabilité paracellulaire, fluorescéine) dépendent non seulement de la préparation du tissu (temps de prélèvement et mise en place du tissu dans le modèle expérimental), des conditions expérimentales (un tissu dont la sous-muqueuse aura été enlevée aura de façon générale une perméabilité plus élevée à un composé qu'un tissu conservant toutes ces structures), mais également de la section intestinale étudiée : le colon a une perméabilité au propranolol plus faible par exemple, du fait de sa structure particulière, notamment avec de très nombreuses plaques de Peyer (Ungell et al., 1998). Ces valeurs fluctuantes de perméabilité de la fluorescéine,

variant d'un facteur 5, reflètent également la difficulté de maîtrise de ce modèle de chambre de Ussing et la nécessité de multiplier les manipulations pour proposer un résultat.

Tableau 1: Valeurs de perméabilité apparente (Papp, cm×s) de la fluorescéine sodique (NaFlu) et du propranolol référencées dans la littérature, obtenues sur le modèle *ex vivo* de chambre de Ussing

	Section intestinale	Durée (h)	Surface (cm²)	Papp (cm×s) ± écart-type	Référence
NaFlu	Rat, jéjunum (non démuscularisé)	1,75	1	3,00×10 ⁻⁷ ± 2,00×10 ⁻⁸	(Berginc et al., 2012)
	Rat, iléon (non démuscularisé)	2	1,78	6,10×10 ⁻⁷ ± 2,60×10 ⁻⁷	(Elginaid Osman et al., 1998)
	Souris, jéjunum (non démuscularisé)	1,75	0,3	3,70×10 ⁻⁶ ± 6,00×10 ⁻⁷	(Forsgård et al., 2014)
	Rat, jéjunum (non démuscularisé)	3	1	5,03×10 ⁻⁶ ± 2,50×10 ⁻⁷	(Legen and Kristl, 2003)
	Rat, jéjunum (non démuscularisé)	4	1	2,80×10 ⁻³ ± 2,00×10 ⁻³	(Markov et al., 2019)
Propranolol	Intestin grêle (non démuscularisé)	3	0,64	3,0×10 ⁻⁶ ± 0,5×10 ⁻⁶	(Leithner et al., 2011)
	Rat, iléon (séreuse retirée)	1 à 3	0,64	20 à 80×10 ⁻⁶	(Polentarutti et al., 1999)
	Rat, iléon (démuscularisé)	2,5	1,14	41,3×10 ⁻⁶ ± 3,8×10 ⁻⁶	(Ungell et al., 1998)

2. La chambre de Ussing : un dispositif adapté à l'évaluation de l'intégrité de la barrière intestinale ?

Parallèlement à l'évaluation de la perméabilité intestinale, certains modèles présentés plus tôt (cf. introduction, parties II6.1, II6.2, II6.3) permettent également de contrôler l'intégrité de la barrière intestinale en suivant la réponse tissulaire à un agent pharmacologique. Ainsi, sur un modèle cellulaire à base de cellules Caco-2, l'ouverture

des jonctions serrées et par la même une modification de l'intégrité de la barrière intestinale, par des promoteurs d'absorption (décanoate de sodium C10, 10 mM, 1 h) a pu être suivie (Anderberg et al., 1993). Une large étude réalisée par l'équipe de Yu en 2013 balaie l'efficacité de différents composés en tant que promoteurs d'absorption sur des cellules Caco-2 cultivées en monocouche : les effets du glucose (750 mM), de l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA, 2,5 mM), du sodium cholate (10 mM), du sodium dodécyl sulfate (SDS, 0,2 mM), de l'éthanol (10% v/v) et du menthol (1% v/v) ont été explorés en suivant la perméabilité de la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Yu et al., 2013). De ces composés, tous augmentent la perméabilité intestinale du marqueur fluorescent FITC, et plus particulièrement l'EDTA qui multiplie par 16,5 la perméabilité de la FITC comparativement au groupe contrôle ; le sodium cholate augmente aussi la perméabilité de la FITC par un facteur 6,6. Les auteurs avancent des pistes plutôt cohérentes quant aux mécanismes conduisant à l'augmentation de perméabilité par les composés testés : par exemple, le glucose *via* la voie Na⁺-glucose entrainerait une cascade de phosphorylation des protéines intercellulaires, réorganisant les jonctions serrées par condensation du cytosquelette ; l'EDTA diminuerait drastiquement la concentration en calcium Ca²⁺ induisant une ouverture des jonctions serrées ; le SDS déplèterait transitoirement l'ATP (adénosine triphosphate) altérant la membrane apicale ; l'éthanol provoquerait un réarrangement des filaments d'actine et donc déstructurerait le cytosquelette.

Par ailleurs, des modèles développés comme la colite chimiquement induite au sulfate de dextran sodique (DSS, administré sur 7 à 10 j dans l'eau de boisson), peuvent être étudiés en chambre de Ussing permettant de moduler / altérer l'intégrité de la barrière intestinale et de mimer la colite : dans ce cas particulier, il est possible d'évaluer l'effet de l'inducteur chimique, en suivant la perméabilité d'un marqueur de passage fluorescent comme le FITC-dextran (Thomson et al., 2019).

La modification de l'intégrité de la barrière intestinale est principalement suivie par mesure de la résistance transépithéliale, sur des modèles cellulaires comme modèles tissulaires (dont chambre de Ussing). Cette mesure de la résistance électrique transépithéliale (présentée dans le paragraphe suivant) est la plus communément utilisée, cependant d'autres méthodes ont également été développées, telles que la mesure de la résistance électrochimique organique pour une mesure davantage *in situ*. Cette méthode, faisant intervenir un polymère conducteur, semble plutôt appropriée pour des modèles cellulaires (type Caco-2 cultivées sur Transwell®) et se base sur le système de transports ioniques : brièvement, lors d'une perturbation de la barrière intestinale, l'échange de courant est plus important, reflétant un échange ionique

augmenté et donc une rupture de la barrière intestinale (Jimison et al., 2012). Sur tissu, le suivi de l'intégrité de la barrière à la suite de l'exposition d'une molécule est plus rare.

2.1. Présentation de la résistance transépithéliale : un marqueur de viabilité tissulaire « universel »

Lors d'étude de perméabilité, quel que soit le modèle d'étude (sur cellules ou tissus), il est possible de mesurer la résistance électrique transépithéliale (TEER). La mesure de cette résistance permet de déterminer la viabilité du tissu, de manière indirecte, par le témoignage de l'ouverture des jonctions serrées. En disposant deux électrodes de part et d'autre du tissu intestinal, et en appliquant un courant alternatif (à une fréquence de 12,5 Hz), ce dernier va pouvoir transiter d'un compartiment à l'autre : cela permet d'obtenir une valeur de résistance tissulaire. De manière mathématique, cela se traduit par la loi $U = R \times I$ et $R = \frac{U}{I}$ où U correspond à une différence de potentiel (en volt), R à la résistance apportée par le tissu (en ohm), et I au courant induit par l'appareillage (en ampère). De manière classique, la résistance est pondérée par la surface tissulaire séparant les deux compartiments (en cm²), et le TEER est donc exprimé en ohm×cm².

De la même manière que pour interpréter les résultats de perméabilité d'un marqueur fluorescent, il est possible de se référer à la littérature pour comparer les valeurs obtenues expérimentalement à celles déjà référencées dans des conditions similaires d'expérimentation. Ainsi, une brève revue de la littérature indique des valeurs supérieures à 30 ohm×cm², et allant de 50 ohm×cm² (iléum, jéjunum) à 400 ohm×cm² (colon) selon la section intestinale étudiée (Tableau 2). Là encore, des variations sont observées, possiblement dues aux systèmes et appareillages utilisés pour la mesure du TEER, plus ou moins performants et précis pour effectuer des mesures en électrophysiologie.

Tableau 2: Valeurs de résistance électrique transépithéliale (TEER, ohm×cm²) référencées dans la littérature, obtenues sur le modèle *ex vivo* de chambre de Ussing

	Section intestinale	TEER (ohm×cm²) ± écart-type	Référence
TEER	Rat, iléum	46 ± 1	(Brayden et al., 2012)
	Rat, colon	139 ± 3	
	Rat, jéjunum	58 ± 8	(Da Silva et al., 2015)
	Rat, iléon ou duodénum	75-100	(Eichman and Robinson, 1998)
	Rat, jéjunum	82 ± 12	(Menon and Barr, 2003)
	Rat, jéjunum	124 ± 4	(Mineo et al., 2004, 2002)
	Rat, iléum	117 ± 4	
	Rat, cæcum	111 ± 4	
	Rat, colon	231 ± 8	
	Rat, intestin grêle	54 ± 2	(Petersen et al., 2012)
	Rat, colon	116 ± 4	
	Rat, intestin grêle	50-100	(Srinivasan et al., 2015)
	Rat, colon	300-400	
	Rat, muqueuse gastrique	2000	
Rat, jéjunum (démuscularisé)	96 ± 5	(Uchiyama et al., 1999)	
Homme, intestin grêle	42	(van de Kerkhof et al., 2006)	
Rat, jéjunum	58 ± 8	(Žakelj et al., 2004)	
Rat, jéjunum	56 ± 18	(Markov et al., 2019)	

2.2. Le suivi de molécules « marqueurs de l'intégrité »

Le recours à des marqueurs peut aussi permettre d'obtenir des informations quant à l'intégrité de la barrière : une augmentation anormale de la perméabilité d'un marqueur de perméabilité connue peut traduire un défaut de la barrière et une perte

d'intégrité. Ceci est d'autant plus informatif que le marqueur mobilise des transporteurs membranaires et qu'il présente une diffusion passive limitée. Il sera d'autant plus facile de distinguer une perturbation de la physiologie de la barrière. C'est le cas de marqueurs de passage transcellulaires de la famille des sucres comme le glucose ou le fructose, ou encore le mannitol. De même, les acides monocarboxyliques comme l'acide salicylique, l'acide benzoïque ou encore l'acide férulique empruntent la voie transcellulaire *via* un système de transporteur spécifique des acides monocarboxyliques dépendant d'un gradient protonique (H^+) : cela a été mis en évidence par des variations de pH allant de 5 à 7,3. En effet, des transporteurs spécifiques de pompes à proton ne sont actifs que si le pH est acide (< 7), et c'est la raison pour laquelle il est recommandé d'établir un gradient de pH entre deux compartiment pour une étude de perméabilité (par exemple, pH 6 dans le compartiment apical = donneur vs pH 7,4 dans le compartiment basolatéral = accepteur). Une perturbation de l'équilibre ionique de la barrière intestinale peut donc être mis en évidence *via* l'utilisation de ces molécules (Konishi and Shimizu, 2003; Takanaga et al., 1994; Tsuji et al., 1994).

Ces marqueurs peuvent donc être utilisés de manière concomitante (incubation en même temps ou en décalé) à la molécule dont on souhaite suivre l'effet pharmacologique sur la barrière intestinale.

De plus, l'effet de promoteur d'absorption connu (comme le décanoate de sodium, C10) peut être étudié. Il est alors possible de comparer l'effet d'une molécule thérapeutique « test » en comparant son effet avec celui du promoteur connu. La comparaison n'est que relative mais permet de fournir des informations quant au mécanisme d'action d'une molécule. Par exemple, sur des cellules Caco-2 et sur colon de rat mis en place dans une chambre de Ussing, il a été montré qu'une préexposition au misoprostol (le misoprostol (un agoniste du récepteur de la prostaglandine E1, PGE1) permet de diminuer les effets du C10, en réduisant la diminution de TEER, en réduisant l'augmentation de perméabilité du marqueur mannitol (marqué au carbone 14, [^{14}C]-mannitol), en réduisant les effets à l'échelle histologique (conservation des microvillosités, espaces intercellulaires moins importants en taille, et en nombre) et en augmentant la sécrétion de mucus (Brayden et al., 2015). Dans une autre étude sur les polyphénols, il a été montré que ceux-ci permettaient une augmentation du TEER sur des cellules de type T84, que ce soit après exposition au C10 ou non, démontrant un fort potentiel dans la protection de la barrière intestinale par ces molécules : le C10 a alors été utilisé comme contrôle « positif » d'une barrière perturbée, non jointive,

pour montrer un éventuel effet bénéfique de restauration / protection de l'intégrité de la barrière intestinale par ces polyphénols (Bergmann et al., 2009).

2.3. D'autres méthodes de suivi de l'intégrité de la barrière intestinale

Bien que les méthodes préalablement citées soient les plus communément utilisées, il n'en reste pas moins que d'autres approches sont étudiées. Ainsi, il est possible de vérifier l'expression des protéines de jonctions par Western Blot après les avoir extraites du tissu intestinal. Comparativement à un tissu contrôle, il sera possible de déterminer s'il y a une modification de l'expression des protéines intercellulaires et, ceci combiné aux tests de perméabilité ou de TEER, permet de confirmer une perturbation de l'intégrité de la barrière intestinale à l'échelle intercellulaire. Il est également possible de quantifier l'ARNm de protéines de jonctions à partir du tissu intestinal, comme l'ARNm de ZO-1, de l'occludine, de JAM-A, des claudines (1-2-5). Il est également possible d'évaluer l'expression de Muc-2, ce dernier permettant la production de mucus (Volynets et al., 2016).

La visualisation histologique par observation microscopique de la barrière intestinale par des marquages spécifiques permettent là aussi de déterminer une modification de la morphologie de la barrière. Classiquement, il est utilisé l'hématoxyline-éosine-bleu alcian, ou encore l'hématoxyline-éosine-safran : l'hématoxyline permet de marquer le tissu conjonctif, l'éosine permet de marquer les villosités, et le bleu alcian permet de marquer le mucus du fait de sa forte composition en lipopolysaccharides. Une modification ou perturbation de la morphologie du tissu peut indiquer une perturbation de la barrière, et donc possiblement une altération de son intégrité (très peu de mucus, tissu plus lâche, cellules davantage espacées, etc).

2.4. Le suivi de l'intégrité de la barrière intestinale et de l'effet d'une molécule sur l'intestin par le modèle de Ussing : un véritable défi

L'équilibre dynamique entre tous les acteurs de la barrière et les interactions mucus, cellules épithéliales, microbiote, et défenses immunitaires sont essentiels au maintien de l'intégrité de la barrière et à l'homéostasie intestinale. L'étude de cette barrière intestinale passe par l'utilisation de modèles. Le système *ex vivo* de chambre de Ussing a très peu été utilisé dans cet objectif (étudier l'effet d'une molécule sur l'intestin) jusqu'à présent : en effet, comme le montre cette étude récente de Arnold en 2019, les études en chambre de Ussing faisant intervenir un principe actif s'intéressent

davantage à sa perméabilité propre, qu'à son effet sur la perméabilité intestinale d'un marqueur de passage (Arnold et al., 2019). Il convient donc d'en contrôler l'utilisation et d'en avoir une méthodologie fiable, basée sur des contrôles qualité maîtrisés : c'est tout l'objet de l'article ci-après.

Cet article de méthodologie vise donc par une approche originale de sensibiliser les lecteurs aux précautions à prendre et aux multiples contrôles à réaliser lors de l'usage de ce dispositif de Ussing pour l'étude des effets sur l'intestin d'une molécule pharmacologique. En effet, le modèle de chambre de Ussing reste utilisé dans le monde entier, avec environ 100 publications par an (sur tous types de tissus) depuis 1996 jusqu'à ce jour : cette stabilité s'explique par une difficulté technique inhérente à l'appareil ainsi que ses inconvénients (et notamment les temps d'étude limités par la viabilité tissulaire). De plus, lorsque l'on se penche davantage sur ces publications, il s'avère que les résultats sont très variables que ce soit pour la perméabilité de marqueurs (NaFlu et propranolol, tableau 1) que pour la résistance électrique transépithéliale (tableau 2) : c'est pourquoi il est nécessaire de procéder à des contrôles systématiques lors d'expérimentations sur ce modèle. Ce papier vise à clarifier et standardiser l'usage de la fluorescéine et du propranolol en chambre de Ussing.

Article 1 : « How to guarantee results from ex vivo studies based on Ussing chamber system for studying intestinal barrier integrity and function » (Journal of NeuroGastroenterology and Motility)

Les protocoles détaillés relatifs à cet article se trouvent en fin de manuscrit (voir Annexes) intitulés « Ussing Chamber experiment (Harvard Apparatus®) », « Measurement of sodium fluorescein permeability on Ussing chamber », « Dosage du furosémide et du propranolol par CLHP à polarité de phases inversée couplée à une détection spectrofluorimétrique », et « Etude morphologique d'un tissu intestinal par coloration et observation microscopique »

L'article ci-après traite donc de la méthodologie de chambre de Ussing pour une étude de la perméabilité d'une molécule mais aussi pour être capable d'observer un effet sur la barrière elle-même. Plus précisément, il s'agit de définir des critères qualité afin d'encadrer les expérimentations réalisées sur ce modèle, et donc de pouvoir d'une part avoir une meilleure reproductibilité des résultats, et d'autre part de pouvoir

effectuer des comparaisons fiables entre les données obtenues expérimentalement et celles référencées dans la littérature. Pour répondre à l'un des objectifs, il a été choisi d'établir des critères de qualité basés sur la perméabilité de marqueurs de passage fluorescents (fluorescéine sodique - paracellulaire et propranolol - transcellulaire), ainsi que sur les valeurs de résistance électrique transépithéliale. Le suivi de ces marqueurs en présence d'un promoteur d'absorption comme le C10 permet de proposer un autre contrôle de l'intégrité sur ce modèle de Ussing. Par ailleurs, les conséquences morphologiques – histologiques de la mise en place du tissu intestinal dans ce modèle ont été étudiées. Les résultats qui sont présentés dans cet article montrent un intérêt majeur de limiter la durée des expérimentations à 2 h, temps au-delà duquel la viabilité chute drastiquement – lue à travers une perméabilité accrue et une résistance diminuée. Cette étude propose les critères suivants : la perméabilité de la fluorescéine sodique ne doit pas excéder $15 \mu\text{g}\times\text{cm}^2\times\text{h}$ en fin d'expérimentation ($t = 2 \text{ h}$), tout comme la perméabilité du propranolol ne doit pas excéder $30 \mu\text{g}\times\text{cm}^2\times\text{h}$ le TEER doit être strictement supérieur à $30 \text{ ohms}\times\text{cm}^2$ au début de l'expérimentation ($t = 0$), et supérieur à 50% de sa valeur initiale après 30 min. De plus, l'utilisation d'un promoteur d'absorption, le C10, a significativement augmenté la perméabilité des marqueurs de passage – NaFlu comme propranolol. Le C10 peut donc être utilisé comme un marqueur positif de l'intégrité de la barrière, fonctionnelle : les modifications et réarrangements du cytosquelette liés à son utilisation ne pourront avoir lieu que si les cellules épithéliales sont viables. Enfin, l'étude histologique a démontré une conservation des principaux éléments de la structure intestinale. Ces travaux permettent désormais d'encadrer les expérimentations *ex vivo* en chambre de Ussing, et de s'affranchir d'un certain nombre de biais induits par une mauvaise manipulation du tissu intestinal (qui se verrait sur la valeur initiale du TEER alors fortement diminuée, $< 30 \text{ ohms}\times\text{cm}^2$), ou par un temps de préparation du tissu intestinal trop long après son prélèvement de l'organisme animal (qui se traduirait par une perméabilité intestinale anormalement accrue). Ainsi, les expérimentations menées au laboratoire succédant à ces travaux ont pris – et continueront de prendre – en compte ces résultats et ces critères qualité, afin d'avoir à la fois des résultats fiables et au plus juste scientifiquement, et de disposer alors d'un modèle d'étude pouvant permettre la détermination d'une perméabilité mais aussi un suivi des effets pharmacologiques d'un composé.

How to guarantee results from *ex vivo* studies based on Ussing chamber system for studying intestinal barrier integrity and function

Romain SCHMITT¹, Hui MING^{1,2}, Franck HANSMANNEL³, Igor CLAROT¹, Caroline GAUCHER¹, Isabelle LARTAUD¹, Anne SAPIN-MINET^{1*}

¹ *Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France.*

² *present address Hui.*

³ *Université de Lorraine, Inserm NGERE, F-54000 Nancy, France.*

*Correspondence to: Anne SAPIN-MINET, Université de Lorraine, CITHEFOR EA 3452, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France, anne.sapin@univ-lorraine.fr

Journal of Neurogastroenterology and Motility, IF 2019 = 3.008

Abstract:

The Ussing chamber system allows *ex vivo* studies and is mostly used to assess drug intestinal permeability, although *butting* up against a large variability of results in the literature. Our purpose is to determine experimental design and quality control for interpretation of intestinal permeability and barrier integrity when using this model. Hematoxylin-eosin and alcian blue staining showed morphological alteration of rat ileum segments after 2 hours inside Ussing chambers. Trans-epithelial electrical resistance (TEER, a marker of intestinal integrity) was thus evaluated during 2 hours, as flux of sodium fluorescein (NaFlu, a marker of medium intestinal permeability using paracellular transport) or propranolol (a marker of high permeability, transcellular transport) with / without a well-recognized absorption enhancer, sodium decanoate (C10). Firstly, quality controls were defined on control conditions to set the validity of the experiments: quality control for permeability markers were set as mean + 2×sd for each timepoint of Ussing chamber experiment. Likewise, a criterion was defined for TEER, as > 30 ohms×cm² at t = 0 h and > 50% of initial TEER after 30 min of experiment. Secondly, 2-hours exposure to C10 significantly doubled intestinal permeability of NaFlu and propranolol. Threshold definition, invariable controlled values definition opens new opportunities for studying pharmacological drugs effect on the intestine barrier.

Keywords: Ussing chamber, intestinal barrier integrity, intestinal viability, quality control

Introduction

Several physiological actors ensure integrity and permeability of the intestinal barrier which plays a critical role in the defense against external environmental aggressions. The intestine mucosa allows renewing of the epithelium through stem cells every 3 to 5 days [1]. Cell junctions – which are divided, from intraluminal to deeper parts of the intestinal wall, into tight junctions, adherent junctions, and desmosomes – are the main elements involved in the maintenance of integrity (desmosomes) and function of the intestinal barrier. Tight junctions and adherent junctions especially regulate intestinal permeability and absorption of luminal elements through conjunctive tissues to intestinal vessels [2]. Under physiological conditions, intercellular crossing is limited to small molecules. A selective crossing through enterocytes is also possible using transporters. Mucus – composed of glycoproteins (mainly mucins) and forming a gel recovering the epithelium [3] – also contributes to intestine integrity. Immune

cells, in Peyer's patches and in conjunctive tissue, reinforce the role and the maintenance of the barrier integrity by an innate immune response and a control of inflammation [4]. Finally, the intestine microbiota takes over food components that cannot be absorbed such as fibers and digestible polysaccharidic compounds and contributes to maturation and renewing of the epithelium, and to cellular differentiation [5].

Amongst the different models used to evaluate intestine permeability, the Ussing diffusion chamber model developed by Hans Henriksen Ussing in 1946, allows *ex vivo* study of the transport of ions, nutrients or drugs through a donor to an acceptor compartments separated by an insert maintaining oriented tissue [6]. The tissue can be of various origins (intestine, skin, cornea...) and is generally oriented in the system: for our purpose, the intestine tissue is oriented from luminal side (donor compartment) to mucosal side (acceptor compartment). Both sides of the intestinal tissue are immersed in an osmotic solution maintained at 37°C. This technique permits to study absorption differences, by dosage of components in both compartments and inside the tissue, according to the different intestinal sections. It has some advantages as it requires low amounts of molecules (compared to oral administration for example) and it can help to establish properties of the compound in view of the biopharmaceutics classification system (BCS): according to the BCS, a drug suitable for oral administration should possess a high solubility in aqueous media and a high permeability through intestinal membrane. The biological effect of an active substance crossing the intestinal barrier is usually evaluated using markers of intestinal permeability (such as dextran-FITC, inulin-FITC, sodium fluorescein, NaFlu, medium permeability, paracellular transport / propranolol, high permeability, transcellular transport). Intestinal integrity is reflected by the measurement of the trans-epithelial electrical resistance (TEER) as a technical control of Ussing chamber experiment. The later traduces the viability of the tissue and witnesses the open state of cell junctions [7]. It also permits to evaluate the transport way of a drug, such as passive or active transport (such as in Caco-2 cells monolayer model, [8]).

Since 1996, there are around 100 publications per year speaking about studies on the model of Ussing chamber, whatever the tissue's type. This publication is stable year after year, and this trend can be explained by the technical difficulties inherent from this model. Indeed, as shown in Tables 1 and 2 below, there is a large variability between apparent permeability values obtained for both NaFlu and propranolol markers, and according to TEER measurements. From this, it is crucial to proceed to systematic controls when performing this kind of experiments. This paper aims to clarify and standardize the use of NaFlu and propranolol on the Ussing chamber model.

Table 3: Values of apparent permeability (P_{app} , $\text{cm} \times \text{s}$) of sodium fluorescein (NaFlu) and propranolol referenced in the literature, obtained in the ex vivo model of Ussing chamber

	Intestinal segment	Duration (h)	Area (cm^2)	P_{app} ($\text{cm} \times \text{s}$) \pm standard deviation	References
NaFlu	Rat, jejunum (non-stripped)	1.75	1	$3.00 \times 10^{-7} \pm 2.00 \times 10^{-8}$	[12]
	Rat, ileum (stripped)	2	1.78	$6.10 \times 10^{-7} \pm 2.60 \times 10^{-7}$	[13]
	Mouse, jejunum (non-stripped)	1.75	0.3	$3.70 \times 10^{-6} \pm 6.00 \times 10^{-7}$	[14]
	Rat, jejunum (non-stripped)	3	1	$5.03 \times 10^{-6} \pm 2.50 \times 10^{-7}$	[15]
	Rat, jejunum	4	1	$2.80 \times 10^{-3} \pm 2.00 \times 10^{-3}$	[17]
Propranolol	Small intestine (non-stripped)	3	0.64	$3.00 \times 10^{-6} \pm 0.50 \times 10^{-6}$	[18]
	Rat, ileum (serosa removed)	1 to 3	0.64	$20 \text{ to } 80 \times 10^{-6}$	[19]
	Rat, ileum (stripped)	2.5	1.14	$41.30 \times 10^{-6} \pm 3.80 \times 10^{-6}$	[20]

Table 4: Values of transepithelial electrical resistance (TEER, $\text{ohm} \times \text{cm}^2$) referenced in the literature, obtained in the ex vivo model of Ussing chamber

	Intestinal segment	TEER ($\text{ohm} \times \text{cm}^2$) \pm standard deviation	References
TEER	Rat, ileum	46 ± 1	[21]
	Rat, colon	139 ± 3	
	Rat, jejunum	58 ± 8	[22]
	Rat, ileum, or duodenum	75-100	[23]
	Rat, jejunum	82 ± 12	[24]

Rat, jejunum	124 ± 4	[25,26]
Rat, ileum	117 ± 4	
Rat, cecum	111 ± 4	
Rat, colon	231 ± 8	
Rat, small intestine	54 ± 2	[27]
Rat, colon	116 ± 4	
Rat, small intestine	50-100	[7]
Rat, colon	300-400	
Rat, gastric mucosa	2000	
Rat, jejunum (stripped)	96 ± 5	[28]
Homme, small intestine	42	[29]
Rat, jejunum	58 ± 8	[30]
Rat, jejunum	56 ± 18	[17]

The Ussing chamber system can also be used to study selective permeability of the tissue, using some absorption enhancers, such as proton pump inhibitors [9]. Another type of absorption enhancer, sodium decanoate (C10), is known to increase the permeability of the intestinal barrier by enlargement of tight junction [10]. This molecule acts by increasing the intracellular concentration of calcium ions, after activation of phospholipase C at the plasma membrane. This leads to activation of myosin-light chain kinase by calcium-calmodulin binding, contraction of actin microfilament, cadherin endocytosis and so tight junction opening [10]. Some experiments used C10 to increase intestinal permeability for reversible effect [11]. Otherwise, this model has some disadvantages such as tissue viability limited to 3 hours [6].

To define Quality Controls (QC) for a Ussing chamber experiment, intestinal barrier permeability and integrity were evaluated by measuring apparent permeability (P_{app}) of NaFlu or propranolol, and TEER. C10 was proposed as a QC of functional barrier. Additionally, a histological study was also performed from 30 min to 2 hours with hematoxylin-eosin staining to observe the general structure (intestinal walls and villus), and alcian blue to observe the mucosa at the surface of the intestine. Finally, this study proposed the establishment of QC for Ussing chamber, technique presenting many critical parameters inducing variability of results. Definition of adapted control can help to mark off technical limits.

Material and Methods

Substances used

All reagents were of analytical grade and all solutions prepared with ultrapure deionized water ($>18.2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$ at 25°C). All reagents (including sodium fluorescein, propranolol, sodium decanoate, paraformaldehyde, sucrose, phosphate buffer saline, hematoxylin, eosin, alcian blue 8GX) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Paraffine and xylene were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), and Poly-Mount® was purchased from Polysciences (Hirschberg an der Bergstrasse, Germany).

Animals and ethical statement

Intestinal barrier integrity and permeability were evaluated on ileum isolated from 10 ± 2 weeks old male normotensive Wistar rats ($350 \pm 50 \text{ g}$, Janvier Laboratories, Le Genest-St-Isle, France). All experiments were performed in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals in the respect of the 3 Rs' requirements for Animal Welfare. The protocols and procedures were approved by the advisory regional ethical committee on animal experiments: "Comité d'Ethique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale" (protocol agreements NitroVivo n°APAFIS#1614-2015090216575422 and BisNitroVivo n°APAFIS#15598-2018061619129620v3). Animals were kept under standard conditions (temperature: $21 \pm 1^\circ\text{C}$, hygrometry $60 \pm 10\%$, light on from 6 am to 6 pm) and had free access to standard diet and water. Isolated rat intestine (ileum, weight $100 \pm 5 \text{ mg}$, length 1 cm) was obtained after sacrifice (anesthesia with sodium pentobarbitone $180 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, intraperitoneal injection, Sanofi Santé Nutrition Animale, Libourne, France, administrated with heparin $1000 \text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ heparin Choay, penis vein, followed by exsanguination). The intestine was immediately placed in cold Krebs-Henseleit buffer (NaCl 119 mM , NaHCO_3 24 mM , KCl 4.7 mM , MgSO_4 1.2 mM , KH_2PO_4 1.2 mM , $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mM and glucose 10 mM ; pH adjusted to 7.4 and equilibrated with $95\% \text{ O}_2 / 5\% \text{ CO}_2$), then the fat tissue along the mesenteric attachment was removed and the ileum was longitudinally opened. Segments were then pinned on insert and immediately placed in Ussing Chamber system. A 6-Ussing Chamber bench (P2404 Physiologic Instrument®, Easymount LVSYs, Harvard Apparatus) was used. In each chamber, compartments were filled with Krebs-Henseleit buffer (2.5 mL), temperature was maintained at 37°C in continuous circulation (using a water bath) and pH was maintained at 7.4 with gas infusion ($12 \text{ mL}/\text{min}$ using a peristaltic pump). A current electrode and a voltage electrode (multimeter, Millicell-ERS2, Millipore®; electrodes P2020, Physiologic Instrument®)

were placed in each compartment for TEER measurement. TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$) was determined by the $U = R \times I$ law after inducing a current from one compartment to the other, with U the potential gradient, I the induced current by the apparatus and R the resistance of the tissue (Ω) multiplied by the tissue area separating both compartments (cm^2).

Permeability experiments

NaFlu (2.7 mM) or propranolol (1.0 mM) permeabilities (from donor/luminal compartment to acceptor/mucosal compartment) were assessed by measuring changes in concentration of the compound with time. Samples (250 μL of medium) were harvested in the acceptor compartment at different times (every 30 min, until 2 hours; each removed volume was replaced by an equal volume of 37°C pre-heated Krebs-Henseleit buffer) for the quantification of the permeability marker flux. [NaFlu] was evaluated with a spectro-fluorimeter (BioTek®, $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$). For propranolol, samples were harvested in the acceptor compartment every 30 min, acidified in phosphoric acid, and diluted 5-times in the HPLC mobile phase (30/70 v/v acetonitrile / triethylamine phosphate). Then, samples were analyzed by reversed-phase HPLC coupled with spectrofluorimetric detection (HPLC-FL). A LiChrospher RP C18 column (4 x 125 mm, 5 μm , Macherey-Nagel), an autosampler (SpectraSeries AS300, Thermo Separation Products, USA) and a spectrofluorimetric detection (FP-2020PLUS, Jasco, Japan) (gain = 100, attenuation = 1) with excitation and emission wavelengths of 230 and 340 nm, respectively, were used for quantification. This method was firstly validated (linearity range, accuracy, and precision), by building six five-point calibration curves from 0.5 to 10.0 μM .

The permeability marker flux (J , Eq. (1)) and apparent permeability (P_{app} , Eq. (2)) through the intestine were calculated according to the following formulae:

$$J = \left(\frac{dQ}{A \cdot dt} \right) \quad \text{Eq. (1)}$$

$$P_{\text{app}} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \times \left(\frac{1}{AC_0} \right) = \frac{J}{C_0} \quad \text{Eq. (2)}$$

$\left(\frac{dQ}{dt} \right)$ is the the slope of the steady state portion of the amount of the drug permeated during time t , A the tissue area separating both compartments and C_0 the initial concentration in active molecule; units: J in $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, P_{app} in $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$; Q in mg; t in s; A in cm^2 , C_0 in $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Evaluation of the effects of C10 on intestine permeability and integrity

A second series of intestinal segments was exposed to C10 (10 mM, donor compartment) with 10 min equilibrium before starting the experiment for 2 hours, to measure permeability markers.

Analytical methods validation

Both analytical methods, spectrofluorometry for sodium fluorescein (1) and high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-FL) for propranolol (2), were validated with respect to specificity, linearity, precision and accuracy, as well as detection limit (DL).

- (1) The specificity of the method was investigated by analyzing fluorescein samples to confirm that there was no interference in the buffer media. Calibration curves were prepared with sodium fluorescein solutions ranging from 0.10 to 0.75 μM (5 concentrations, $n = 3$) and were fitted using least squares linear regression. A good linearity was observed (typical equation: $y = (1981920 \pm 22979)x + (59110 \pm 6462)$) with correlation coefficient > 0.99 . The sensitivity of the method was determined by the DL with a value of 0.10 μM . The inter-day accuracy and precision were evaluated by assaying triplicate samples of low, middle, and high concentrations (0.10 μM , 0.50 μM and 0.75 μM , respectively). The inter-day variation (intermediate precision, $n = 3$) was determined for three consecutive days. The precision was expressed as the relative standard deviation (RSD) and the accuracy was evaluated by comparing the calculated concentration of samples to theoretical ones. Satisfactory results for precision (RSD $< 2.5\%$ for 0.10 μM , 0.50 μM and 0.75 μM) and for accuracy ($98.4 \pm 5.6\%$) were obtained.
- (2) Validation of HPLC-FL was performed in the same manner as for the previous point with a distinguish between two linearity ranges, respectively for low concentrations and high concentrations of propranolol. Calculated validation parameters are presented in Table 3:

Table 3: Validation parameters of high-performance liquid chromatography coupled to fluorescent detection (HPLC-FL), for propranolol, in terms of linearity, detection limits (DL), precision and accuracy ($n = 3$)

Validation parameters	Low concentrations calibration curve (0.05 - 0.50 μM, 5 concentrations, $n = 3$)	High concentrations calibration curve (0.50 - 7.50 μM, 5 concentrations, $n = 3$)
Linearity	$y = 7527x + 25$	$y = 795x + 207$
Correlation coefficient (R)	$R > 0.99$	$R > 0.99$
Detection limit	0.01 μM	Not determined
Precision: relative standard deviation (RSD)	RSD $< 1.4\%$	RSD $< 12.1\%$
Accuracy	$101.4 \pm 6.3\%$	$96.9 \pm 14.4\%$

Histological study

The histological study was performed on rat intestine following an Ussing experiment. Two conditions were prepared during these experiments: intestine tissue not placed in Ussing chamber (fresh), and intestine after being placed in Ussing chamber for 2 h (Ussing). Tissues were rinsed with pre-heated Krebs buffer, and then wrapped carefully, in a manner that villi are to the extern side of the roll. The rolls of tissues were then frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C until paraffine inclusion for histological study. Slices of 10- μ m sections using microtome were cut, and transferred on histological slides, which were previously recovered with glycerin albumin. Slides were conserved in a box at room temperature before staining step. After being deparaffined, slides were stained with hematoxylin, eosin and alcian blue, and were mounted using a special mounting medium (Poly-Mount®) to recover the slices. After slices being recovered with microscope slides, there was conserved at room temperature, in the dark, until microscope observation.

Statistical analysis

Results are expressed as mean (standard error of the mean, SEM). Statistical comparisons were performed using a one-way ANOVA (or two-way when appropriate). Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (GraphPad Software version 5.0, San Diego, USA). “n” corresponds to the number of intestinal segments used; “N” corresponds to the number of animals used.

Results

Assessment of quality controls

Quality controls for tissue viability in Ussing chamber should be validated to obtain reliable result reflecting *ex vivo* intestine viability. In a preliminary study, NaFlu flux and TEER values significantly changed after $t = 3$ h, indicating a loss of intestinal barrier integrity (results not shown). Such a drastic fall in intestine tissue viability was also observed after 2 hours in the literature [14]. Therefore, duration of the Ussing chamber experiments was limited here to 2 h. Distribution frequencies of permeability and TEER values obtained during this 2-hours period were observed as Gaussian (Figure 1 A, C, E), allowing to consider the results as parametric values for next statistical analyses. As it is not possible to have negative values in terms of permeability, the abscissa axis begins to the zero origin.

Permeabilities and TEER scatter plots followed linear evolutions with time (Figure 1 B, D, F), with very restricted confidence interval at 95% (IC95%). IC95% was less dispersed for NaFlu than for propranolol, which may be due to the different mechanisms of permeability for these

two markers.

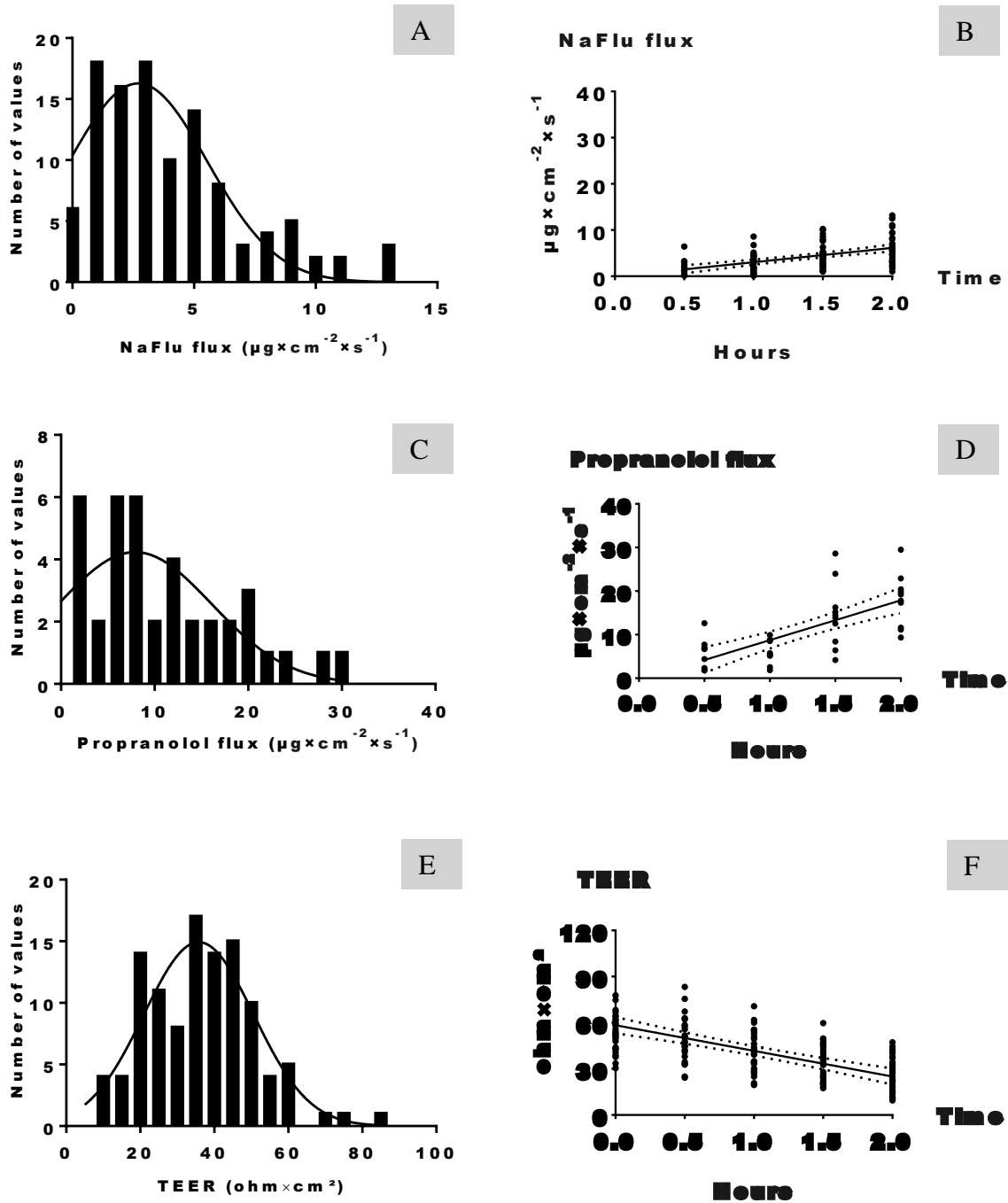


Figure 1. Distribution frequencies (A, C, E) and linear evolutions with time (confidence interval 95%, B, D, F) for sodium fluorescein (A, B) and propranolol (C, D) permeability values, and for trans-epithelial electrical values (TEER, E, F) obtained during 2 h in Ussing chamber.

Considering the results as parametric values, we calculated mean values at each time point of measurements for NaFlu, propranolol permeabilities and TEER of intestinal tissues placed in *ex vivo* Ussing chambers for 2 hours (Figure 2), and fixed the cut-off values as mean + 2×sd. The cut-off values correspond to exclusion quality controls for next experiments: we considered that permeabilities values out of those quality controls mean that the tissue was not correctly set in the system, or set with a too large time, or that the tissue was too much extended or broken during the setting.

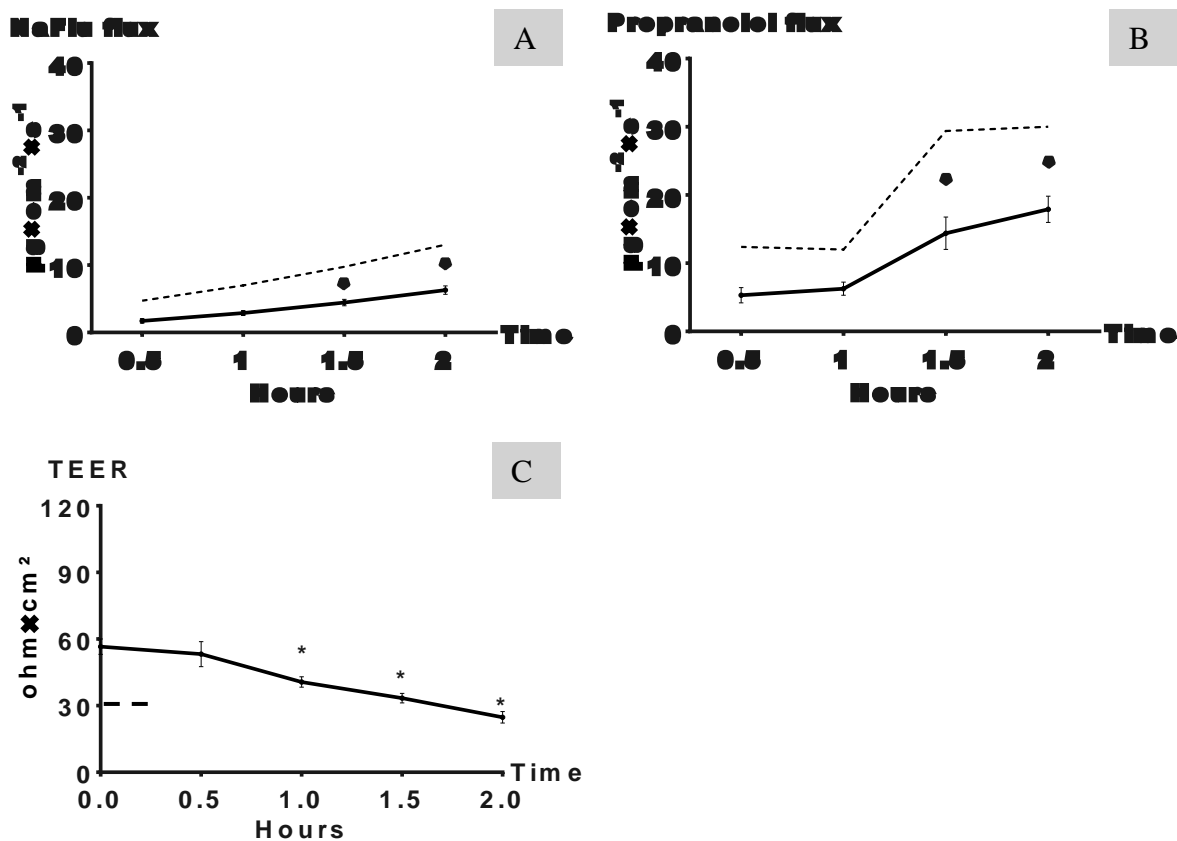


Figure 2. Quality control of NaFlu (A) and propranolol (B) permeability result during 2 h in Ussing chamber (--- quality control: calculated as mean + 2×sd at each time point); and for transepithelial electrical resistance (TEER, (C)). *p < 0.05, statistic difference vs 0.5 h; one-way ANOVA. NaFlu and TEER were performed in parallel (n = 30 intestinal sections; N = 23 rats), and propranolol was performed as another experimental series (n = 10 intestinal sections; N = 4 rats).

NaFlu flux increased from 1.7 ± 0.3 to $6.3 \pm 0.6 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ (Figure 2A), and propranolol flux from 5.3 ± 1.1 to $18 \pm 2 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ (Figure 2B) between 0.5 and 2 h, with statistical significant increases from 1.5 h. This traduced loss of viability during the 2 hours' experiment. TEER values fell with time, from $56 \pm 3 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$ at 0 h to $25 \pm 3 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$ at 2 h with statistical differences at 1.5 h and 2 h compared to t = 0 h.

For TEER, the cut-off value was defined at t = 0 h, according to the literature [7]. Therefore, lower TEER values than $30 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$ at the beginning of the experiment (t = 0 h) and a loss of TEER of more than 50% after 0.5 h, witnessed too high extension or rupture of the tissue during setting and insufficient viability to pursue the study.

Effects of C10 on intestine permeability

C10 statistically increased permeabilities of NaFlu and propranolol compared to control conditions, all along the 2 hours period of experiment (Figure 3).

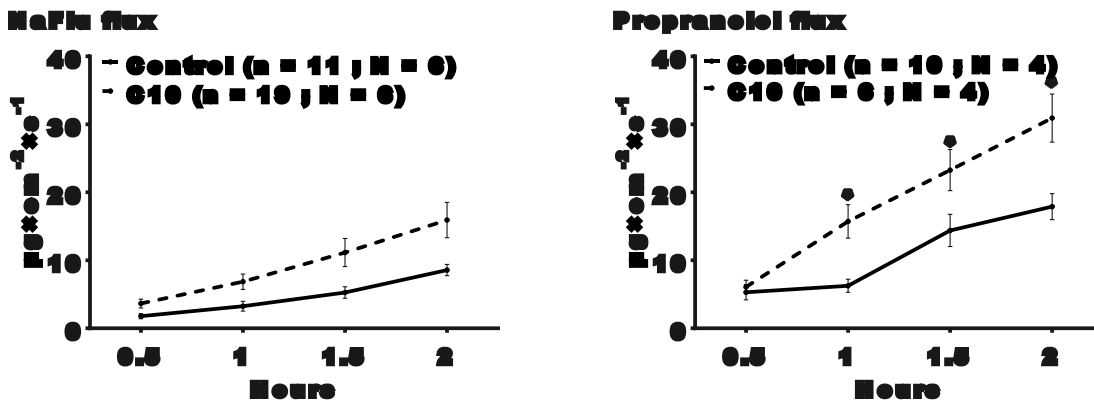


Figure 3. Permeability of NaFlu (A) and propranolol (B) during 2 h in Ussing chamber, without (full line) or with exposure to C10 (dotted line). * $p < 0.05$, statistic difference vs 0.5 h; two-way (treatment with/without C10; time) ANOVA

Impact of the Ussing chamber on the histological structure of the intestine

The results in Figure 4 clearly shows that all the structures of the intestine, without stripping, were conserved during the experiment: we observed mucus, goblet cells located in the crypts, and fingerlike villi. Otherwise, there were clearly some morphological alterations highlighted due to this experimental model, through less distinguishable villi and a loss of well-defined finger shapes, and a shrinkage of the tissue.

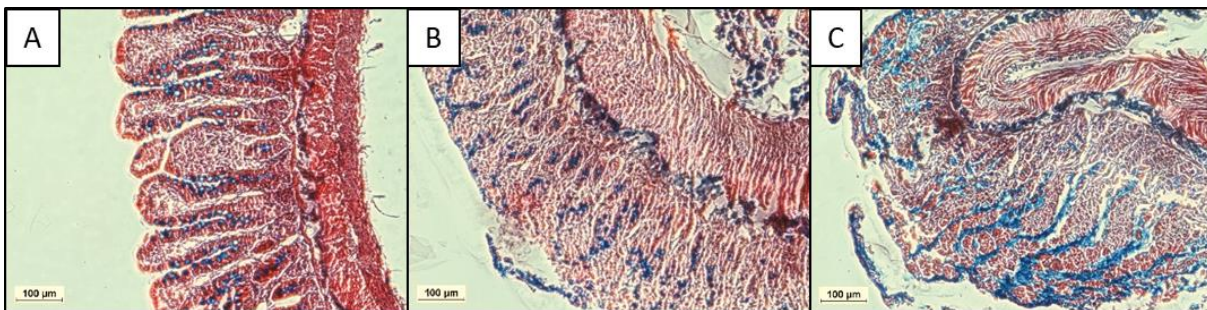


Figure 4. Microscopic imaging of intestinal tissue, after paraffine inclusion, of a fresh intestine (A) or a tissue placed in Ussing chamber for 1.5 h (B) or 2 h (C). Slides of 10 µm were stained with hematoxylin (intestinal wall), eosin (villus) and alcian blue (mucosa). White arrows = villus; black arrows = conjunctive tissue; Light microscope Nikon Eclipse Ti-S, NIS-Element F 3.0 software, $\times 100$.

Discussion and conclusion

The Ussing chamber system is a simple, but powerful technique to investigate the intestinal permeability. In the present study, Ussing Chamber system was chosen to investigate the intestinal barrier integrity by following the intestinal permeability to a paracellular marker

(NaFlu) because of its convenience, effectiveness (6 tissues in parallel) and better mimicking *in vivo* environment in comparison to Caco-2 cells monolayer. Upon removal from the animal, an *ex vivo* intestinal preparation and incubation in Krebs-Henseleit buffer has limited viability [6]. Thus, the limitation of this system is the difficulties to ensure the tissue viability. There is not uniform quality control to verify the tissue viability in the literatures. TEER and paracellular marker permeability is mostly used as the main indicators. For example, TEER remaining within 15% of the starting value was considered as indicator of viable tissue, and tissues were excluded where TEER fell by more than this in some literatures [31,32]. Marker permeated less than 0.01% was indicated in the literature as tissue viability indicator [33]. There is not standard quality control. Thus, to ensure that we can obtain the reliable result with Ussing chamber system, the validation of quality controls was performed by both TEER value and paracellular marker (NaFlu) permeability. The result indicated that the tissue with a TEER value lower than $30 \Omega \times \text{cm}^2$ at the beginning of experiment or a decrease more than 50% of the initial TEER value after 0.5 h should be discarded because of impaired barrier integrity during the preparation. The higher standard deviation in TEER results observed in the study, compared to NaFlu flux variation, is maybe due to the measurement apparatus which is not totally appropriate, and a specific electrophysiological measurement apparatus could help to reduce variations. To control the tissue viability during experiment, the NaFlu permeability in the control group at every experiment without any treatment was used as a reference. If the flux of NaFlu for control group were outliers, so above mean + $2 \times \text{sd}$ for each time point of validation results, the data from the whole experiment was exclude. Therefore, all the experiments and data were performed under these quality controls to get reliable and analyzable result. It should be kept in mind that quality controls for NaFlu flux can be only used for control condition, as the use of pharmacological drugs can change the behavior of the intestine, and so its permeability. Moreover, according to our results and to the literature, it is recommended to not exceed a certain time of experiment in *ex vivo* studies based on Ussing chamber system, and experiments are limited to less than 3 h, and generally to 2 h [34,35]. As our TEER results are statistically different from 1.5 h of Ussing chamber, it can be more judicious to limit the duration of experiments to 1.5 h maximum. The results obtained of NaFlu flux and TEER values go in the same idea, as a diminution of TEER is due to tight junctions opening, and so the paracellular marker NaFlu is more able to cross the intestinal barrier and its permeability is increased. The permeability study of propranolol, a marker which use transcellular transport, permitted to define also quality controls, through mean + $2 \times \text{sd}$ for each time point, and values above this value can traduce a loss of viability of the intestine, and results are excluded. The results obtained in this study are correlated with the other studies in the literature (19–21). The statistical difference observed from 1.5 h can be also the consequence of tight junction opening,

that can lead to a sum of both transport ways: transcellular, but also paracellular transport (due to the loss of viability).

The use of these two permeability markers permits to focus on the joint epithelium, and from these elements, it is interesting to study the tissue ability to answer in a functional point of view, after a stimulation by a pharmacological molecule. Moreover, the advantage of these methods validation permits to compare results from various laboratories, various animals, various models, opening a large scope to interdisciplinary and multi-approaches studies. The use of some classical absorption enhancers, such as proton pump inhibitors, is important, whatever the barrier (intestine, brain, ...). In this, we decided to use a well-known absorption enhancer, the sodium decanoate (also called sodium caprate, or C10). This compound is known to induce an internalization of Ca^{2+} that leads to contract actin filaments and finally to open the tight junctions. The results obtained showed that C10 increased the flux of NaFlu and propranolol, and its impact on the permeability is higher for propranolol: this can be explained, again, by a sum of transport ways (transcellular way from propranolol, and paracellular way from tight junction opening by C10 mechanism of action).

To investigate deeper in this study, we decided to check if the Ussing chamber could have an impact on histological structure of the intestine, when it is placed in this *ex vivo* model. Our results showed that all the structures of the intestine are conserved during the experiment, but there is a loss of the fingerlike villi shape, and a shrinkage of the tissue morphology. There is to mention that contrary to other studies in the literature, we decided to not strip the tissue, with the goal to observe the results of a full-complete and functional intestinal barrier.

To conclude, if *ex vivo* studies on Ussing chamber system, as every experimental model, has some limitations (such as not a full -organism but only an excised tissue, a limited experiment's duration, and a relatively low-throughput), it has also a lot of advantages: indeed, it permits to study different parts of the intestine (from duodenum to colon), to evaluate the permeability of a drug in both sides (donor to acceptor, or acceptor to donor compartments) [6,34]. So, the Ussing chamber system can be very useful to follow the intestinal barrier integrity, but all precautions shall be taken, especially with the use of a control molecule such as C10, and with regular controls at each experiment to be sure of the reliability of the results acquired. Other parameters could also be evaluated such as tortuosity of the cells [37], and it can be interesting to further evaluate the intestinal barrier, with more parameters, to have a full-controlled use of the Ussing chamber system. Finally, by taking all these crucial parameters into consideration, this model can be very strong to study the impact of a drug on the intestinal barrier permeability and integrity.

Acknowledgements

The CITHEFOR EA3452 lab was supported by the Université de Lorraine, Région Lorraine and FEDER: the funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors thank Pr. Pierre LEROY for his scientific point of view on methodology validation. The authors thank Animalerie du Campus Biologie Santé, Université de Lorraine, for its expertise in animal welfare and experiments.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- [1] C.S. Potten, G. Owen, D. Booth, Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands, *J. Cell. Sci.* 115 (2002) 2381–2388.
- [2] J.R. Turner, Show me the pathway! Regulation of paracellular permeability by Na(+)-glucose cotransport, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41 (2000) 265–281.
- [3] Y.S. Kim, S.B. Ho, Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress, *Current Gastroenterology Reports.* 12 (2010) 319–330. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0131-2>.
- [4] L.V. Hooper, A.J. Macpherson, Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota, *Nature Reviews Immunology.* 10 (2010) 159–169. <https://doi.org/10.1038/nri2710>.
- [5] D. Payros, T. Secher, M. Boury, C. Brehin, S. Ménard, C. Salvador-Cartier, G. Cuevas-Ramos, C. Watrin, I. Marcq, J.-P. Nougayrède, D. Dubois, A. Bedu, F. Garnier, O. Clermont, E. Denamur, P. Plaisancié, V. Theodorou, J. Fioramonti, M. Olier, E. Oswald, Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis, *Gut Microbes.* 5 (2014) 313–512. <https://doi.org/10.4161/gmic.28932>.
- [6] L.L. Clarke, A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 296 (2009) G1151–G1166. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90649.2008>.
- [7] B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch, H.E. Abaci, M.L. Shuler, J.J. Hickman, TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems, *Journal of Laboratory Automation.* 20 (2015) 107–126. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>.
- [8] J. Bonetti, Y. Zhou, M. Parent, I. Clarot, H. Yu, I. Fries-Raeth, P. Leroy, I. Lartaud, C. Gaucher, Intestinal absorption of S-nitrosothiols: Permeability and transport mechanisms, *Biochemical Pharmacology.* 155 (2018) 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.018>.
- [9] M. Gabello, M.C. Valenzano, E.P. Zurbach, J.M. Mullin, Omeprazole induces gastric transmucosal permeability to the peptide bradykinin, *World J. Gastroenterol.* 16 (2010) 1097–1103.
- [10] M. Hayashi, M. Tomita, Mechanistic Analysis for Drug Permeation Through Intestinal Membrane, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 22 (2007) 67–77. <https://doi.org/10.2133/dmpk.22.67>.
- [11] D.J. Brayden, S. Maher, B. Bahar, E. Walsh, Sodium caprate-induced increases in intestinal permeability and epithelial damage are prevented by misoprostol, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 94 (2015) 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.013>.

- [12] K. Berginc, A. Kristl, J. Trontelj, Physiological barriers to the oral delivery of curcumin, (2012) 518–524. <https://doi.org/10.1691/ph.2012.1112>.
- [13] N. Elginaid Osman, B. Weström, Q. Wang, L. Persson, B. Karlsson, Spermine affects intestinal in vitro permeability to different-sized molecules in rats, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 120 (1998) 211–216. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)00042-5).
- [14] R.A. Forsgård, R. Korpela, L.K. Stenman, P. Österlund, R. Holma, Deoxycholic acid induced changes in electrophysiological parameters and macromolecular permeability in murine small intestine with and without functional enteric nervous system plexuses, *Neurogastroenterology & Motility*. 26 (2014) 1179–1187. <https://doi.org/10.1111/nmo.12383>.
- [15] I. Legen, A. Kristl, pH and energy dependent transport of ketoprofen across rat jejunum in vitro, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 56 (2003) 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00039-0).
- [16] J. Becker, D. Ott, M. Diener, Impact of Sensitization and Inflammation on the Interaction of Mast Cells With the Intestinal Epithelium in Rats, *Front. Physiol.* 10 (2019) 329. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00329>.
- [17] A.G. Markov, O.N. Vishnevskaya, L.S. Okorokova, A.A. Fedorova, N.M. Kruglova, O.V. Rybalchenko, J.R. Aschenbach, S. Amasheh, Cholera toxin perturbs the paracellular barrier in the small intestinal epithelium of rats by affecting claudin-2 and tricellulin, *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 471 (2019) 1183–1189. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02294-z>.
- [18] K. Leithner, V. Grabovac, K. Albrecht, J. Hombach, G. Klima, A. Bernkop-Schnürch, Permeation studies on freshly excised rat gastric mucosa: influence of pH, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 37 (2011) 518–525. <https://doi.org/10.3109/03639045.2010.527348>.
- [19] B.I. Polentarutti, A.L. Peterson, A.K. Sjöberg, E.K. Anderberg, L.M. Utter, A.L. Ungell, Evaluation of viability of excised rat intestinal segments in the Ussing chamber: investigation of morphology, electrical parameters, and permeability characteristics, *Pharm. Res.* 16 (1999) 446–454.
- [20] A.L. Ungell, S. Nylander, S. Bergstrand, A. Sjöberg, H. Lennernäs, Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat, *J Pharm Sci*. 87 (1998) 360–366. <https://doi.org/10.1021/js970218s>.
- [21] D.J. Brayden, V.A. Bzik, A.L. Lewis, L. Illum, CriticalSorb™ Promotes Permeation of Flux Markers Across Isolated Rat Intestinal Mucosae and Caco-2 Monolayers, *Pharmaceutical Research*. 29 (2012) 2543–2554. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0785-6>.
- [22] L.C. Da Silva, T.L. Da Silva, A.H. Antunes, K.R. Rezende, A Sensitive Medium-Throughput Method to Predict Intestinal Absorption in Humans Using Rat Intestinal Tissue Segments, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 104 (2015) 2807–2812. <https://doi.org/10.1002/jps.24372>.
- [23] J.D. Eichman, J.R. Robinson, Mechanistic studies on effervescent-induced permeability enhancement, *Pharm. Res.* 15 (1998) 925–930.
- [24] R.M. Menon, W.H. Barr, Comparison of ceftibuten transport across Caco-2 cells and rat jejunum mounted on modified ussing chambers, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 24 (2003) 299–308. <https://doi.org/10.1002/bdd.366>.
- [25] H. Mineo, M. Amano, H. Chiji, N. Shigematsu, F. Tomita, H. Hara, Indigestible disaccharides open tight junctions and enhance net calcium, magnesium, and zinc absorption in isolated rat small and large intestinal epithelium, *Dig. Dis. Sci.* 49 (2004) 122–132.
- [26] H. Mineo, H. Hara, N. Shigematsu, Y. Okuhara, F. Tomita, Melibiose, difructose anhydride III and difructose anhydride IV enhance net calcium absorption in rat small

- and large intestinal epithelium by increasing the passage of tight junctions in vitro, *J. Nutr.* 132 (2002) 3394–3399. <https://doi.org/10.1093/jn/132.11.3394>.
- [27] S.B. Petersen, G. Nolan, S. Maher, U.L. Rahbek, M. Guldbrandt, D.J. Brayden, Evaluation of alkylmaltosides as intestinal permeation enhancers: Comparison between rat intestinal mucosal sheets and Caco-2 monolayers, *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 47 (2012) 701–712. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.08.010>.
- [28] T. Uchiyama, T. Sugiyama, Y.S. Quan, A. Kotani, N. Okada, T. Fujita, S. Muranishi, A. Yamamoto, Enhanced permeability of insulin across the rat intestinal membrane by various absorption enhancers: their intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of n-lauryl-beta-D-maltopyranoside, *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (1999) 1241–1250.
- [29] E.G. van de Kerkhof, A.-L.B. Ungell, A.K. Sjöberg, M.H. de Jager, C. Hilgendorf, I.A.M. de Graaf, G.M.M. Groothuis, Innovative Methods to Study Human Intestinal Drug Metabolism in Vitro: Precision-Cut Slices Compared with Ussing Chamber Preparations, *Drug Metabolism and Disposition.* 34 (2006) 1893–1902. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.011148>.
- [30] S. Žakelj, I. Legen, M. Veber, A. Kristl, The influence of buffer composition on tissue integrity during permeability experiments “in vitro,” *International Journal of Pharmaceutics.* 272 (2004) 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.014>.
- [31] R.H. Stephens, Region-Dependent Modulation of Intestinal Permeability by Drug Efflux Transporters: In Vitro Studies in *mdr1a(-/-)* Mouse Intestine, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 303 (2002) 1095–1101. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041236>.
- [32] A. Fortuna, G. Alves, A. Falcão, P. Soares-da-Silva, Evaluation of the permeability and P-glycoprotein efflux of carbamazepine and several derivatives across mouse small intestine by the Ussing chamber technique: Permeability through Mouse Intestine, *Epilepsia.* 53 (2012) 529–538. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03409.x>.
- [33] C.B. Woitiski, B. Sarmiento, R.A. Carvalho, R.J. Neufeld, F. Veiga, Facilitated nanoscale delivery of insulin across intestinal membrane models, *International Journal of Pharmaceutics.* 412 (2011) 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.003>.
- [34] J. Westerhout, H. Wortelboer, K. Verhoeckx, Ussing Chamber, in: K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health*, Springer International Publishing, Cham, 2015: pp. 263–273. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_24.
- [35] Å. Sjöberg, M. Lutz, C. Tannergren, C. Wingolf, A. Borde, A.-L. Ungell, Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique, *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 48 (2013) 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.007>.
- [36] H. Lennernäs, S. Nylander, A.L. Ungell, Jejunal permeability: a comparison between the ussing chamber technique and the single-pass perfusion in humans, *Pharm. Res.* 14 (1997) 667–671.
- [37] C.A. Thaiss, M. Levy, I. Grosheva, D. Zheng, E. Soffer, E. Blacher, S. Braverman, A.C. Tengeler, O. Barak, M. Elazar, R. Ben-Zeev, D. Lehavi-Regev, M.N. Katz, M. Pevsner-Fischer, A. Gertler, Z. Halpern, A. Harmelin, S. Aamar, P. Serradas, A. Grosfeld, H. Shapiro, B. Geiger, E. Elinav, Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection, *Science.* 359 (2018) 1376–1383. <https://doi.org/10.1126/science.aar3318>.

3. Mise en place de la méthode analytique de quantification du S-nitrosoglutathion et des espèces dérivées marquées à l'azote 15

Classiquement, il existe deux méthodes analytiques permettant de quantifier les espèces NO (que sont les RSNO, les ions nitrite NO_2^- et les ions nitrate NO_3^-) : une première méthode dite de Griess/Saville, et la seconde dite au 2,3-diaminonaphtalène (DAN).

La méthode de Griess consiste en une méthodologie par détection spectrophotométrique : les ions nitrite NO_2^- vont réagir avec le sulfanilamide pour former un sel de diazonium, qui va ensuite lui-même réagir avec le *N*-(1-naphtyl)éthylènediamine (NED) pour donner un composé coloré détectable à une longueur d'onde $\lambda = 540$ nm. La méthode de Saville est identique, mais cette fois, il y a présence d'ions Hg^{2+} qui vont cliver la liaison S-NO des RSNOs, permettant d'obtenir des ions nitrite alors quantifiables par la méthode colorimétrique de Griess. La combinaison de méthode Griess/Saville permet une première approche expérimentale pour déterminer les quantités d'espèces NO présentes dans un échantillon. En revanche, dans le cas où la sensibilité ne serait pas suffisante, il est alors nécessaire d'analyser les échantillons par la méthode DAN, davantage sensible.

Cette seconde méthode au 2,3-diaminonaphtalène (DAN) permet de quantifier les espèces NO après réaction entre un réactif non-fluorescent, le DAN, et un ion nitrite (NO_2^-) en milieu acide, produisant le 2,3-naphtotriazole (NAT) : ce dernier est un adduit qui fluoresce en milieu alcalin à longueur d'onde d'émission $\lambda_{\text{exc}} = 375$ nm, après excitation à longueur d'onde $\lambda_{\text{ém}} = 415$ nm. Là encore cette méthode fait intervenir les ions Hg^{2+} , permettant de réduire la liaison S-NO, et de dériver les RSNOs en ions nitrite alors quantifiables par la méthode DAN (Figure 13).

Pour les deux méthodologies (colorimétrique ou fluorimétrique), la quantification des ions nitrate nécessite l'utilisation d'un kit incluant une enzyme, la nitrate réductase : celle-ci va réduire les ions nitrate en ions nitrite qui seront alors quantifiables comme décrit précédemment. La détermination de la quantité de chaque espèce NO présente dans l'échantillon s'effectue par substitution des résultats de chaque quantification : ainsi, par le résultat de la méthode DAN (ou Griess), la quantité en ions nitrite est obtenue directement. Celle des RSNO nécessite de soustraire la quantité obtenue précédemment (ions nitrite) à la quantité obtenue par la méthode DAN- Hg^{2+} (ou Saville, correspondant aux ions nitrites + RSNO). Enfin, la quantité en ions nitrate est obtenue en soustrayant le résultat de la méthode DAN (ou Griess) à celui du kit nitrate.

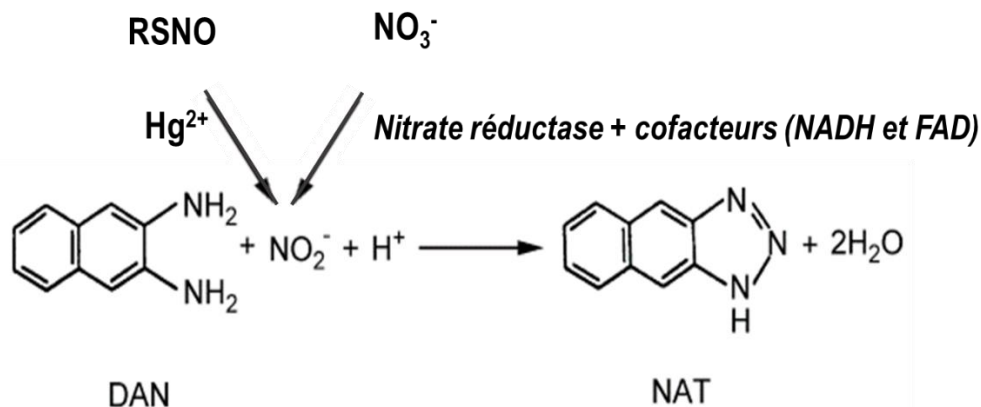


Figure 13 : Principe de la méthode de dosage des ions nitrite par spectrofluorimétrie : réaction entre un réactif non-fluorescent, le 2,3-diaminonaphtalène (DAN) et l'ion nitrite (NO_2^-) en milieu acide, produisant le dérivé fluorescent 2,3-naphtotriazole (NAT). Les S-nitrosothiols (RSNO) après réaction avec les ions Hg^{2+} permettant de rompre la liaison S-NO, et les ions nitrate (NO_3^-) après réduction enzymatique, sont dosés par la même méthode

Les limites de quantification de ces méthodologies sont respectivement de $1 \mu\text{M}$ pour Griess/Saville, de $0,2 \mu\text{M}$ pour DAN/DAN- Hg^{2+} , et de $0,75 \mu\text{M}$ pour les ions nitrate *via* le kit. Ainsi, la méthode fluorimétrique est 5 fois plus sensible que la méthode colorimétrique, ce qui explique son utilisation dans le cas d'une faible présence en espèces NO dans les échantillons biologiques.

Cependant, dans le cadre des études réalisées pendant ces travaux de thèse, il s'avère que ces méthodes n'ont pas une limite de quantification suffisamment basse et manquent ainsi de sensibilité pour pouvoir effectuer une étude de perméabilité des espèces NO en chambre de Ussing (en mesurant ces espèces dans l'intestin directement, ou bien dans le compartiment accepteur). La seconde problématique consiste dans le fait que les espèces NO ainsi quantifiées sont les mêmes que celles présentes biologiquement (à base d'azote ^{14}N). Or, il est important, pour éviter tout bruit de fond lors de l'analyse de résultats, de pouvoir distinguer ces espèces « biologiques » des espèces NO apportées par supplémentation en GSNO : il est alors nécessaire de mettre en place un marquage de ces espèces apportées avec de l'azote ^{15}N . C'est pourquoi un point clé a été de coupler ces méthodes de détection à de la chromatographie liquide haute performance et à de la spectrométrie de masse afin de pouvoir d'une part descendre de manière significative en sensibilité, et d'autre part distinguer les espèces ^{14}N endogènes des espèces ^{15}N exogènes : c'est cette méthodologie originale qui a été mise en place lors de ces travaux, et qui permet à la fois un suivi de perméabilité du GS^{15}NO et de ses espèces dérivées, $^{15}\text{NO}_2^-$ et $^{15}\text{NO}_3^-$.

3.1. Marquage isotopique du S-nitrosoglutathion

Dans la nature, il est classiquement connu que les espèces azotées sont composées de façon quasi exclusive d'azote 14, c'est également le cas du S-nitrosoglutathion (GSNO) produit par les cellules entériques gliales. Or, dans le cadre d'une supplémentation en monoxyde d'azote comme présenté en introduction, il est indispensable de pouvoir distinguer les espèces NO produites de manière endogènes de celles apportées de manière exogène (notamment par administration de principe actif). Une démarche consiste à marquer de manière isotopique le principe actif synthétisé en utilisant de l'azote 15, ce qui permettra de le distinguer – lui et ses produits de dégradation ou métabolites – de la production endogène des espèces ^{14}N . En effet, il est connu qu'il y a seulement 0,37% d'isotope ^{15}N dans la nature, ce qui en fait une espèce particulièrement rare, et donc d'un intérêt majeur dans ce type d'étude (Meckenstock et al., 2004). Cela a permis au laboratoire EA3452 CITHEFOR, avec les travaux de thèse de Haiyan Yu, de mettre en place un marquage isotopique mais surtout une méthode de quantification des espèces marquées au ^{15}N (Haiyan et al., 2018). Ainsi, l'utilisation de nitrite de sodium marqué à l'azote 15 ($\text{Na}^{15}\text{NO}_2$) pendant la synthèse du GSNO permet de produire du GS^{15}NO . Le GS^{15}NO et ses métabolites (ions nitrite, $^{15}\text{NO}_2^-$ et ions nitrate, $^{15}\text{NO}_3^-$) peuvent alors être quantifiés par spectrométrie de masse.

Plus précisément, la méthodologie de détection dépend de la sensibilité souhaitée pour la quantification des espèces ^{15}N . Les travaux réalisés précédemment au laboratoire ont permis de déterminer une méthodologie de quantification de ces espèces sur un modèle *in vitro* de cellules intestinales Caco-2, en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (Yu et al., 2019a). Deux méthodes de dérivation (= transformation chimique d'un composé en vue de sa quantification) des échantillons ainsi obtenus sont possibles : 1) celle au 2,3-diaminonaphtalène (DAN), qui permet – en réagissant avec les ions nitrites présents – de produire un composé fluorophore, le 2,3-naphtotriazole (NAT) pouvant être quantifié par spectrofluorimétrie, avec une limite de quantification (LOQ) de 0,2 μM ; 2) celle par la méthode de Griess fait intervenir non plus le DAN mais du sulfanilamide et du *N*-(1-naphtyl)éthylènediamine (NED), produisant un fluorophore quantifiable cette fois par spectrophotométrie, avec une LOQ de 1 μM . Ces méthodes consistent à mesurer d'une part les ions nitrite (NO_2^-) et les RSNO après clivage de la liaison S-NO, et d'autre part la quantification des ions nitrate (NO_3^-) par réduction enzymatique (*via* l'action de la nitrate réductase).

3.2. Détermination de la perméabilité du GS¹⁵NO dans un modèle de Ussing

Précédemment au laboratoire, le GSNO a été étudié sur un modèle *in vitro* de cellules d'adénocarcinome colique humain (Caco-2), et a permis de déterminer que le GSNO est situé entre les classes I et III de la classification BCS (Biopharmaceutical Classification System), du fait de sa forte solubilité et de sa perméabilité intermédiaire, ce qui en fait un principe actif de choix dans l'optique d'un traitement chronique par administration orale (Bonetti et al., 2018). Afin de poursuivre cette étude, nous avons choisi de la transposer sur le modèle tissulaire, *ex vivo*, de chambre de Ussing. Cependant, et du fait de la complexité du modèle (non plus une monocouche cellulaire mais une structure intestinale complète), il était de première importance de mettre au point et d'optimiser de nouveaux outils et méthodes analytiques permettant de quantifier des espèces NO traversant plus difficilement la barrière intestinale. Également, il était intéressant de pouvoir distinguer les espèces NO apportées par exposition au GSNO de celles produites par les enzymes « NO synthases » (NOS) présentes localement. C'est pourquoi les travaux présentés dans ce chapitre, et l'article qui suit, sont des éléments clés permettant de soulever plusieurs verrous de l'étude de perméabilité du GSNO et de ses espèces dérivées. La méthode présentée précédemment (paragraphe 0) permet d'atteindre une limite de quantification particulièrement adaptée aux très faibles quantités de composés, de l'ordre du nanomolaire. De manière concrète, après avoir « dérivatisé » les échantillons biologiques obtenus après expérimentation de 2h en chambre de Ussing, dans le compartiment accepteur, en utilisant les méthodes Griess et DAN, ceux-ci ont été quantifiés par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse à trappe d'ion en mode tandem (LC-ITMS/MS) et électroébullition (ESI). La mise en place et l'efficacité de la méthode permet de pouvoir projeter de futures études de biodisponibilité du GSNO, par exemple dans le cadre d'un traitement chronique par voie orale, afin de mieux comprendre le devenir du médicament dans l'organisme.

Article 2 : “Comparison between two derivatization methods of nitrite ion labelled with ^{15}N applied to liquid chromatography-tandem mass spectrometry” (Analytical Methods)

Les protocoles détaillés relatifs à cet article se trouvent en fin de manuscrit (voir Annexes) intitulés « Purification of azo adduct and 2,3-naphthotriazole adduct by LC coupled with UV/Vis detection », « Measurement of nitrite, nitrate ions and S-nitrosothiols using the 2,3-diaminonaphthalene assay by LC coupled with tandem mass spectrometry », et « Permeability studies of S-nitrosothiols in isolated rat intestine using Ussing chamber ».

L'article ci-après traite de la mise au point de méthodes de dosage du GSNO marqué à l'azote 15, puis de la détection des espèces dérivées que sont les RS¹⁵NOs, les ions nitrite ($^{15}\text{NO}_2^-$) et les ions nitrate ($^{15}\text{NO}_3^-$). La mise au point et l'utilisation de cette méthodologie faisant intervenir la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CLHP-SM/SM) permet d'atteindre des limites de quantification particulièrement basses et adaptées à l'étude : ceci est primordial dans les études *ex vivo* qui ont été menées en chambre de Ussing, puisqu'une très faible quantité d'espèces ^{15}NO traversent la barrière intestinale, et il est donc primordial d'avoir une méthode suffisamment sensible pour pouvoir détecter ces faibles quantités. En effet, la mise au point de la détection par CLHP-SM/SM permet d'atteindre une limite de quantification de 0,2 μM en utilisant la méthode de dérivatisation au 2,3-diaminonaphtalène (DAN). Une autre méthode de dérivatisation, dite de Griess, est moins sensible, mais permettant néanmoins d'atteindre une limite de quantification de 1 μM . L'intérêt de ces travaux est de pouvoir utiliser cette méthodologie analytique validée, afin de pouvoir déterminer la perméabilité des espèces NO après exposition du tissu intestinal à du GSNO, le tout étant marqué à l'azote 15 ce qui permet un autre avantage : distinguer les espèces ^{15}NO exogènes (dérivées du GS¹⁵NO administré) des espèces (14)NO endogènes produites *in situ*. Cette méthodologie, combinée à la mise en place et validation du modèle *ex vivo* de chambre de Ussing, permettent tous deux de poursuivre les études sur la prise en charge du GSNO par la barrière intestinale, ainsi que ses effets sur celle-ci.



Cite this: DOI: 10.1039/c8ay01206g

Received 28th May 2018
Accepted 19th July 2018

DOI: 10.1039/c8ay01206g

rsc.li/methods

Comparison between two derivatization methods of nitrite ion labeled with ^{15}N applied to liquid chromatography-tandem mass spectrometry†

Yu Haiyan,^a Schmitt Romain,^a Sapin Anne,^a Chaimbault Patrick^b and Leroy Pierre^{b*}

The fragmentations of the adducts resulting from the derivatization of nitrite ion by Griess method (formation of an azo compound) and 2,3-diaminonaphthalene (formation of 2,3-naphthotriazole (NAT)) were studied by tandem mass spectrometry (MS/MS). The transition used for quantification was selected according to the highest value of the signal-over-blank ratio (S/B) obtained from each adduct fragmentation. When derivatizing nitrite ion labeled with the stable ^{15}N isotope, followed by liquid chromatography (LC)-MS/MS measurement, the lowest limit of quantification obtained was 5 nM with NAT. The method was applied to study the intestinal permeability of *S*-nitroglutathione, a drug candidate for the chronic treatment of cardiovascular disease. This compound was labeled with ^{15}N and its permeability was studied in an *ex vivo* rat intestine model using an Ussing chamber.

1. Introduction

Nitrogen derivatives especially oxides play important roles in the environment¹ and in living organisms.² For example, nitric oxide (NO) is a crucial actor of vascular tone homeostasis. Its endogenous production in the endothelial cell layer of vessels decreases with ageing and in cardiovascular diseases related to endothelial dysfunction.³ The monitoring of NO and related species (nitrite and nitrate ions, *S*-nitrosothiols (RSNOs)) in the body is of main importance to evaluate the bioavailability of NO donors recently developed and proposed as drug candidates, such as *S*-nitroglutathione (GSNO).⁴

Because of the low molecular mass of NO (30 u), it has to be derivatized to allow its measurement by MS at low concentration levels in biological fluids. The samples, the standards and the reagent solutions are most of the time spoiled by nitrogen oxides from the atmosphere and by bacteria reducing nitrate to nitrite through a specific reductase. Consequently, this natural

contamination leads to a signal which interferes with the NO coming from the drugs during the derivatization process.⁵ The reduction of this pollution by suppressing air contact and microbial growth is not so obvious. Preparing fresh solutions in ultra-pure water is the usual way to limit the level of this phenomenon,⁶ but significant interferences are still observed in the blank. Consequently, the limit of quantification (LOQ) increases as it is calculated on the basis of the signal-over-blank (S/B) rather than the signal-over-noise ratio (S/N).

The advantages of using nitrite ion labeled by the stable ^{15}N isotope (exhibiting a very low natural abundance, *i.e.* 0.37%),⁷ derivatization with various probes, *e.g.* pentafluorobenzyl bromide,^{8–10} 2,3-diaminonaphthalene (DAN)^{5,11,12} and reduced glutathione (GSH),¹³ followed by gas or liquid chromatography coupled with MS have already been reported to improve sensitivity.

Presently, we selected two derivatization methods of nitrite ion which are the most commonly used in the literature for unlabeled NO species analysis (Fig. 1): the first one is based on a two-step reaction of nitrite ion with sulfanilamide and *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine (NED) to form an azo adduct followed by a spectrophotometric measurement (Griess assay); the second way consists in the reaction between the fluorogenic probe DAN and nitrite ion in acidic medium giving rise to 2,3-naphthotriazole (NAT), followed by spectrofluorimetric measurement in alkaline medium (DAN assay). The LOQ values are 1 and 0.2 μM for Griess and DAN assays,^{14,15} respectively. The advantage of both methods is the possible quantification of nitrate ions after chemical or enzymatic reduction, and RSNOs after cleavage of the S–NO bond with mercuric ions. Moreover, they have been adapted to HPLC with their corresponding detection mode: visible spectrophotometry for Griess¹⁶ and fluorescence for DAN assay.¹⁷ DAN derivatization has been previously used in LC-MS/MS after labeling NO species with ^{15}N .^{5,11,12} But to the best of our knowledge, it is the first report of ^{15}N labeled azo adduct resulting from Griess reaction. The present work consists in a comparison of the fragmentation modes of the two adducts, azo compound and

^aUniversité de Lorraine, CITHEFOR EA 3452, Faculté de Pharmacie, 5, Rue Albert Lebrun, F-54001, Nancy, France. E-mail: pierre.leroy@univ-lorraine.fr

^bUniversité de Lorraine, LCP-A2MC, F-57000 Metz, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8ay01206g

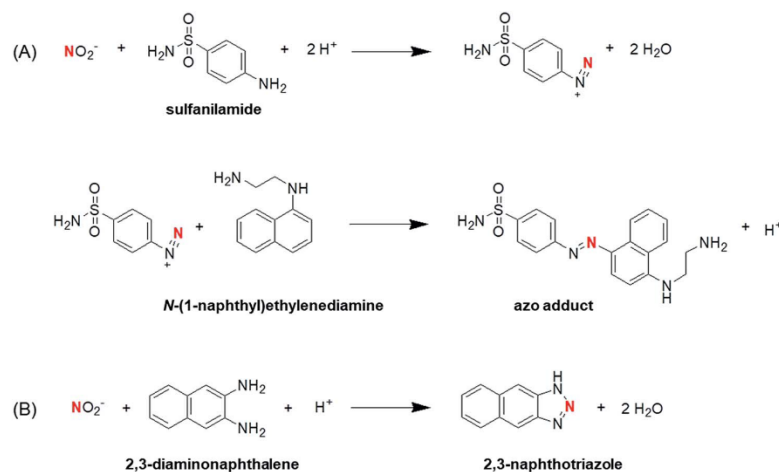


Fig. 1 Reaction between nitrite ion and (A) Griess reagents (sulfanilamide and *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine (NED)) to form the azo adduct; (B) 2,3-diaminonaphthalene (DAN) leading to 2,3-naphthotriazole (NAT). "N" in red is labeled with nitrogen 15.

NAT, and consequent analytical performances by using LC coupled to Electrospray-Ion Trap tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-ITMS/MS). The LOQ calculation was based on both *S/N* and *S/B* values. For the studies of the *S/B* value, the azo and NAT adducts were first purified by a semi-preparative LC system. The selected method offering the lowest LOQ was applied to the intestinal permeability studies of *S*-nitrosoglutathione labeled with ^{15}N (GS^{15}NO) by using isolated and oriented rat intestine in an Ussing chamber system. This latter *ex vivo* model appears more correlated to *in vivo* conditions than simpler cell models, e.g. Caco-2 cell monolayer.¹⁸

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All reagents and standards were of analytical grade. All solutions were daily prepared in fresh ultrapure water ($>18.2\text{ M}\Omega \times \text{cm}$). Sodium ^{15}N -nitrite ($\text{Na}^{15}\text{NO}_2$) was supplied by Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA) and ^{14}N -NAT by Chemodex (St. Gallen, Switzerland). $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ was provided by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) and GS^{15}NO was synthesized according to the method previously reported for unlabeled GSNO .¹⁴

2.2. Derivatization of ^{15}N labeled nitrite ion

For Griess assay, one mL of 0.001 M of $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ in 1.575 M acetate buffer pH 2.5 were mixed with 200 μL of 0.035 M sulfanilamide in 0.4 M HCl; the reaction mixture was incubated at room temperature in the dark for 3 min. Then, 50 μL of 0.017 M NED in 0.3 M HCl were added, and the resulting mixture was incubated for 5 min. For DAN assay, 300 μL of 0.005 M $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ in ultrapure water were mixed with 600 μL of 3.16 mM DAN in 0.6 M HCl and the resulting mixture was incubated at room temperature in the dark for 10 min. Next, 310

μL of 1.2 M NaOH were added. The resulting azo adduct and NAT solutions were stored at 4 $^\circ\text{C}$ for a maximum period of 5 h until LC purification.

2.3. Purification of adducts

Both adducts were purified from their reaction mixture by a LC system incorporating a Nucleosil C-18 column ($4.6 \times 250\text{ mm ID}$, 5 μm , Macherey Nagel, Darmstadt, Germany). For azo adduct purification, the mobile phase was an acetonitrile-water-trifluoroacetic acid (25 : 75 : 0.1, v/v/v) mixture used at a flow rate of 1.2 mL min^{-1} and at a column temperature of 40 $^\circ\text{C}$, followed by UV detection at $\lambda = 220\text{ nm}$ (diode array detector (DAD), UV 6000 LP, Thermo, Les Ulis, France or UV/VIS-155 model, Gilson, Middleton, WI, USA). The fraction with peak corresponding to the azo adduct (retention time: ca. 12 min) was collected and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ for maximum one month. For NAT purification, the mobile phase was acetonitrile-0.01 M ammonium acetate buffer pH 7.2 (28 : 72, v/v) at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} and at 40 $^\circ\text{C}$, followed by UV detection at $\lambda = 330\text{ nm}$. The fraction with peak corresponding to NAT (retention time: ca. 12 min) was collected and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ for maximum 3 months. In both cases, the loop volume was 100 μL and the derivatization mixture (see 2.2) was directly injected into the corresponding LC system. The adduct concentrations in the collected fractions were measured by using the respective conventional techniques (Griess¹⁴ and DAN¹⁵ assays) and they were in the range of 60 to 120 μM .

2.4. Analysis of adducts with LC-ESI-ITMS/MS

Both purified adducts (50-fold diluted in the corresponding mobile phase) and derivatization mixtures in Krebs solution (6.90 g L^{-1} NaCl, 0.35 g L^{-1} KCl, 1.80 g L^{-1} glucose, 0.16 g L^{-1} KH_2PO_4 , 2.02 g L^{-1} NaHCO_3 , 0.14 g L^{-1} MgSO_4 , 0.35 g L^{-1}

CaCl₂·2H₂O, pH 7.4) were injected (20 μL loop) into the LC-ESI-ITMS/MS system (Dionex, Ultimate 3000, coupled with LTQ Velos Pro, Thermo Scientific, San José, CA, USA). The Acclaim 120 C-18 column (2.1 × 150 mm ID, 3 μm, Thermo) was eluted at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹ and at 25 °C with (i) methanol-water-acetic acid (49 : 51 : 0.1, v/v/v) for the azo adduct analysis, and (ii) with a gradient mobile phase consisting of acetonitrile and 0.01 M acetic acid mixtures for NAT analysis. In the latter case, the content of acetonitrile was increased from 40 to 80% between 1.5 and 5 min, then held at 80% for 2.5 min. A switching valve was used to discard the mobile phase eluting from the column during the first 3 min-period of each chromatographic run. The source voltage applied was 5.00 kV; a MS scan and a multiple reaction monitoring (MRM) of transitions were realized. The LOQ values based on both S/N and S/B for purified and unpurified adducts were calculated.

2.5. Intestinal permeability studies

The intestinal permeability of GS¹⁵NO was studied in an *ex vivo* model according to a previously reported procedure.¹⁹ This system offers the possibility to maintain *ex vivo* tissue viability for 2 hours in specific experimental conditions (using Krebs buffer at 37 °C with continuous O₂-CO₂ (95 : 5, v/v) mixture bubbling). All experiments were performed in accordance with the European Parliament guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals and the respect of the 3 Rs' requirements for Animal Welfare. Briefly, intact isolated intestine (ileum, 100 ± 5 mg) of Wistar rat was mounted in Ussing chamber (EMCSYS-6, Physiologic Instrument Inc, San Diego, CA, USA). Two compartments were separated by the vertical and oriented tissue (isolated rat intestine with mucosa part mimicking intestinal lumen toward donor compartment and serosa toward acceptor compartment). 2.5 mL of Krebs solution were added into each compartment. Tissue samples exhibiting a *trans*-epithelial electrical resistance (TEER) value less than 30 Ω cm², translating a loss of intestine barrier integrity, were discarded. Next, 250 nanomoles of GS¹⁵NO were deposited in the donor compartment, and samples (250 μL) were harvested from the acceptor compartment after incubation at 37 °C with O₂-CO₂ (95 : 5, v/v) mixture bubbling for 2 h. RS¹⁵NOs and ¹⁵N-nitrate ions were converted to ¹⁵N-nitrite ions by using mercuric ions and nitrate reductase associated with corresponding cofactors, respectively, as previously described.¹⁵ For the method validation, five point calibration curves were built by spiking the physiological medium used in the Ussing chamber, *i.e.* Krebs solution, with Na¹⁵NO₂, GS¹⁵NO and Na¹⁵NO₃. Accuracy, intra- and inter-day precision were evaluated with quality control points of Na¹⁵NO₂ and GS¹⁵NO (15, 50 and 180 nM), and Na¹⁵NO₃ (120, 1000 and 1600 nM) prepared in Krebs solution. Standards and real samples were derivatized as described in 2.2, except that 60 μL of 0.105 mM DAN instead of 600 μL were used. After incubation (room temperature, 10 min), 36 μL of 1 M NaOH together with 4 μL of 0.0001 M NaOH were added to adjust pH close to 8. Finally, these derivatives were stored at -80 °C until analysis. 10 μL of 0.02 mM naphthylamine solution as the internal standard (IS) were added just before injection into the LC system as described in 2.4.

The apparent permeability coefficient (P_{app}) values were calculated using the following equation:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

dQ/dt (mol s⁻¹) refers to the quantity of permeated NO related species (dQ) in the acceptor compartment at the time of quantification (dt), "A" refers to the membrane diffusion area (0.25 cm²), and C_0 refers to the initial concentration of GS¹⁵NO in the donor compartment.

3. Results and discussion

¹⁵N labeled adducts were purified by semi-preparative LC (Fig. S1†). The selected wavelength of the DAD allowed the simultaneous detection of reagent excess and adduct. A baseline resolution between adduct and reagents was obtained in both cases. Collected fractions containing purified adducts were injected into the LC-ESI-ITMS/MS system for studying their fragmentation pattern. The main transitions obtained for the ¹⁵N-azo adduct were m/z 371 → 354 and m/z 371 → 328 under Collisionally Induced Dissociation (CID) mode with optimized collision energy of 35 eV (Fig. 2A). For the ¹⁵N-NAT adduct, different transitions were observed: m/z 171 → 115 and m/z 171 → 156 depending the collision mode (Fig. 2B and C). The main transition m/z 171 → 115 observed under CID at 35 eV (Fig. 2B) led to the highest sensitivity. This result was in good agreement with the literature.⁵ Although this transition gave also the highest signal in Higher-energy Collision Dissociation (HCD) at 50 eV, the sensitivity was found lower than for the new original transition, m/z 171 → 156, only observed in HCD mode. Even if the absolute abundance of the transition m/z 171 → 156 is lower than for m/z 171 → 115 under HCD mode, the highest sensitivity is due a lowest background noise at m/z 171 → 156.

The LOQ values corresponding to the selected transitions for each adduct are indicated in Table 1: (i) a LOQ value of 1 nM (based on S/N = 10) was reached using the best transitions for Griess and DAN adducts; (ii) the percentage of interference due to the natural presence of ¹³C in the unlabeled azo adduct (coming from ¹⁴N₂ in the atmospheric or/and bacterial pollution) on the signal of the ¹⁵N-labeled adduct (coming from the drug) is 20% whereas it is only 2% for the NAT adduct; (iii) the LOQ (*ca.* 5 nM, S/B = 5) using DAN assay based on HCD mode is consequently lower than the one obtained with the Griess derivative (100 nM). As mentioned above, the blank values of Griess and DAN assays for ¹⁴N-nitrite ion analysis were not negligible due to unavoidable contaminations (around 100 and 50 nM, respectively). Consequently, the LOQ values of Griess and DAN assays for ¹⁴N-NO₂ analysis were regarded as 500 and 250 nM, respectively, based on S/B = 5. Meanwhile, ¹³C interference levels were in accordance with theoretical calculation. As a result, blank values of Griess and DAN assays for ¹⁵N-nitrite ion analysis were 20 and 1 nM, respectively. Clearly, the reason why LOQ value of DAN assay is 20-fold lower than in Griess assay, is due to a lower blank value.

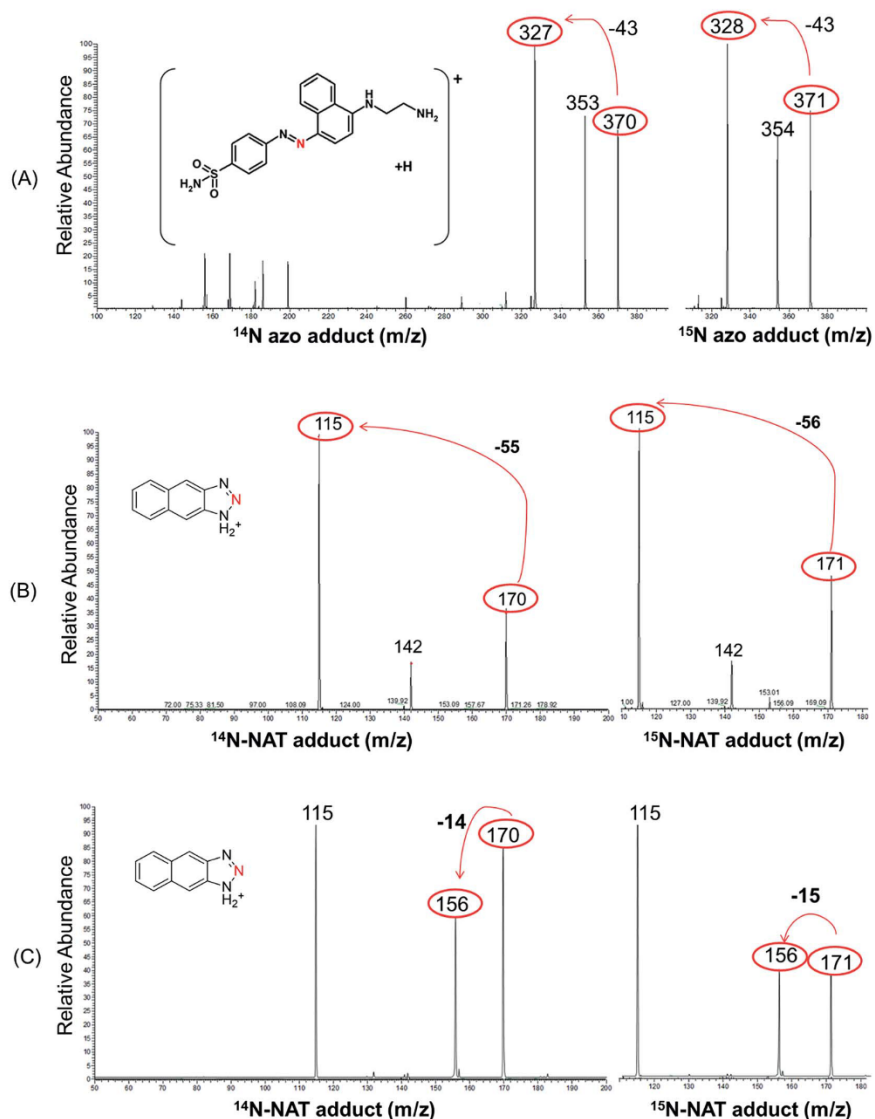


Fig. 2 Fragmentation studies of (A) azo adduct under Collision Induced Dissociation (CID) mode; (B) 2,3-naphthotriazole (NAT) adduct under CID mode; and (C) NAT adduct under Higher-energy Collisional Dissociation (HCD) mode by liquid chromatography coupled to Electrospray-Ion Trap tandem Mass Spectrometry, with both isotopes ($^{14}\text{N} - [\text{M} + \text{H}]^+$ – on the left, and $^{15}\text{N} - [\text{M} + \text{H} + 1]^+$ – on the right side of the figure). The red nitrogen in protonated adducts comes from nitric oxide.

The selectivity has been tested by comparing purified adducts and the derivatization mixtures. As a result, no matrix (Krebs solution) effect was observed. The retention times of sulfanilamide, azo adduct and NED in the LC-MS/MS system were 2.1, 3.6 and 4.2 min, respectively. The retention times of DAN and NAT were 4.2 and 5.5 min, respectively. Regarding the Griess method, a baseline resolution between peaks corresponding to sulfanilamide and azo adduct was obtained, which

precluded reagent interference in the MS source. Concerning the DAN assay, a baseline resolution between peaks corresponding to DAN and NAT adduct was achieved. Moreover, discarding the mobile phase at the beginning of each run avoided any contamination of the MS source by polar products contained in the real samples.

Noteworthy, the blank values obtained for both methods decreased after labeling NO_2^- with ^{15}N despite the ^{13}C

Table 1 Comparison of performances between derivatization of nitrite ion with Griess and 2,3-diaminonaphthalene (DAN) methods followed by LC-ESI-ITMS/MS analysis (CID: Collisionally Induced Dissociation; HCD: Higher-energy Collision Dissociation; LOQ: limit of quantification; S/N: signal-over-noise; S/B: signal-over-blank)

Assay		Griess	DAN	
Collision modes		CID (35 eV)	CID (35 eV)	HCD (50 eV)
Selected transitions m/z	^{14}N -adduct	370 \rightarrow 327 (370 \rightarrow 353)	170 \rightarrow 115	170 \rightarrow 156
	^{15}N -adduct	371 \rightarrow 328 (371 \rightarrow 354)	171 \rightarrow 115	171 \rightarrow 156
Adduct retention time/total analysis time/re-equilibration time (min)		5.7/8/No (isocratic condition)	4.5/7.0/10	4.5/7.0/10
LOQ (S/N = 10)	^{14}N -adduct and ^{15}N -adduct	1 nM	20 nM	1 nM
LOQ (S/B = 5; the blank (B) corresponds to the derivatization mixture)	^{14}N -adduct	500 nM	250 nM	250 nM
	^{15}N -adduct	100 nM	20 nM	5 nM
Interferences in blank samples (due to ^{14}N -adduct because of ^{13}C)		ca. 20%	ca. 2%	ca. 2%

interference. Finally, LOQ based on S/B = 5 was improved: 100 vs. 500 nM for Griess assay, 5 vs. 250 nM for DAN assay. In the present work, the product ions kept the ^{15}N during fragmentation of the protonated azo adduct, while the fragments lost it for NAT (Fig. 2). Usually, the transition keeping the labeled atom shows a higher specificity. However, DAN assay led to the most interesting method for further experiments, because its LOQ was 20-fold lower than for Griess assay with MS and 50-fold lower than DAN assay with spectrofluorimetric detection.

Obviously, the DAN method provides more advantages than Griess one to analyze ^{15}N labeled NO species, especially by decreasing LOQ value based on S/B, as discussed above. The DAN method has also to be compared with other probes already reported in the literature. First, the use of PFBBR for derivatizing ^{15}N labeled nitrite and nitrate ions^{9,10} affords low LOD values based on a S/N value equal to 3 (0.2 and 4.8 nM for nitrite and nitrate, respectively), but an additional preanalytical step consisting in a liquid/liquid extraction of the adducts and a GC-MS system equipped with a specific chemical ionization source is required; at last, the LOQ value based on a S/B value is not provided by the literature. Employing GSH as a probe to derivatize ^{15}N labeled nitrite¹³ leads to GSNO formation, which is a very fragile compound sensitive to many environmental factors such as light, temperature, metal ions and biological

pathways (degradation through gamma-glutamyltransferase and redoxin catalysis, transnitrosation with other endogenous thiols). Thus the storage of derivatized samples until analysis could become a real challenge. DAN method has already been reported in the literature to derivatize ^{15}N labeled nitrite with subsequent analysis by LC-ESI-MS/MS. The produced NAT adduct is stable at r.t. for 24 h, and at -80°C for 3 months with 2 freezing/thaw cycles (data not shown). As a triple quadrupole or Q-trap mass spectrometer was used in the literature, the presently used ion trap mass spectrometer operated in HCD offers parallel capacity to analyze ^{15}N labeled NO species, with a novel sensitive transition m/z 171 \rightarrow 156 for ^{15}N labeled NAT adduct. Besides, the present method is to the best of our knowledge the first report of analysis of GS ^{15}NO by DAN method.

The labeling efficiency of both methods has been evaluated. For Griess method, as the pure adduct is not available, the purified azo adduct contained in the fraction collected in the LC-UV system was titrated by using the molar absorbance reported in the literature, *i.e.* $38\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.²⁰ Next, the absorbance of adduct produced in the reaction medium was compared to the titrated adduct. For NAT method, the MS signal of the pure adduct which is commercially available, was compared to the signal obtained at the same theoretical molar

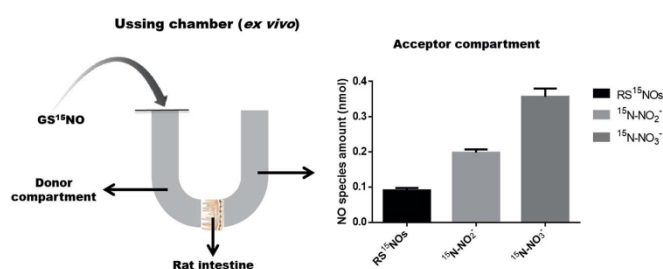


Fig. 3 Permeation of 250 nanomoles of ^{15}N labeled S-nitrosoglutathione (GS ^{15}NO) through an *ex vivo* model of intestinal barrier (isolated rat intestine with mucosa toward donor compartment, and serosa toward acceptor compartment) after incubation at 37°C with O_2 - CO_2 (95 : 5, v/v) mixture bubbling for 2 h. GS ^{15}NO metabolites (nitric oxide (NO) species amount) were quantified in the acceptor compartment, $n = 3$. Results are expressed as mean \pm sem.

concentration of nitrite ion reacted with DAN according to the operating conditions described in paragraph 2.2. Resulting labeling efficiencies were $94.2 \pm 5.8\%$ and $93.0 \pm 8.4\%$ ($n = 3$) for azo and NAT adduct, respectively.

The quantification of NO species (^{15}N -nitrite ion, RS^{15}NOs and ^{15}N -nitrate ion) was realized by an IS calculation mode (the retention time of IS in the LC system is 6.6 min and the measured transition is $144 \rightarrow 117$). Linearity was observed in the concentration range of 5–200 nM for ^{15}N -nitrite ion and RS^{15}NOs , and 100–2000 nM for ^{15}N -nitrate ion, with the coefficient of determination (R^2) values more than 0.995. Accuracy ranged from 90.6 to 109.4%. Intra- and inter-day precision expressed as RSD % was between 8.8 and 11.6, and 11.2 and 12.9%, respectively. All these values comply with FDA rules ($R^2 \geq 0.99$; $85\% \leq \text{recovery} \leq 115\%$; $\text{RSD} \% \leq 15\%$).²¹

Intestinal permeability of GS^{15}NO was evaluated by determining the permeated concentrations of its metabolites, *i.e.* RS^{15}NOs , ^{15}N -nitrite and ^{15}N -nitrate ions, after a 2 h incubation measured by DAN derivatization and LC-ESI-ITMS/MS. Previous measurements carried out in spectrofluorimetry after DAN derivatization failed to give data, because the concentrations of all quantified metabolites in the sample were lower than LOQ (250 nM, $S/B = 5$). As shown in Fig. 3, less than 1% of initial GS^{15}NO was permeated through intact isolated rat intestine (around 0.04%, 0.08% and 0.15% of RS^{15}NOs , ^{15}N -nitrite and ^{15}N -nitrate ions, respectively). Based on calculation of P_{app} values (1.00 ± 0.11 , 2.18 ± 0.15 and $3.93 \pm 0.37 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ for RS^{15}NOs , ^{15}N -nitrite and ^{15}N -nitrate ions, respectively), it can be concluded that GSNO belongs to the medium permeability class according to FDA guidelines with P_{app} value of $(7.12 \pm 0.62) \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, which is in the range of 10^{-6} to $10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$. In the Biopharmaceutics Classification System,¹⁶ an excellent candidate drug for oral administration to treat chronic diseases should be highly soluble and permeable. GSNO is a soluble compound with medium permeability, thus it can be considered for oral administration.

Conclusion

Both Griess and DAN assays based on use of ^{15}N labeling of nitrite ion and LC-ESI-ITMS/MS succeeded in improving LOQ. Noteworthy, the blank value is still not neglected due to interferences between isotopes. The DAN assay under HCD mode provides a lower LOQ (*ca.* 5 nM) than the Griess one (100 nM). Thus, DAN assay under HCD mode for NAT fragmentation has been further applied for GSNO intestinal permeability studies. This method has the advantage of monitoring NO species released from GS^{15}NO in the nanomolar range, and differentiating them from other sources (endogenous synthesis and diet). Preliminary data presently obtained about GSNO intestinal permeability offer the perspective to use it as an oral drug candidate in CVDs chronic treatment. To evaluate its bioavailability more deeply, the development and validation of this method in a more complex matrix (such as plasma) should be performed to conduct further pharmacokinetic study.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

Authors are grateful to the program of China Scholarship Council for the financial support of Ms Haiyan Yu's PhD thesis (grant No. 201506270166). Authors also thank Dr Philippe Giummelly (CITHEFOR, Université de Lorraine) for realizing the synthesis of GS^{15}NO .

References

- S. S. Gill, M. Hasanuzzaman, K. Nahar, A. Macovei and N. Tuteja, *Plant Physiol. Biochem.*, 2013, **63**, 254–261.
- S. Moncada, R. M. Palmer and E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.*, 1991, **43**, 109–142.
- B. van der Loo, R. Labugger, J. N. Skepper, M. Bachschmid, J. Kilo, J. M. Powell, M. Palacios-Callender, J. D. Erusalimsky, T. Quaschnig, T. Malinski, D. Gygi, V. Ullrich and T. F. Lüscher, *J. Exp. Med.*, 2000, **192**, 1731–1744.
- C. Gaucher, A. Boudier, F. Dahboul, M. Parent and P. Leroy, *Curr. Pharm. Des.*, 2013, **19**, 458–472.
- E. R. Axton, E. A. Hardardt and J. F. Stevens, *J. Chromatogr. B*, 2016, **1019**, 156–163.
- H. Kabuto, M. Yamamoto, I. Yokoi and N. Ogawa, *Clin. Chim. Acta*, 1997, **266**, 199–200.
- J. Emsley, *New Sci.*, 1984, **103**, 41–42.
- D. Tsikas, J. Sandmann, F.-M. Gutzki, D. O. Stichtenoth and J. C. Frölich, *J. Chromatogr. B*, 1999, **726**, 13–24.
- E. Hanff, M. F. Eisenga, B. Beckmann, S. J. L. Bakker and D. Tsikas, *J. Chromatogr. B*, 2017, **1043**, 167–175.
- E. Hanff, M. Luetzow, A. A. Kayacelebi, A. Finkel, M. Maassen, G. R. Yancheva, A. Haghikia, U. Bavendiek, A. Bucke, T. Luecke, N. Maassen and D. Tsikas, *J. Chromatogr. B*, 2017, **1047**, 207–214.
- S. Shin and H.-L. Fung, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, **56**, 1127–1131.
- M.-R. Chao, Y.-M. Shih, Y.-W. Hsu, H.-H. Liu, Y.-J. Chang, B.-H. Lin and C.-W. Hu, *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, **93**, 77–83.
- E. Hanff, A. Boehmer, J. Jordan and D. Tsikas, *J. Chromatogr. B*, 2014, **970**, 44–52.
- M. Parent, F. Dahboul, R. Schneider, I. Clarot, P. Maincent, P. Leroy and A. Boudier, *Curr. Pharm. Anal.*, 2013, **9**, 31–42.
- W. Wu, C. Gaucher, R. Diab, I. Fries, Y.-L. Xiao, X.-M. Hu, P. Maincent and A. Sapin-Minet, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, **89**, 1–8.
- M. Marzinzig, A. K. Nussler, J. Stadler, E. Marzinzig, W. Barthlen, N. C. Nussler, H. G. Beger, S. M. Morris Jr and U. B. Brückner, *Nitric Oxide*, 1997, **1**, 177–189.
- W. S. Jobgen, S. C. Jobgen, H. Li, C. J. Meininger and G. Wu, *J. Chromatogr. B*, 2007, **851**, 71–82.

- 18 P.-A. Bilat, E. Roger, S. Faure and F. Lagarce, *Drug Discov. Today*, 2017, **22**, 761–775.
- 19 E. Neirinckx, C. Vervaeke, J. Michiels, S. de Smet, W. van den Broeck, J. P. Remon, P. de Backer and S. Croubels, *J. Vet. Pharmacol. Therapeut.*, 2011, **34**, 290–297.
- 20 E. Sawicki, T. W. Stanley, J. Pfaff and A. D'Amico, *Talanta*, 1963, **10**, 641–655.
- 21 V. P. Shah, K. K. Midha, J. W. Findlay, H. M. Hill, J. D. Hulse, I. J. McGilveray, G. McKay, K. J. Miller, R. N. Patnaik, M. L. Powell, A. Tonelli, C. T. Viswanathan and A. Yacobi, *Pharm. Res.*, 2000, **17**, 1551–1557.

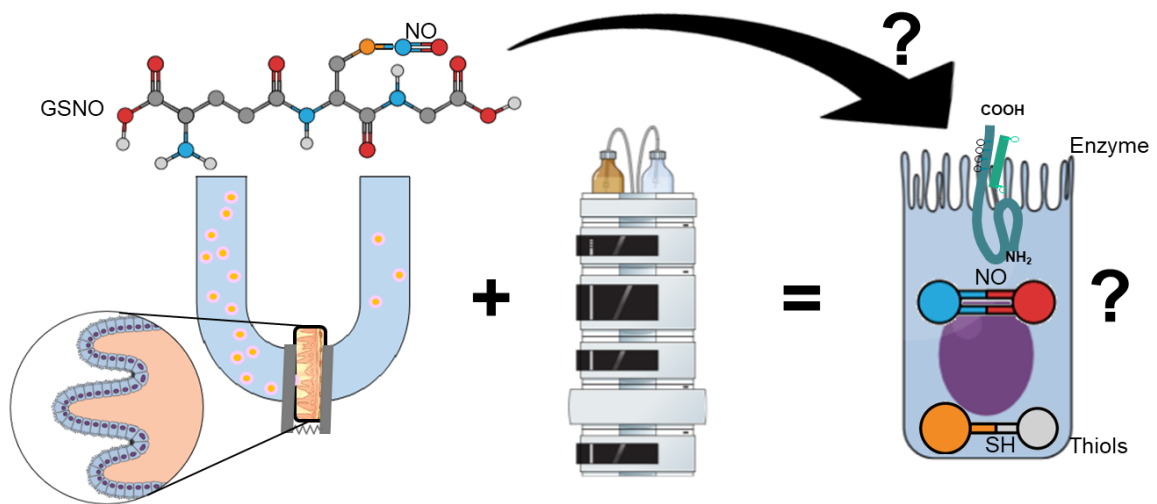
4. Conclusion

En conclusion, cette première partie des travaux de thèse ont permis de mettre en place 1) une méthode *ex vivo* de chambre de Ussing qui a été validée et qui permet à la fois de suivre la perméabilité du GSNO mais aussi d'explorer l'effet du GSNO sur l'intestin et 2) une méthode analytique de quantification des espèces marquées à l'azote 15 de sensibilité adaptée au modèle de chambre de Ussing.

Il est important de préciser que cette méthodologie faisant intervenir une trappe ionique est un élément très particulier et spécifique puisqu'il n'existe que 3 systèmes similaires dans toute la France. Aussi, la transposition de ce type de méthodologie reste particulièrement délicate, et peut entraîner une baisse de spécificité.

Nous disposons alors des outils nécessaires à la poursuite du projet et permettant d'explorer davantage les mécanismes de prise en charge du GSNO placé dans la lumière intestinale (telle une administration orale).

2^e Chapitre : Prise en charge du S-nitrosoglutathion par la barrière intestinale



Chambre de Ussing + Chromatographie liquide haute performance = Prise en charge du GSNO ?

1. Mécanismes de métabolisme du GSNO

Le métabolisme du GSNO (et des RSNO de façon plus générale) est bien connu et est largement référencé au niveau cardiovasculaire (Gaucher et al., 2012). Dans ce cas, le NO provient des NO synthases (dont il y a pour rappel 3 isoformes, nNOS, eNOS et iNOS) au niveau de l'endothélium vasculaire. Ces enzymes sont dépendantes de la calmoduline, c'est-à-dire que lors d'une concentration élevée en ions calcium Ca^{2+} , la calmoduline va se fixer sur la NOS et permettre la conversion de la L-arginine en L-citrulline + NO, par une réaction d'oxydation, avec consommation de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) et de dioxygène O_2 (Ignarro, 2000). Ce NO induit alors une vasodilatation et permet la régulation du flux sanguin et de la pression. Il permet également de prévenir l'agrégation plaquettaire aux cellules endothéliales ou encore de maintenir la fonction de barrière des cellules endothéliales (Rodrigues and Granger, 2015). Un stock de NO est formé au sein des cellules par établissement de liaisons S-NO entre le NO et les thiols accessibles des acides aminés cystéine des peptides et protéines. Ce phénomène de S-nitrosation et transnitrosation – menant par exemple à la formation *in situ* de GSNO – a été reporté comme un mécanisme de stockage de NO au niveau vasculaire (Manukhina et al., 2002; Rodriguez et al., 2003). Le GSNO est alors pris en charge par différentes enzymes : la GSNO réductase (GSNOR), la carbonyl réductase de type 1 (CR1), le système des thiorédoxines, les protéines disulfure isoméras (PDI), ou encore la gamma-glutamyltransférase (GGT) (Bateman et al., 2008; Hara et al., 2017; Staab et al., 2011).

Au niveau intestinal, le NO est sécrété par les cellules entériques gliales comme neurotransmetteur (Ruhl et al., 2004), mais le devenir du NO – et du GSNO résultant – y est encore peu connu. Cependant, la présence d'enzymes du métabolisme du GSNO a été décrite au niveau intestinal telles que la GGT ou encore la PDI même si, à l'heure actuelle, peu d'études se sont penchées sur l'expression et l'activité de ces enzymes à l'échelle intestinale (Bălăeț et al., 2018; Verma et al., 2015).

Ainsi, et pour mieux comprendre par la suite la prise en charge du GSNO apporté dans la lumière intestinale, par la barrière intestinale, nous nous sommes intéressés à certains de ces mécanismes enzymatiques et à l'implication de la GGT, de la PDI ou encore des thiols dans cette prise en charge. Avant de passer à l'article traitant de ces

données, voici quelques notions permettant de mieux comprendre le devenir du GSNO au niveau de la barrière intestinale.

1.1. GSNO réductase

La GSNO réductase (GSNOR) est une enzyme qui, chez Homme, est codée par le gène de l'alcool déshydrogénase de type 5 (*ADH5*) : cette enzyme est exprimée dans tous les tissus, et, à l'échelle cellulaire, est localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme avec une taille de 39,7 kDa et 374 acides aminés. Elle possède des sites d'activité riches en zinc Zn^{2+} et a pour substrat le GSNO. Brièvement, le GSNO arrivant au site catalytique de l'enzyme va être transformé en *N*-hydroxysulfonamide (composé intermédiaire instable), qui sera ensuite – en présence de glutathion – transformé en glutathion oxydé GSSG pouvant alors être pris en charge par la glutathion-réductase et donner du glutathion réduit GSH (Barnett and Buxton, 2017). Cependant, des études – notamment dans le cadre de l'asthme – indiquent un intérêt d'inhiber cette enzyme afin d'augmenter la biodisponibilité du GSNO dans les cellules et de favoriser les voies de signalisation médiées par le monoxyde d'azote : cette inhibition peut être réalisée de manière réversible en utilisant un composé, tel que le N91115 (= Cavosonstat) ou le N6022, ou encore en inactivant le gène *ADH5* (Green et al., 2012; Saxena et al., 2018; Sun et al., 2011). A ce jour, plusieurs essais cliniques ont vu le jour sur une concernant l'inhibition de la GSNOR : des études sur patient sain de sécurité de ces inhibiteurs, des études concernant l'asthme et des études concernant la fibrose kystique. D'un point de vue purement mécanistique, la GSNOR agit en métabolisant le GSNO par réduction en glutathion disulfure (GSSG) et ammoniac (NH_3), elle permet également de moduler la nitrosation des protéines : dans le cas d'une activité réduite de la GSNOR, il y aura davantage de GSNO, donc plus de sources de NO disponible, ce qui augmente la possibilité d'avoir des protéines nitrosées par des phénomènes de *S*-nitrosation (protéines à cystéine ou thiols) (Choi, 2018). Il est important de comprendre que pour cette enzyme, la GSNOR, il n'y a pas de libération de NO, mais simplement une réduction de la quantité de GSNO en tant que source de NO (équivalent à sa biodisponibilité).

1.2. Gamma-glutamyltransférase (GGT) et L-aminotransférases (L-AT)

La gamma-glutamyltransférase (GGT) est également une enzyme permettant la prise en charge du GSNO au niveau cellulaire. Dès 1981, cette enzyme a été mise en

évidence en importantes quantités dans de nombreux organes, dont le foie, les reins ou encore l'intestin (Meister et al., 1981). La GGT permet de couper toutes les liaisons de type gamma-glutamyl, liaison qui est également présente au niveau de la structure du GSNO : elle permet donc de convertir le GSNO en S-nitrosocystéinyglycine (CysGlyNO), puis de libérer du NO, favorisant la régulation du stress oxydant (Pompella et al., 2007) (Figure 14).

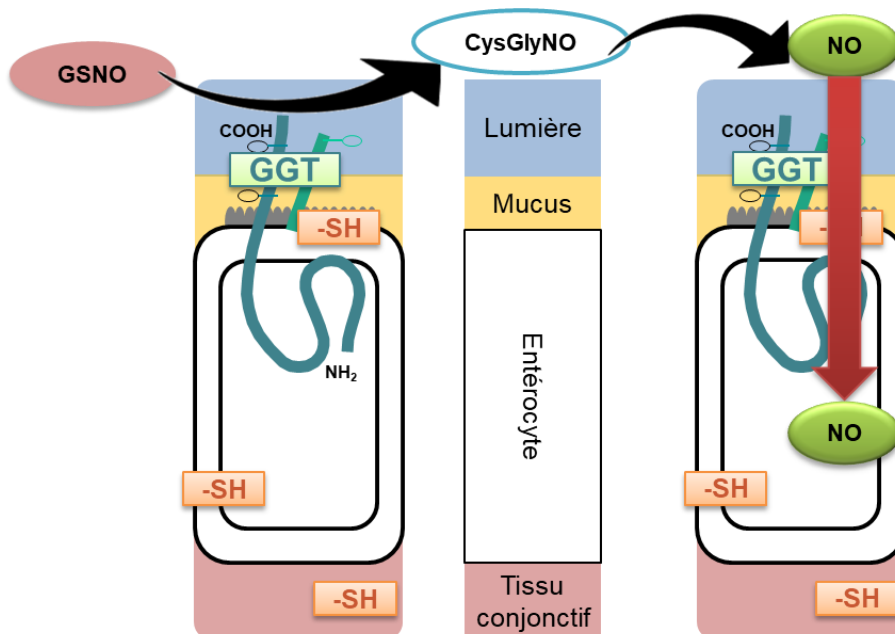


Figure 14 : Mécanisme de prise en charge du GSNO par la barrière intestinale. Le GSNO arrivant à la barrière intestinale est pris en charge par la GGT qui va déglutaminer le GSNO, libérant de la S-nitrosocystéinyglycine (CysGlyNO), permettant de relarguer du NO qui pourra diffuser au travers de la barrière intestinale.

Castellano et Merlino, en 2013, ont décrit précisément la structure et la fonction de la GGT, et il s'avère que celle-ci possède un site actif sur lequel peut se fixer un substrat de la famille des glutamines, telle que la glycylglycine, et que des métaux tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} permettent également d'activer l'enzyme.

D'un point de vue expérimental, l'implication de cette enzyme peut être mise en évidence par inhibition réversible *via* l'utilisation du complexe sérine-borate (SBC) (Dahboul et al., 2012; Perrin-Sarrado et al., 2016; Tate and Meister, 1978). Ce SBC consiste en le mélange entre de la L-sérine et du borate de sodium : ce mélange va donc se fixer sur le site gamma-glutamyl de la GGT, empêchant la fixation de son substrat enzymatique (glycylglycine) et établissant ainsi une inhibition compétitive.

Bien que peu d'études se soient penchées sur les L-aminotransférases au niveau intestinal (L-aminoacid transporters, L-AT en anglais), il est néanmoins évident que ces enzymes ont un rôle dans la prise en charge du GSNO au niveau cellulaire : en effet, par des phénomènes de transnitrosation, le GSNO va donner son NO à un thiol portant une cystéine, formant la S-nitroso-L-cystéine qui pourra alors être prise en charge par la L-aminotransférase. Ceci permettra de faire rentrer du NO – sous forme de cystéine-NO – dans la cellule : une fois au sein de la cellule, le NO va pouvoir à nouveau se détacher de la cystéine, puis réagir avec d'autres protéines par transnitrosation intracellulaire, et former d'autres RSNO par nitrosation des thiols environnants (Broniowska et al., 2013).

1.3. Protéine disulfure isomérase (PDI) et implication des thiols

La protéine disulfure isomérase est en réalité une famille de protéines, dont 19 puis 21 isoformes ont été mises en évidence chez l'Homme, isoformes dont les orthologues ont été identifiés chez la souris. Cette famille d'enzymes permet la formation de liaisons disulfures, notamment au niveau du réticulum endoplasmique (Ellgaard and Ruddock, 2005; Galligan and Petersen, 2012). Des PDI telle que l'AGR2, de par son association avec MUC2, est responsable – et indispensable – pour la production du mucus intestinal (Park et al., 2009). D'un point de vue structural, la PDI est une thiorédoxine composée d'une ou deux cystéines (en fonction de l'isoforme), ces cystéines pouvant par la suite être nitrosées en présence de monoxyde d'azote, tout comme les thiols, sous l'action de la PDI qui va former la liaison S-NO. Ainsi, il est intéressant dans un cadre expérimental d'étudier l'implication des thiols dans la prise en charge du GSNO, en inhibant la PDI par utilisation du *N*-éthylmaléimide (NEM) : en effet, le NEM permet de bloquer les thiols et résidus cystéines (Carbone et al., 2005), et empêche donc les phénomènes de transnitrosation pouvant survenir en présence de GSNO. Pour rappel, ces phénomènes de transnitrosation consistent en le transfert du NO d'une protéine à une autre protéine, en se fixant sur une cystéine ou un thiol, et permettant la formation de nouveaux donneurs de NO (cf. partie 5.3).

Parmi les résultats qui n'ont pas été montrés dans l'article, il a été réalisé des vérifications préalables afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de biais de la méthodologie expérimentale sur l'étude. Aussi, l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques, tel que le SBC inhibant la GGT par exemple, il est indispensable de vérifier avant tout si cette

inhibition n'altère pas l'intégrité du tissu intestinal. Pour cela, il a été réalisé une étude de perméabilité intestinale en utilisant la fluorescéine sodique, en chambre de Ussing, en présence ou non de SBC à 20 mM (Figure 15). La même démarche a également été réalisée pour les autres activateurs et inhibiteurs enzymatiques, ainsi que pour le bloqueur de thiols. Les résultats de cette vérification ont montré qu'il n'y avait pas de perturbation de la perméabilité de la barrière intestinale, quelle que soit l'activation ou l'inhibition réalisée, puisqu'il n'y a aucune différence significative de la perméabilité de la fluorescéine sodique, comparativement au groupe contrôle.

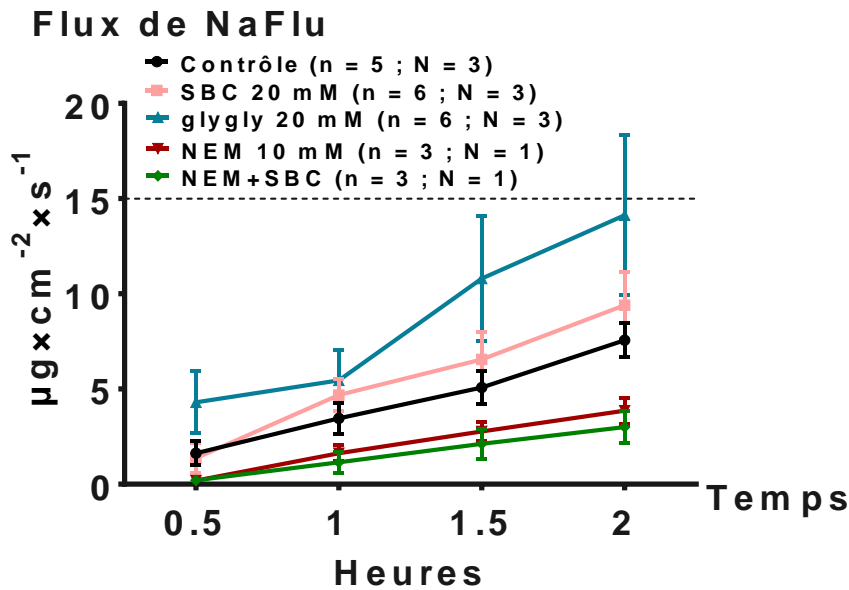


Figure 15 : Evolution du flux de fluorescéine sodique (NaFlu, 2.7 mM) en présence ou non de SBC 20 mM, de Gly-Gly 20mM, de NEM 10 mM ou du mélange NEM+SBC, pendant 2 h en chambre de Ussing. $p < 0.05$ vs Control; ANOVA à deux facteurs (temps et groupes).

Même s'il n'y a aucune modification significative démontrée par ces résultats, c'est justement là l'intérêt de les mentionner : en effet, s'il y avait eu une modification de la perméabilité intestinale par ces molécules, il aurait été beaucoup plus compliqué d'avoir une vision précise de la perméabilité des espèces ^{15}NO . En effet, si la présence de ces activateurs ou inhibiteurs modifiaient la perméabilité intestinale, et si ces études préalables n'avaient pas été réalisées, il aurait été compliqué de conclure sur les résultats de l'étude sans qu'ils soient biaisés. Plus précisément, si l'utilisation de ces modulateurs enzymatiques induisait une augmentation de la perméabilité intestinale, et donc altérait l'intégrité de la barrière intestinale, cela faciliterait le passage des espèces ^{15}NO (vs contrôle) ; et, de la même façon, si l'utilisation de ces modulateurs enzymatiques induisait une diminution de la perméabilité intestinale, cela ralentirait le

passage des espèces ^{15}NO (vs contrôle) : ces modifications de perméabilité nous feraient conclure à une part inexacte de l'activité de ces enzymes dans la métabolisation du GSNO, et nous en tirerions des conclusions scientifiquement erronées.

Dans le chapitre précédent, la perméabilité intestinale du GSNO, apporté dans la lumière intestinale, a été étudiée : une perméabilité moyenne à faible a été observée selon le modèle d'étude utilisé. Après avoir déposé 100 μM (soit 250 nmol) de GSNO dans le compartiment donneur (mimant la lumière intestinale) de la chambre de Ussing, seulement 0,1 nmol de RS^{15}NO a été retrouvé après 2h dans le compartiment accepteur (mimant le compartiment systémique). De ces résultats, il est important de pouvoir quantifier les espèces ^{15}NO dans les trois compartiments (donneur, intestinal et accepteur), puis d'étudier la prise en charge du GSNO apporté dans la lumière intestinale, afin de mieux comprendre ces observations. Ce fut donc l'objectif de l'article présenté dans ce chapitre.

Article 3 : “Influence of S-nitrosoglutathione metabolism on its intestinal permeability” (Expert opinion on drug metabolism and toxicology)

Les protocoles détaillés relatifs à cet article se trouvent en fin de manuscrit (voir Annexes) intitulés “Measurement of nitrite, nitrate ions and S-nitrosothiols using the 2,3-diaminonaphthalene assay by spectrofluorometry”, “Measurement of nitrite, nitrate ions and S-nitrosothiols using the 2,3-diaminonaphthalene assay by LC coupled with tandem mass spectrometry”, “Quantification of S-nitrosothiols in the rat intestine with 2,3-diaminonaphthalene assay by HPLC coupled with fluorescence detection”, “Measurement of γ -glutamyltransferase activity by spectrophotocolorimetry” et “Permeability studies of S-nitrosothiols in isolated rat intestine using Ussing chamber”.

L'article ci-après se focalise sur l'implication de la GGT, de la PDI et des thiols dans la prise en charge du GSNO au niveau intestinal, en utilisant les modèles validés précédemment. Notre intérêt vis-à-vis de ces enzymes n'est pas anodin puisqu'il a été démontré leur présence et leur activité au niveau intestinal. Ainsi, en employant les

méthodologies décrites plus haut et permettant de vérifier l'activité enzymatique de la gamma-glutamyltransférase (GGT) et de la protéine disulfure isomérase (PDI), ainsi que l'implication des thiols, cela nous aiderait à mieux comprendre comment le GSNO pourrait agir sur la barrière intestinale. Les résultats présentés dans l'article démontrent une implication des enzymes GGT et PDI à l'échelle intestinale : en effet, il a été mesuré une activité de $6,83 \pm 0,84$ nmol de 3-carboxy-4-nitroanilide $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines, et ce en activant la GGT par l'ajout de ses substrats (glycylglycine et MgCl_2). Par ailleurs, la présence de la PDI a été mise en évidence par western blot, même si la mesure de son activité n'a pu être réalisée (les anticorps actuels manquent de spécificité). Lors d'une incubation du tissu intestinal avec du GSNO, le fait d'ajouter un inhibiteur de la GGT (complexe sérine borate, SBC) ainsi qu'un bloqueur de thiols (*N*-éthylmaléimide, NEM), il s'avère que la dégradation du GSNO est moindre avec davantage de RSNOs retrouvés dans le compartiment accepteur. Dans un autre versant, le fait d'ajouter des substrats enzymatiques de la GGT (glycylglycine et MgCl_2), favorisant son activité enzymatique, ceci induit une perméabilité accrue des ions nitrite NO_2^- (produit de dégradation du GSNO).

Les résultats obtenus lors des travaux présentés dans cet article permettent donc de mieux comprendre comment le GSNO est pris en charge par la barrière intestinale, et ouvre la voie vers l'observation de ses effets sur celle-ci.

Influence of S-nitrosoglutathione metabolism on its intestinal permeability

Haiyan Yu^{1,2*}, Romain Schmitt^{1,*}, Pierre Leroy^{1,3}, Caroline Gaucher¹,
Patrick Chaimbault⁴, Anne Sapin-Minet^{1,**}

¹ Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

² Clinical Medical Research Center, The Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen, Guangdong 518020, China (present address)

³ Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France (present address)

⁴ Université de Lorraine, LCP-A2MC, F-57000 Metz, France

*Equal contribution to the present work

**Correspondence to: Anne Sapin, Université de Lorraine, CITHEFOR EA 3452, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France (anne.sapin@univ-lorraine.fr)

Abstract

Intestinal permeability of nitric oxide donor orally administered, such as S-nitrosoglutathione (GSNO) is mainly driven by its metabolism linked to γ -glutamyltransferase (GGT) enzymatic activity and to thiol abundance at the intestinal level. Intestine metabolism of drugs is rarely integrated in drugs permeability study. To check GGT activity and/or thiol abundance implication in GSNO metabolism, we quantified (i) GGT activity and thiol content in isolated rat intestine, (ii) GSNO metabolites (S-nitrosothiols (RSNOs), nitrite and nitrate ions) using the *ex vivo* model of isolated rat intestine, and (iii) GSNO intestinal permeability through its metabolites. GGT specific activity was identified in isolated rat intestine in presence of enzymatic activators (glygly-MgCl₂) as well as thiol presence within the intestine. GSNO incubated with GGT activators increased its degradation rate, which is lowered by GGT inhibition using serine-borate complex, (SBC) and by thiols blocking using N-ethylmaleimide, (NEM) ($p < 0.05$). Also, GSNO metabolites quantification by spectrofluorometry and liquid-chromatography coupled to fluorescent detection (LC-FL), in presence of glygly-Mg²⁺ showed an increased permeation of nitrite ions, whereas GGT inhibition and thiols blocking increased RSNOs permeation ($p < 0.05$). Finally, the stimulation of GGT activity switched GSNO intestinal permeability from low to medium permeability according to the Biopharmaceutical Classification System (BCS). Taken together, these results indicated that the protection from GGT and the thiol-mediated transnitrosation could improve performance of the GSNO as a drug candidate.

Keywords: S-nitrosoglutathione; nitric oxide species; rat intestine; *ex vivo* model; intestinal permeability and metabolism; γ -glutamyltransferase; thiols.

1. Introduction

Along with endothelial dysfunction resulting from aging and cardiovascular diseases (CVDs), the activity of endothelial nitric oxide (NO) synthase decreases leading to a lower production of NO. This low production associated with an increase of NO catabolism induced by the surrounding oxidative stress [1] participates to the general diminution of NO bioavailability. S-nitrosoglutathione (GSNO), the S-nitrosated form of reduced glutathione (GSH), is known to be a physiological reservoir of NO and possesses high potency to treat CVDs. Indeed, GSNO does not present the drawbacks of presently marketed NO donors, especially tolerance phenomenon and oxidative stress induction [2]. Since most of CVDs are chronic, oral administration of GSNO appears to be the most convenient administration route. According to the Biopharmaceutical Classification System (BCS), a drug suitable for oral administration should combine a high solubility in aqueous media and a high permeability through intestinal membrane [3].

Drug absorption within the gastrointestinal tract (GIT) mainly occurs in the small intestine. Interestingly, ileum shows better absorption than jejunum, due to a longer residence time and a heavier mucus thickness (3-4 vs 2-3 h, 476 vs 123 μm , respectively) [4,5]. Before being absorbed at the intestine level, proteins need to be digested into amino acids or di- or tripeptides, which are mainly absorbed in the jejunum through transporters and hydrolyzed into amino acids by peptidases in enterocytes [6]. Intestinal permeability of drugs can be evaluated using *ex vivo* models such as isolated intestine in Ussing chamber, allowing to study a full-layered tissue close to biological conditions. However, as far as we know, intestine metabolism of drugs is rarely integrated in drug permeability study.

S-nitrosoglutathione cannot cross the plasma membrane to reach the cytosolic compartment as unconverted entity. Several non-enzymatic and enzymatic mechanisms are involved in its degradation process leading to NO release and uptake by the cell. Among them, its degradation by γ -glutamyltransferase (GGT; EC 2.3.2.2) has already been pointed out as the main pathway [9].

The glycoprotein GGT is a membrane-bound enzyme involved in the catabolism of extracellular GSH, glutathione disulfide (GSSG), glutathione conjugated with electrophilic compounds and GSNO [13–15], which active site is exposed at the cell surface. GGT hydrolyzes the γ -glutamyl bond of glutathione providing cysteinylglycine, which in turn is cleaved *via* dipeptidase catalysis. Cysteine, the rate-limiting substrate for GSH intracellular *de novo* synthesis, enters the cell through the L-amino acid

transporter. GGT is widely distributed in the living cells, from bacteria to mammals and plants, as well as glutathione. In mammals, GGT is expressed in all organs and it is primarily found at cell surface of secretory or absorptive tissues such as kidney, liver, seminal vesicles/prostate, small intestine, and it is present in epithelial cells [12]. GGT presents a very low hydrolytic activity so its transpeptidase activity is mainly considered: GGT can transfer the γ -glutamyl residue of GSH to acceptors such as peptides and release the cysteinylglycine dipeptide. Numerous acceptors of the γ -glutamyl residue exist in tissues. Among them, glycylglycine (glygly) is commonly used for studying GGT activity. In addition, quantification of GGT activity requires divalent cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} [16]. At last, serine-borate complex (SBC), a competitive inhibitor, is commonly used for GGT activity study, as it has already been shown to protect GSNO from its hydrolysis by GGT enzymatic activity in blood samples [17]. In a biological environment, GSNO undergoes transnitrosation reactions (Figure 1B) and it decomposes under the action of many factors such as thiols (Figure 1C), reductants and enzymes, resulting in NO release and the formation of corresponding by-product, *i.e.* GSSG [18].

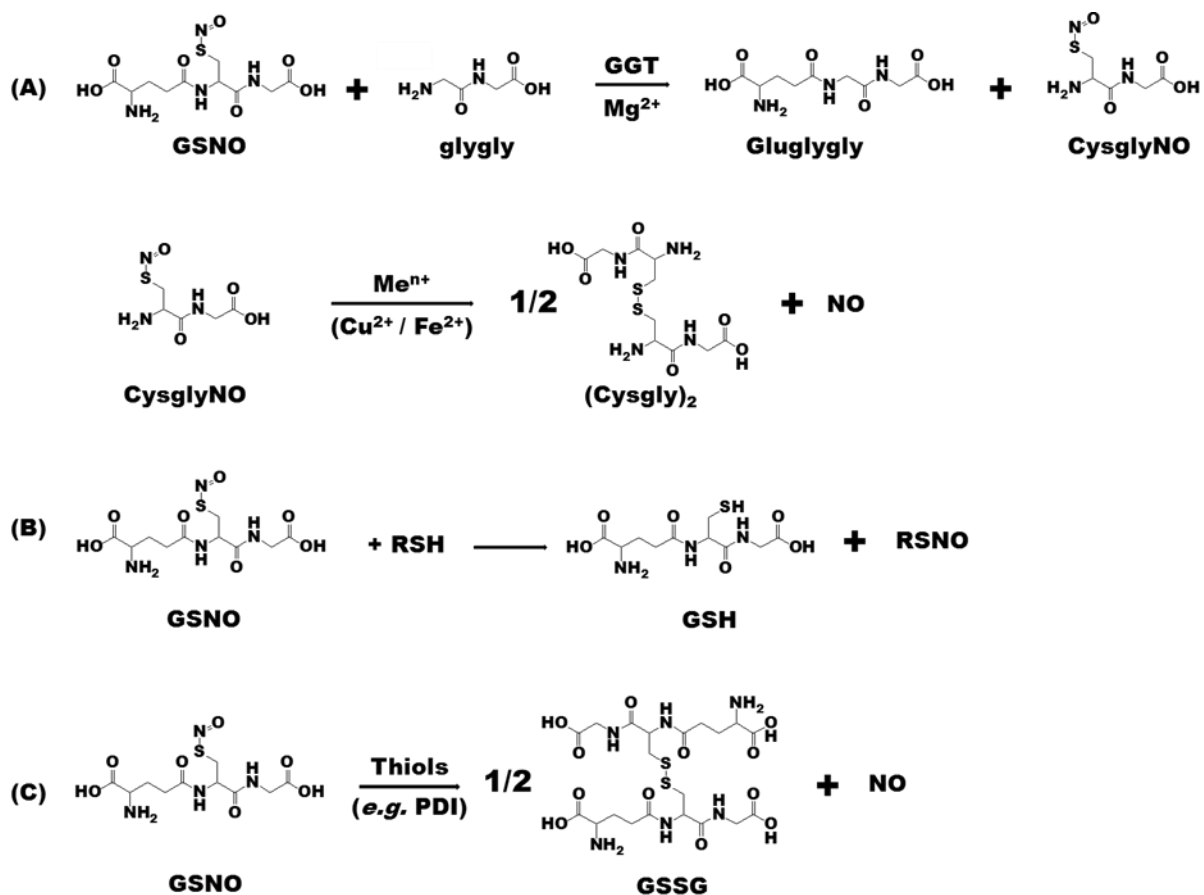


Figure 1. Scheme of S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism leading to: NO release via (A) γ -glutamyltransferase (GGT) catalysis, (B) S-nitrosothiols (RSNO) formation

through transnitrosation reaction with other thiols (RSH); (glygly: glycylglycine; GSSG: glutathione disulfide) and (C) reaction with thiols in active sites of enzymes such as protein disulfide isomerase (PDI) isoforms

The catabolism of GSNO by GGT leads to the formation of S-nitrosocysteinyglycine (CysGlyNO) with similar Michaelis constant for GSH and GSNO *ca.* 400 μ M has been reported [19,20], Figure 1A, which is transformed to S-nitrosocysteine (CysNO), entering the cell through L-amino acid transporter. NO release is also possible from S-nitrosocysteine, which is much more labile than GSNO. As a lipophile entity, NO can then easily cross the plasma membrane. The role of GGT in the release of NO from GSNO and in the vasodilation has previously been investigated in an *ex vivo* model (isolated rat aorta) [21]. Many forms of NO exist in the organism, among them the family of S-nitrosothiols, which correspond to proteins nitrosated on their thiol functions; RSNOs metabolites, namely nitrite ions (NO_2^-) and nitrate ions (NO_3^-). NOx species correspond to the combination of the three species, RSNOs, NO_2^- and NO_3^- .

Additionally, enzymes involved in GSNO catabolism include protein disulfide isomerase (PDI) isoforms which have a denitrosating activity and thus participate to the transfer of NO to the cytosol. PDIs belong to the enzyme family of redoxins in which the active site contains two cysteine residues with the following sequence: C-X-X-C. They are expressed in the endoplasmic reticulum membrane where they participate to the protein folding, and in the plasma membrane. Their translocation to the plasma membrane is induced by oxidative stress. PDIs are implicated in the modulation of mucus production [22].

GSNO can also be denitrosated by several pathways but it also participates to transnitrosation reactions with amino acids, peptides and proteins containing cysteine, resulting in the formation of corresponding S-nitrosoaminoacids, S-nitrosopeptides or S-nitrosoproteins.

According to the literature, the conversion of nitrate ions (NO_3^-) to nitrite ions (NO_2^-) in the GIT by microorganisms is well known [25]; the formation of RSNOs in stomach and their chemical decomposition have also been reported [26]. Several reports conclude on the efficiency of GSNO after oral administration in rats: (i) GSNO either as a free molecule [27] or formulated [28] improves the therapeutic score in a rat model of stroke; (ii) GSNO encapsulated nanocomposite particles administered to Wistar rats

showed an increase of NO storage in vessels [29]. GSNO exhibits a passive transportation mechanism in a Caco-2 cell monolayer model and belong to the medium permeability class [11]. However, little is known about its intestinal metabolism, and the involved factors in the transfer of GSNO from GIT to blood vessel, although it is a crucial point as it can influence further nitric oxide donor drugs research and development strategies. The present work aims at studying denitrosating activity influence on GSNO metabolism and permeability using an isolated rat intestine model.

2. Methods

2.1. Material and Reagents

All reagents were of analytical or chromatographic grade and used without further purification. Reduced *L*-glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), γ -glutamyltransferase (GGT) (bovine kidney, EC 2.3.2.2), *L*- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide (GCNA), glycylglycine (glygly), *L*-serine, sodium borate, *N*-ethylmaleimide (NEM), 2,3-diaminonaphthalene (DAN), mercuric chloride (HgCl₂), 5,5 -dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and sodium fluorescein were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Sodium ¹⁵N-nitrite (Na¹⁵NO₂) was supplied by Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA). Nitrate/Nitrite fluorometric assay kit (ref. 780051) was obtained from Cayman Chemical (Michigan, USA)

S-nitrosoglutathione was synthesized as previously described [30]. Briefly, 20 mM GSH were incubated with 20 mM NaNO₂ in 500 mM HCl at 4°C in the dark for 60 min. The reaction was stopped by neutralization with NaOH (40%) and was further 2-fold diluted with 500 mM phosphate buffer (KH₂PO₄, MW=136.09; EDTANa₂·2H₂O, MW=372.24; pH 7.4). The final GSNO concentration was determined by UV spectrophotometry (UV-1800, Shimadzu, Lognes, France) at a wavelength of 334 nm ($\epsilon = 922 \text{ mol}^{-1} \times \text{L} \times \text{cm}^{-1}$). GS¹⁵NO was synthesized as above using Na¹⁵NO₂.

All experiments and assays involving GSNO were conducted under conditions of subdued light.

2.2. Isolation of rat intestine

All experiments were performed in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals in the respect of the 3 Rs' requirements for Animal Welfare. The protocols and procedures were approved by the advisory regional ethical committee on animal experiments: "Comité d'Ethique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale", CELMEA protocol agreement N°02420.03.

Animals were kept under standard conditions (temperature: 21 ± 1 °C, hygrometry $60 \pm 10\%$, light on from 6 am to 6 pm) and had free access to standard diet (A04, Safe, Villemoisson-sur-Orge, France) and water (reverse osmosis system, Culligan, Brussels, Belgium). Wistar rats (350 ± 50 g, 10 ± 2 weeks old, males, Janvier Laboratories, Le Genest Saint Isle, France) were used. Isolated rat intestine (ileum, weight, 100 ± 5 mg; length, 1 cm) was obtained after sacrifice (anesthesia with sodium pentobarbitone ($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, intraperitoneal injection, Sanofi Santé Nutrition Animale, Libourne, France), administrated with heparin ($1000 \text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ heparin Choay, penis vein) and sacrificed by exsanguination). The fat tissue along the mesenteric attachment was removed and the ileum was longitudinally opened, followed by a quick 2 times rinsing with 1 mL of phosphate buffer.

2.3. Evaluation of GGT activity

γ -glutamyltransferase activity was determined using a specific chromogenic substrate, *i.e.* GCNA [31]. Briefly, isolated rat intestine (weight, 100 ± 5 mg; length, 1 cm) prepared in section 2.2 was incubated with 1 mM GCNA, 20 mM glygly and 10 mM MgCl_2 (glygly- Mg^{2+}) in presence or absence of 20 mM SBC (20 mM serine-20 mM sodium borate) in 5 mL of 0.1 M Tris buffer (Trizma-HCl, MW=158; pH 7.4) at 37°C under rotation (35 rpm, CAT Roller RM5-40, Dordrecht, Netherlands). The absorbance was read at 405 nm every 10 min during 30 min (ϵ (3-carboxy-4-nitroanilide) = $9\,500 \text{ mol}^{-1} \times \text{L} \times \text{cm}^{-1}$). GGT specific activity was expressed in nmol of obtained product per min per mg of proteins.

2.4. Quantification of thiols

The thiol content was measured using the DTNB (Ellman's reagent) method. Briefly, 750 μL of 1 mM DTNB in Tris buffer (0.1 M, pH 7.4) were incubated with intestine at room temperature in the dark under rotation (35 rpm, CAT Roller RM5-40) for 10 min. Then, 200 μL of medium were transferred to a 96-well microplate and the absorbance at 405 nm was read (EL800 Microplate Reader, BioTek Instruments). The efficiency of NEM to block all thiols including those of cysteine residues in active sites of redoxins like protein disulfide isomerase (PDI) was also assessed (data not shown). First, intestine was pre-incubated with 5 mL of 10 mM NEM in Tris buffer (0.1 M, pH = 7.4) at 37 °C under rotation for 10 min. Then, intestine was rinsed with 5 mL of phosphate buffer for 3 times, Next, DTNB was added to quantify remaining active thiols with procedures described above. Thiol amount was expressed in nmol of thiols per mg of proteins.

2.5. Extraction and quantification of proteins in intestine

Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce Protein Assay Kit), with bovine serum albumin as standard. Proteins were extracted from isolated rat intestine samples as follows: rat intestine sample was smashed into powder in liquid nitrogen. Then, 100 mg of intestine powder were mixed with 400 μL of lysis buffer (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), and 1 % pure Triton X-100), and incubated at 4°C in the dark for 10 min. Next, the lysates were centrifugated at 15,000 $\times g$ at 4°C for 15 min and proteins from supernatants were precipitated with 3.3 mL of acetone (pure, stored at -20°C). After centrifugation at 3,000 $\times g$ at 4°C for 10 min, 200 μL of lysis buffer were used to resuspend the pellet of proteins before storage at -80 °C and quantification.

2.6. Stability of GSNO in isolated rat intestine

Fifty μM GSNO (250 nmol) in 5 mL of Tris buffer (0.1 M, pH 7.4) were incubated with isolated rat intestine placed in a 15-mL polypropylene tube at 37°C under rotation (35 rpm, CAT Roller RM5-40). This incubation was performed in the presence of *i*) 20 mM glygly, 10 mM MgCl_2 (glygly- Mg^{2+}), or *ii*) glygly- Mg^{2+} and 20 mM SBC (glygly- Mg^{2+} -SBC), or *iii*) glygly- Mg^{2+} -SBC and 10 mM NEM (glygly- Mg^{2+} -SBC-NEM). Every 10 min during 60 min, 25 μL of reaction medium were collected and diluted 25 times in PBS for GSNO quantification using the DAN- Hg^{2+} assay [10] (measurements in triplicate). In parallel, the stability of GSNO in oxygenated Krebs solution in the absence of intestine was evaluated.

2.7. Measurement of NO_x species

Methods for NO_x species quantification were validated: five-points calibration curves of NaNO_2 and GSNO standards (blank, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50 nM) were done in triplicate for three different days [32,33]. Moreover, before studying the role of intestinal GGT and thiols in GSNO degradation and permeation through isolated rat intestine in Ussing chamber, the potential influence of the different additives (glygly- Mg^{2+} , SBC and NEM) was checked on intestine integrity by measuring transepithelial electrical resistance (TEER) value over 2-h, using an adapted Millicell® ERS ohm-meter (Millipore). Values were above 30 ohm $\times \text{cm}^2$ at the beginning of the experiment, and so correlated to literature values [34]. The intestinal permeability of 100 μM (250 nmol) GS^{15}NO with and without glygly- Mg^{2+} , and glygly- Mg^{2+} -SBC-NEM in Ussing chamber was evaluated with the same procedure described before [35]. In parallel, the same experiments using Ussing chamber without isolated rat intestine were carried out to evaluate GSNO stability at 37°C with $\text{O}_2\text{-CO}_2$ (95:5, V/V) mixture bubbling.

Three analytical methods have been used, all relying upon the derivatization of nitrite ions with the fluorogenic reagent 2,3-diaminonaphthalene (DAN) giving rise to the fluorescent adduct naphthotriazole (NAT). For RSNOs measurement, mercuric ions were used to cleave the S-NO bond before the derivatization step. RSNOs concentration was calculated by subtracting nitrite ions concentration from the sum ($\text{NO}_2^- + \text{RSNOs}$). For nitrate ions measurement, an enzymatic reduction step was applied. The nitrate concentration was calculated by subtracting nitrite ions concentration from the sum ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$).

According to the required selectivity and limit of quantification (LOQ) in analyzed samples, one of the three following approaches was used, and all experiments were done in a subdued light environment:

(1) direct fluorescence measurement of NAT by using a microplate reader (FP-8300iRM, JASCO, Tokyo, Japan); the LOQ reached by this method was $0.2 \mu\text{M}$ [10,35] and it was applied to samples coming from the donor compartment of the Ussing chamber: one hundred μL of each standard (concentration range: $0.1 - 2 \mu\text{M}$) or sample (in triplicate) were mixed with $20 \mu\text{L}$ of 0.105 mM DAN solution in 0.6 M HCl. The mixture was agitated at 500 rpm (Heidolph, VIBRAMAX 110) at room temperature for 1 min , followed by incubation at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in the dark for 10 min . Then, $20 \mu\text{L}$ of 2.1 M NaOH were added. The mixture was then agitated for another 5-min period, before measuring fluorescence intensity (spectrofluorometer model: FP-8300iRM, JASCO, Tokyo, Japan) coupled with an FMP micro-well plate reader. The excitation and emission wavelengths were 375 and 415 nm , respectively. For RSNOs and ($\text{RSNOs} + \text{NO}_2^-$) measurements, DAN reagent was replaced by DAN- HgCl_2 reagent. The concentrations of NO_3^- and ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) were measured using the Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman, (ref. 780051). Twenty μL of each standard (concentration range: $0.75 - 25 \mu\text{M}$) or sample (in triplicate) were derivatized according to the manufacturer protocol and the fluorescence intensity was measured as above.

(2) NAT extraction with acetonitrile and its analysis by reversed phase liquid chromatography coupled with fluorescence detection (LC-FL). A higher sensitivity was obtained than with direct fluorescence measurement and a LOQ of $0.025 \mu\text{M}$ was obtained; it was applied to the tissue samples: the rat intestine was smashed into powder in liquid nitrogen in a mortar; $20 \pm 2 \text{ mg}$ intestine powder were spiked with $20 \mu\text{L}$ of NaNO_2 or GSNO standard solutions. Next, $600 \mu\text{L}$ DAN or DAN/ Hg^{2+} in 0.6 M HCl were added, followed by vortex mixing for 30 s . The mixture was then incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min under rotation (80 rpm , MX-RD-E Classic Rotator, Labtech,

Cernusco, Italy). Forty μL of 10 M NaOH were added, and mixed by vortex for 10 s. Finally, 600 μL acetonitrile were added, followed by centrifugation at $18,000 \times g$ at 4°C for 15 min. The supernatant was collected and stored at 4°C for a maximum period of 24 h before analysis by LC-FL. Twenty μL of the supernatant was injected onto a ZORBAX SB-Aq C18 column (4.6×150 mm, $3.5 \mu\text{m}$, Agilent) eluted with CH_3CN -0.01 M ammonium acetate pH 7.2 (28:72, v/v); a spectrofluorometric detector (RF-10A XL model, Shimadzu, Kyoto, Japan) was used with excitation and emission wavelengths set at 375 and 415 nm, respectively, was used. Background levels of nitrite and RSNOs in Tris buffer and intestine without GSNO treatment corresponding to blanks were measured and subtracted from all values.

(3) NAT analysis by using LC coupled to Electrospray-Ion Trap tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-ITMS/MS) after labeling with ^{15}N as described before [8,35,36]. The LOQ reached by this method was 5 nM, it was applied to samples from the acceptor compartment of the Ussing chamber: permeated ^{15}N -NO species were derivatized and injected (20- μL loop) into a LC-ESI-ITMS/MS system (Dionex, Ultimate 3000, coupled with LTQ Velos Pro, Thermo Scientific, San José, CA, USA). An Acclaim 120 C18 column (2.1×150 mm ID, $3 \mu\text{m}$, Thermo) was eluted with a gradient mobile phase consisting of acetonitrile (from 40 to 80 %) and 0.01 M acetic acid solution. The ion trap mass spectrometer, fitted with the HESI-II probe (electrospray), was set to monitor transitions of m/z 171 to 156 for ^{15}N -NAT quantification (operated in HCD fragmentation mode as described in [37]).

The slopes and interceptions of both analytical methods used (DAN and DAN coupled with mercuric ions, DAN-Hg) were similar.

2.8. Calculation of the apparent permeability coefficient

The apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated using the following equation:

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

dQ/dt ($\text{mol} \times \text{s}^{-1}$) refers to the quantity of permeated NO related species (dQ) in the acceptor compartment at the time of quantification (dt), “A” to the membrane diffusion area (0.25 cm^2) and C_0 to the initial concentration of GS^{15}NO or sodium fluorescein in the donor compartment.

2.9. Statistical tests

All results were expressed as mean \pm standard error of the mean (sem). Values were analyzed with one-way ANOVA, followed by a Bonferroni's post-test, or a t-test of Student when appropriate, using the Graphpad Prism 5 software; $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Measurement of GGT activity and thiol concentration in isolated rat intestine

In presence of glygly-Mg²⁺, the specific GGT activity was 6.8 ± 0.3 nmol of 3-carboxy-4-nitroanilide.min⁻¹.mg⁻¹ of proteins (Table 1).

The thiol groups concentration in the intact isolated rat intestine was 26.5 ± 0.7 nmol of thiols.mg⁻¹ of proteins, and 93.0 ± 0.7 % of these thiols were blocked by NEM (Table 1).

GGT inhibitor (SBC) and NEM concentrations were chosen to obtain a total GGT inhibition and less than 2 nmol.mg⁻¹ of resting thiols, respectively (Table 1).

Table 1. Specific activity of γ -glutamyltransferase (GGT) and thiol concentration in isolated rat intestine. (ND#: not detected; -: not done; GCNA: *L*- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide; CNA: 3-carboxy-4-nitroanilide; SBC: serine-borate complex; DTNB: 5,5 -dithiobis(2-nitrobenzoic acid); NEM: *N*-ethylmaleimide). Results are shown as mean \pm sem of 3 independent experiments ($n = 3$) for thiol content, or $n = 9$ for GGT activity with substrate.

Incubating with isolated rat intestine	GGT activity (nmol of CNA min ⁻¹ .mg ⁻¹ of proteins)	Thiol content (nmol of thiol mg ⁻¹ of proteins)
Substrates (GCNA + glygly-Mg ²⁺ or DTNB)	6.8 ± 0.3	26.5 ± 0.7
Substrates + inhibitors (GCNA + glygly-Mg ²⁺ + SBC or DTNB + NEM)	ND#	1.9 ± 0.1

3.2. Stability of GSNO in isolated rat intestine

The concentration of GSNO in Tris buffer (50 μ M corresponding to 250 nmol per sample) at 37°C under conditions providing high oxygenation rate (fast rotation,

mimicking oxygenation in Ussing chamber) remained stable for at least 60 min. In the presence of intestine, around 40 % of GSNO (250 nmol as starting amount) were degraded within 60 min corresponding to a degradation rate of 0.5 ± 0.1 nmol of GSNO $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of proteins. This degradation was stimulated by adding glygly- Mg^{2+} (around 80 % of GSNO loss), rising its rate up to 0.9 ± 0.1 nmol of GSNO $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of proteins. SBC-NEM inhibited 100 % of GSNO catabolism (Figure 2A). Most of the initial amount of GSNO was converted to NO_3^- , and 83 ± 3 % of the initial content (250 nmol) was recovered at 60 min, corresponding to the mass balance of all recovered NO species (respectively, 47.7 ± 1.1 nmol of RSNOs; 22.3 ± 0.5 nmol of NO_2^- and 137.9 ± 5.1 nmol of NO_3^- , Figure 2B).

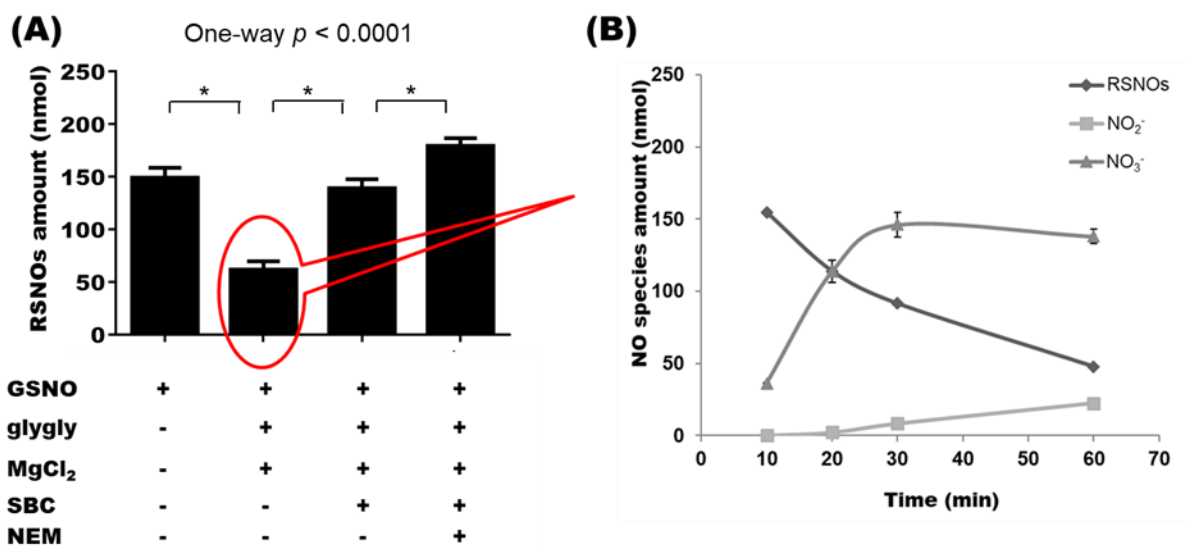


Figure 2. Remaining amounts of (A) S-nitrosothiols (RSNOs) (with an initial S-nitrosoglutathione (GSNO) amount of 250 nmol) after 60 min of incubation with different additives; (B) NO species (RSNOs, nitrite and nitrate ions) distribution when rat intestine is incubated with GSNO in the presence of glycylglycine (glygly) and MgCl_2 . Results are shown as mean \pm sem of 3 experiments ($n = 3$) and are compared using one-way ANOVA Bonferroni post-test. $*p < 0.05$ vs GSNO (additives: glygly, magnesium chloride (MgCl_2), serine-borate complex (SBC) and *N*-ethylmaleimide (NEM)).

3.3. Validation of the LC-FL method for NO species quantification

To quantify NO species in the intestine tissue, the conventional fluorometric assay relying upon DAN derivatization [10] did not exhibit enough specificity and sensibility. Thus, a LC-FL method was developed for NO_2^- and RSNOs quantification in the rat intestine tissue, also relying upon DAN derivatization. The LOQ ($0.025 \mu\text{M}$) was

reduced 8-fold as compared to the direct fluorescence measurement. A linear range of 0.3 – 2.2 nmol.mg⁻¹ of proteins was obtained, with a determination coefficient (r^2) higher than 0.995. The accuracy as the deviation (%) of calculated concentrations from the nominal concentrations was in the range of 97.0 -113.3 %. Satisfactory precision was obtained with intra- and inter-day results, less than 8.2 % and 11.9 %, respectively.

Table 2. Main validation parameters for S-nitrosoglutathione (GSNO) and nitrite ions (NO₂⁻) determination using the LC-FL method. Results are shown as mean ± sem of 3 experiments (n = 3).

NO species	Linearity (6.25 – 50 μM) Slope (a); intercept (b); determination coefficient (r^2)	Concentration (μM)	Accuracy (%)	Precision (%)	
				Intra-day	Inter-day
GSNO	a: 15308 ± 670 b: -51365 ± 32813 r^2 : 0.996 ± 0.003	6.25	113.3	0.7	10.2
		12.5	97.0	8.2	11.9
		25	98.6	6.4	5.7
		37.5	104.0	4.6	4.3
		50	100.3	4.5	5.6
NO ₂ ⁻	a: 16572 ± 126 b: -40458 ± 16971 r^2 : 0.995 ± 0.003	6.25	99.9	2.9	11.3
		12.5	100.2	0.4	2.0
		25	112.9	3.8	7.9
		37.5	101.8	2.1	7.9
		50	98.4	6.5	4.7

3.4. Influence of GSNO metabolism on its intestinal permeation

Different quality criteria were considered during intestinal permeation study to ascertain activators and inhibitors innocuity to the intestine tissue. To that purpose, intestinal integrity was monitored using either a marker of paracellular transport, *i.e.* sodium fluorescein, or the TEER value in the presence of additives. Both parameters did not show any modification under all studied conditions (Table 3), allowing us to

proceed in further study. In the absence of intestine, 100 μM GSNO alone or with glygly-Mg²⁺ or SBC-NEM remain stable in Ussing chamber's operating conditions.

Table 3. Apparent permeability values of sodium fluorescein (1 mg \times mL⁻¹), in the presence of SBC 20 mM, glygly 10 mM or NEM 10 mM added separately or a mix of SBC and NEM) for 2-h. Results are expressed in $\mu\text{g} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ and are shown as mean \pm sem of 3 experiments (n = 3).

Time (h)	Control	SBC	glygly	NEM	SBC+NEM
0.5	1.63 \pm 0.65	1.37 \pm 0.77	4.30 \pm 1.62	0.19 \pm 0.07	0.21 \pm 0.01
1	3.46 \pm 0.82	4.68 \pm .086	5.45 \pm 1.58	1.63 \pm 0.41	1.15 \pm 0.56
1.5	5.08 \pm 0.88	6.55 \pm 1.47	10.80 \pm 3.30	2.77 \pm 0.49	2.12 \pm 0.78
2	7.56 \pm 0.90	9.40 \pm 1.75	14.13 \pm 4.21	3.86 \pm 0.69	3.00 \pm 0.83

As shown in Figures 3A, 3B and 3C, the addition of GGT activator (glygly-Mg²⁺) has no impact on RSNOs remaining (30.5 % vs. 29.4 %) in the donor compartment. However, NO₂⁻ (23.4 % vs. 12.7 %) and NO₃⁻ (40.5 % vs. 23.2 %) release increased. GGT inhibition and thiols blocking increased the amount of remaining RSNOs (57.6 % vs. 29.4 %), without any impact on NO₂⁻ and NO₃⁻ release in the donor compartment (12.5 % and 23.2 %, respectively),.

In the acceptor compartment, a higher amount of permeated NO₂⁻ (0.7 vs. 0.2 nmol) was observed (in comparison to incubation with GSNO + activators), but the stimulation of GSNO degradation by adding GGT activator did not show a significant increase of NO₃⁻ amount (Fig 3E). Besides, the amount of permeated RSNOs was less than 0.01 nmol, and the corresponding concentration under 5 nM (LOQ reached in LC-ESI-ITMS/MS after DAN derivatization). When GGT inhibitor and blocking thiols are added, more RSNOs (0.5 vs. 0.1 nmol) permeated through intestine, with no difference for NO₂⁻ permeation, and NO₃⁻ was barely detected (Figures 3D, 3E and 3F).

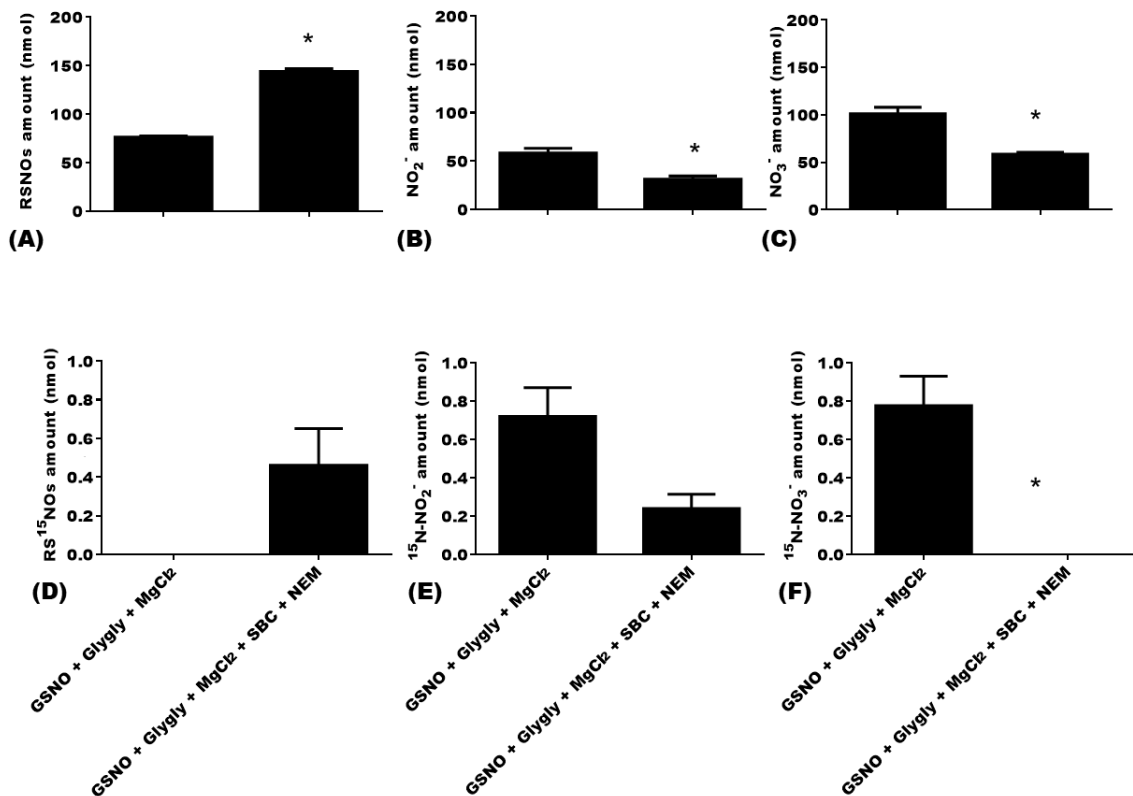


Figure 3. Remaining amounts of (A) S-nitrosothiols (RSNOs), (B) nitrite ions (NO₂⁻) and (C) nitrate ions (NO₃⁻) in the donor compartment of the Ussing chamber after a 2-h incubation of 100 μM (equal to 250 nmol) S-nitrosoglutathione (GSNO) with intact intestine, in the presence or absence of glygly-MgCl₂ and SBC and NEM; and permeated amounts of (D) S-nitrosothiols (RSNOs), (E) nitrite ions (NO₂⁻) and (F) nitrate ions (NO₃⁻) in the acceptor compartment under the same conditions. Results are shown as mean ± sem of experiments done in triplicate (n = 3) and are compared using t test of Student. *p < 0.05 vs GSNO + glygly + MgCl₂.

The absorbed amount of NO species into tissue and the permeated ones through intestine were less than 1%, whether GGT was activated (using glygly-Mg²⁺), or inhibited (using SBC), or thiol blocked (using NEM). Meanwhile, adding GGT inhibitor increased RSNOs permeation rate from $0.3 \times 10^{-6} \pm 0.1 \times 10^{-6}$ to $2.4 \times 10^{-6} \pm 1.1 \times 10^{-6}$ cmxs⁻¹, but did not change the permeation rate of other NO species.

4. Discussion

It is known that nitric oxide (NO) level is decreasing with ageing and a lack of NO has been observed in many pathologies such as cardiovascular diseases and intestinal inflammatory diseases. In this context, an oral administration of nitric oxide donor to supply this NO lack is a strategy of choice, such as administering the biologically

produced S-nitrosoglutathione (GSNO). However, little is known about the influence of drug metabolism on the permeability or bioavailability. This is mainly linked to the fact that it is technically hard to follow active molecules and metabolites from an analytical point of view. In the case of GSNO, it is possible to radiolabel its nitrogen with ^{15}N to be able to follow what happened to the administered drug itself, but also its metabolites. One way of drug metabolism is through the enzymatic activity. Well, it is known that there is an enzymatic activity at the intestinal level, from bacteria, and especially GGT was identified in abundance. As GGT is a way to metabolize GSNO, it is of interest to study denitrosating activity influence on GSNO metabolism and permeability using an isolated rat intestine model. In the present studies, we use both serine borate complex (SBC) and *N*-ethylmaleimide, which irreversibly blocks thiol groups and have been recommended to stabilize GSNO during sample pre-treatment steps before its analytical measurement [23,24]. But NEM offers no selectivity toward PDI and other redoxins. Thus, we will consider thiol groups present at the surface of intestine wall as “chemical actors” rather than biochemical ones.

The measurement of GGT activity and thiol concentration in isolated rat intestine, in presence of glygly- Mg^{2+} , showed a specific GGT activity of 6.8 ± 0.3 nmol of 3-carboxy-4-nitroanilide. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ of proteins, which was inhibited by adding SBC (values were under the limit of detection). In the literature [38], a specific GGT activity around 3600-times higher than the one observed in our experiment using isolated ileum (24 700 nmol of 4-nitroanilide. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ of proteins) has been reported in small intestine of female mice. This huge difference has two possible explanations: (i) a lot of GGT comes from bacteria in GIT, but most of these bacteria were lost during our washing steps realized for intestine treatment; (ii) an inter-species or gender variation of GGT activity [37]. In our experience, the specific GGT activity in rat ileum is higher than the one in rat aorta (0.3 ± 0.01 nmol of 3-carboxy-4-nitroanilide. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ of proteins) [21] and differentiated Caco-2 cells (1.9 ± 0.3 nmol of 3-carboxy-4-nitroanilide. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ of proteins) (data not shown). This may result from the different structures of ileum, aorta, and Caco-2 cells, and only ileum contains a lot of bacteria with high GGT activity. Indeed, some studies described that GGT is mainly localized at the apical membrane of epithelial cells, and that there is also a GGT activity in bacteria normally colonizing the intestine [12,39]: both data suggested that these bacteria could have an important -even major- role in intestinal GGT activity. The measured concentration of thiol groups in the intact isolated rat intestine was 26.5 ± 0.7 nmol of thiols. mg^{-1} of proteins, and 93.0 ± 0.7 % of these thiols were blocked by

NEM (Table 1). The GGT inhibitor (SBC) and NEM concentrations were chosen to obtain the maximum efficiency, resulting in a total GGT inhibition for SBC use, and in less than 2 nmol of thiols.mg⁻¹ of proteins detected for NEM use. If other inhibitors could be used such as acivicin or S-methylglutathione, the choice was done to use SBC as it has been proved to totally avoid GSNO hydrolysis in biological samples [17], which is in a complete adequation with our goal.

The stability of GSNO in isolated rat intestine showed that GSNO is stable in experimental conditions for at least 60 min, at 37°C under conditions providing high oxygenation rate (fast rotation, mimicking oxygenation in Ussing chamber). From a kinetic point of view, activators (glygly and Mg²⁺) promote the enzymatic activity of GGT, with glygly acting as its acceptor, and divalent ion acting as enzyme activator, accelerating GSNO degradation by GGT catalytic activity. Preliminary studies using metal chelator (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA, 1 mM) showed no modification of RSNO permeability, in comparison to the "GSNO+Glygly+MgCl₂+SBC+NEM" condition, and so metal ions seems to not intervene in this permeability study (data not shown). Moreover, and because it is known that divalent ions such as Ca²⁺ are responsible of intercellular junctions in the intestine [40], the use of metal chelator (such as EDTA) could interfere in our results, perturbate the intestinal barrier and the intestinal homeostasis. Therefore, metal chelators should be avoided in permeability studies. In summary, the intestinal metabolism of GSNO metabolism depends on GGT activity and thiol concentrations.

The validation of the LC-FL method for NO species quantification has been successfully performed according to the criteria stated in the International Council for Harmonization (ICH) guidance on bioanalytical method validation [41]. Moreover, intracellular NO₃⁻ concentrations were not measured as it has been already shown that the intracellular reducing power of cells enables the existence of these oxidized species [41].

The influence of GSNO metabolism on its intestinal permeation was performed in the Ussing chamber system, in terms of permeability study using a fluorescent paracellular marker, sodium fluorescein: the results of this preliminary study did not show any modification of intestine integrity. In the absence of intestine, 100 µM GSNO remained stable in Ussing chamber's operating conditions whatever the experimental conditions were. Then, the permeability study showed that the addition of GGT activator increased GSNO degradation to nitrite and nitrate ions, proving that GGT activator stimulates GSNO degradation in rat intestine. This degradation is avoided when a GGT inhibitor and/or a thiol blocker were used. When looking to the

permeability of NO species recovered in the acceptor compartment, enzymatic activators increased GSNO permeability switching the BCS permeability class of GSNO from low permeability – by adding inhibitor – to medium permeability. In terms of mass balance, the final recovery of NO species ($95 \pm 9 \%$) validates both the model and the methods. Noteworthy, the method using LC-ESI-ITMS/MS is required to quantify permeated NO species due to the poor LOQ of conventional spectrofluorometry. Since LOQ of previously cited analytical methods are limited by blank values, labeling GSNO with ^{15}N not only contributes to distinguish NO species from exo- and endogenous RSNOs, but also permit the use of low concentration of GSNO (e.g. $100 \mu\text{M} = 250 \text{ nmol}$, Figure 3D-F).

5. Conclusions and perspectives

GGT and thiol groups in rat intestine are the main factors involved in GSNO degradation. The GGT activator (glygly- Mg^{2+}) contributes to GSNO degradation and increases NO_2^- permeation through intestine, while GGT inhibitor and thiol blocker (SBC-NEM) protect GSNO from degradation and leads to a higher RSNOs permeation. However, other enzymes may be involved in GSNO metabolism, such as redoxins (*i.e.* Protein Disulfide Isomerase, PDI; Thioredoxin).

As NO plays important roles in the intestinal homeostasis, it might be interesting (*i*) to investigate GSNO outcome using a pathological model (intestinal inflammatory model for example) and to explore a possible modification of its metabolism; (*ii*) to improve sensitivity of the analytical method using LC-ESI-ITMS/MS to quantify ^{15}N -GSNO and its metabolites in tissues (*i.e.* intestine, aorta, ...); (*iii*) to test degradation/absorption of GSNO formulations or other RSNOs (either alone or formulated) by intestine. Moreover, and as reported by *Hanigan et al.* [12], GGT is often localized at the apical (luminal) membrane of epithelial cells, so it could be interesting to study the histochemical localization of GGT in the rat model. Finally, bacteria at the intestinal level seems to be very important as it might have a major enzymatic activity, especially about GGT, and its exploration could open new opportunities to better understand intestinal enzymatic metabolism of future drugs such as nitric oxide donors, like S-nitrosoglutathione.

Acknowledgments

The authors acknowledge the program of China Scholarship Council. The authors thank Dr Philippe Giummelly (CITHEFOR, Université de Lorraine) for the synthesis of GS¹⁵NO and Pr. Alain Le Faou (CITHEFOR, Université de Lorraine) for English style corrections. The authors also thank *Animalerie du Campus Biologie Santé, Université de Lorraine*, for its expertise in animal welfare and experiments. The CITHEFOR EA3452 lab was supported by the “Impact Biomolécules” project of the “Lorraine Université d'Excellence” (Investissements d'avenir – ANR). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the present manuscript.

References

- [1] B. van der Loo, R. Labugger, J.N. Skepper, M. Bachschmid, J. Kilo, J.M. Powell, M. Palacios-Callender, J.D. Erusalimsky, T. Quaschnig, T. Malinski, D. Gygi, V. Ullrich, T.F. Lüscher, Enhanced Peroxynitrite Formation Is Associated with Vascular Aging, *J Exp Med.* 192 (2000) 1731–1744. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1731>.
- [2] C. Gaucher, A. Boudier, F. Dahboul, M. Parent, P. Leroy, S-nitrosation/Denitrosation in Cardiovascular Pathologies: Facts and Concepts for the Rational Design of S-nitrosothiols, *Current Pharmaceutical Design.* 19 (2012) 458–472. <https://doi.org/10.2174/13816128130312>.
- [3] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharmaceutical Research.* 12 (1995) 413–420. <https://doi.org/10.1023/A:1016212804288>.
- [4] J. Fallingborg, L.A. Christensen, M. Ingeman-Nielsen, B.A. Jacobsen, K. Abildgaard, H.H. Rasmussen, pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 3 (1989) 605–613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.1989.tb00254.x>.
- [5] C. Atuma, V. Strugala, A. Allen, L. Holm, The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280 (2001) G922-929. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922>.
- [6] W. Shen, T. Matsui, Intestinal absorption of small peptides: a review, *Int J Food Sci Technol.* 54 (2019) 1942–1948. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14048>.
- [7] P.-A. Billat, E. Roger, S. Faure, F. Lagarce, Models for drug absorption from the small intestine: where are we and where are we going?, *Drug Discovery Today.* 22 (2017) 761–775. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.007>.
- [8] H. Yu, P. Chaimbault, I. Clarot, Z. Chen, P. Leroy, Labeling nitrogen species with the stable isotope ¹⁵N for their measurement by separative methods coupled with mass spectrometry: A review, *Talanta.* 191 (2019) 491–503. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.011>.
- [9] N.V. Marozkina, B. Gaston, S-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1820 (2012) 722–729. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.017>.

- [10] W. Wu, C. Gaucher, I. Fries, X. Hu, P. Maincent, A. Sapin-Minet, Polymer nanocomposite particles of S-nitrosoglutathione: A suitable formulation for protection and sustained oral delivery, *International Journal of Pharmaceutics*. 495 (2015) 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.074>.
- [11] J. Bonetti, Y. Zhou, M. Parent, I. Clarot, H. Yu, I. Fries-Raeth, P. Leroy, I. Lartaud, C. Gaucher, Intestinal absorption of S-nitrosothiols: Permeability and transport mechanisms, *Biochemical Pharmacology*. 155 (2018) 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.018>.
- [12] M.H. Hanigan, H.F. Frierson, Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue., *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 44 (1996) 1101–1108. <https://doi.org/10.1177/44.10.8813074>.
- [13] F.Q. Schafer, G.R. Buettner, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radical Biology and Medicine*. 30 (2001) 1191–1212. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4).
- [14] D.P. Jones, [11] Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 2002: pp. 93–112. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)48630-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)48630-2).
- [15] S. Wickham, M.B. West, P.F. Cook, M.H. Hanigan, Gamma-glutamyl compounds: Substrate specificity of gamma-glutamyl transpeptidase enzymes, *Analytical Biochemistry*. 414 (2011) 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.03.026>.
- [16] J.F. Riordan, The role of metals in enzyme activity, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 7 (1977) 119–129.
- [17] E. Bramanti, V. Angeli, A. Paolicchi, A. Pompella, The determination of S-nitrosothiols in biological samples—Procedures, problems and precautions, *Life Sciences*. 88 (2011) 126–129. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.024>.
- [18] H.H. Al-Sa'doni, I.Y. Khan, L. Poston, I. Fisher, A. Ferro, A Novel Family of S-Nitrosothiols: Chemical Synthesis and Biological Actions, *Nitric Oxide*. 4 (2000) 550–560. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0315>.
- [19] K.A. Broniowska, A.R. Diers, N. Hogg, S-Nitrosoglutathione, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1830 (2013) 3173–3181. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.004>.
- [20] V. Angeli, A. Tacito, A. Paolicchi, R. Barsacchi, M. Franzini, R. Baldassini, C. Vecoli, A. Pompella, E. Bramanti, A kinetic study of gamma-glutamyltransferase (GGT)-mediated S-nitrosoglutathione catabolism, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 481 (2009) 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.10.027>.
- [21] F. Dahboul, P. Leroy, K. Maguin Gate, A. Boudier, C. Gaucher, P. Liminana, I. Lartaud, A. Pompella, C. Perrin-Sarrado, Endothelial γ -Glutamyltransferase Contributes to the Vasorelaxant Effect of S-Nitrosoglutathione in Rat Aorta, *PLoS ONE*. 7 (2012) e43190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043190>.
- [22] S.-W. Park, G. Zhen, C. Verhaeghe, Y. Nakagami, L.T. Nguyenvu, A.J. Barczak, N. Killeen, D.J. Erle, The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 6950–6955. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808722106>.
- [23] S. Tate, A. Meister, Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of gamma-glutamyl transpeptidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (1978) 4806–4809.
- [24] N.S. Bryan, M.B. Grisham, Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples, *Free Radical Biology and Medicine*. 43 (2007) 645–657. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026>.

- [25] N. Benjamin, F. O'Driscoll, H. Dougall, C. Duncan, L. Smith, M. Golden, H. McKenzie, Stomach NO synthesis, *Nature*. 368 (1994) 502–502. <https://doi.org/10.1038/368502a0>.
- [26] L.C. Pinheiro, J.H. Amaral, G.C. Ferreira, R.L. Portella, C.S. Ceron, M.F. Montenegro, J.C. Toledo, J.E. Tanus-Santos, Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension, *Free Radical Biology and Medicine*. 87 (2015) 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.038>.
- [27] M. Khan, H. Sakakima, T.S. Dhammu, A. Shunmugavel, Y.-B. Im, A.G. Gilg, A.K. Singh, I. Singh, S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms of neurorepair following traumatic brain injury in rats, *J Neuroinflammation*. 8 (2011) 78. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-78>.
- [28] M. Parent, A. Boudier, J. Perrin, C. Vigneron, P. Maincent, N. Violle, J.-F. Bisson, I. Lartaud, F. Dupuis, In Situ Microparticles Loaded with S-Nitrosoglutathione Protect from Stroke, *PLoS ONE*. 10 (2015) e0144659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144659>.
- [29] W. Wu, C. Perrin-Sarrado, H. Ming, I. Lartaud, P. Maincent, X.-M. Hu, A. Sapin-Minet, C. Gaucher, Polymer nanocomposites enhance S - nitrosoglutathione intestinal absorption and promote the formation of releasable nitric oxide stores in rat aorta, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 12 (2016) 1795–1803. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.05.006>.
- [30] M. Parent, F. Dahboul, R. Schneider, I. Clarot, P. Maincent, P. Leroy, A. Boudier, A Complete Physicochemical Identity Card of S-nitrosoglutathione, *Current Pharmaceutical Analysis*. 9 (2013) 31–42. <https://doi.org/10.2174/1573412911309010006>.
- [31] F. Schiele, Y. Artur, D. Bagrel, C. Petitclerc, G. Siest, Measurement of plasma gamma-glutamyltransferase in clinical chemistry: kinetic basis and standardisation propositions, *Clinica Chimica Acta*. 112 (1981) 187–195. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(81\)90377-6](https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90377-6).
- [32] C. Damacena-Angelis, G.H. Oliveira-Paula, L.C. Pinheiro, E.J. Crevelin, R.L. Portella, L.A.B. Moraes, J.E. Tanus-Santos, Nitrate decreases xanthine oxidoreductase-mediated nitrite reductase activity and attenuates vascular and blood pressure responses to nitrite, *Redox Biology*. 12 (2017) 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.003>.
- [33] S. Shin, H.-L. Fung, Evaluation of an LC-MS/MS assay for ¹⁵N-nitrite for cellular studies of L-arginine action, *J Pharm Biomed Anal*. 56 (2011) 1127–1131. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.08.017>.
- [34] B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch, H.E. Abaci, M.L. Shuler, J.J. Hickman, TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems, *Journal of Laboratory Automation*. 20 (2015) 107–126. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>.
- [35] H. Yu, R. Schmitt, A. Sapin, P. Chaimbault, P. Leroy, Comparison between two derivatization methods of nitrite ion labeled with ¹⁵N applied to liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods*. 10 (2018) 3830–3836. <https://doi.org/10.1039/C8AY01206G>.
- [36] H. Yu, J. Bonetti, C. Gaucher, I. Fries, L. Vernex-Loset, P. Leroy, P. Chaimbault, Higher-energy collision-induced dissociation for the quantification by liquid chromatography/tandem ion trap mass spectrometry of nitric oxide metabolites coming from S-nitroso-glutathione in an in vitro model of the intestinal barrier, *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 33 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1002/rcm.8287>.

- [37] L.H. Lash, W. Qian, D.A. Putt, K. Jacobs, A.A. Elfarra, R.J. Krause, J.C. Parker, Glutathione conjugation of trichloroethylene in rats and mice: sex-, species-, and tissue-dependent differences, *Drug Metab. Dispos.* 26 (1998) 12–19.
- [38] B.Z. Carter, A.L. Wiseman, R. Orkiszewski, K.D. Ballard, C.-N. Ou, M.W. Lieberman, Metabolism of Leukotriene C₄ in γ -Glutamyl Transpeptidase-deficient Mice, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 12305–12310. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12305>.
- [39] T. Liu, Q.-L. Yan, L. Feng, X.-C. Ma, X.-G. Tian, Z.-L. Yu, J. Ning, X.-K. Huo, C.-P. Sun, C. Wang, J.-N. Cui, Isolation of γ -Glutamyl-Transferase Rich-Bacteria from Mouse Gut by a Near-Infrared Fluorescent Probe with Large Stokes Shift, *Anal. Chem.* 90 (2018) 9921–9928. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02118>.
- [40] M. Hayashi, M. Tomita, Mechanistic Analysis for Drug Permeation Through Intestinal Membrane, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 22 (2007) 67–77. <https://doi.org/10.2133/dmpk.22.67>.
- [41] O. Parodi, R. De Maria, E. Roubina, Redox state, oxidative stress and endothelial dysfunction in heart failure: the puzzle of nitrate–thiol interaction:, *Journal of Cardiovascular Medicine.* 8 (2007) 765–774. <https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e32801194d4>.

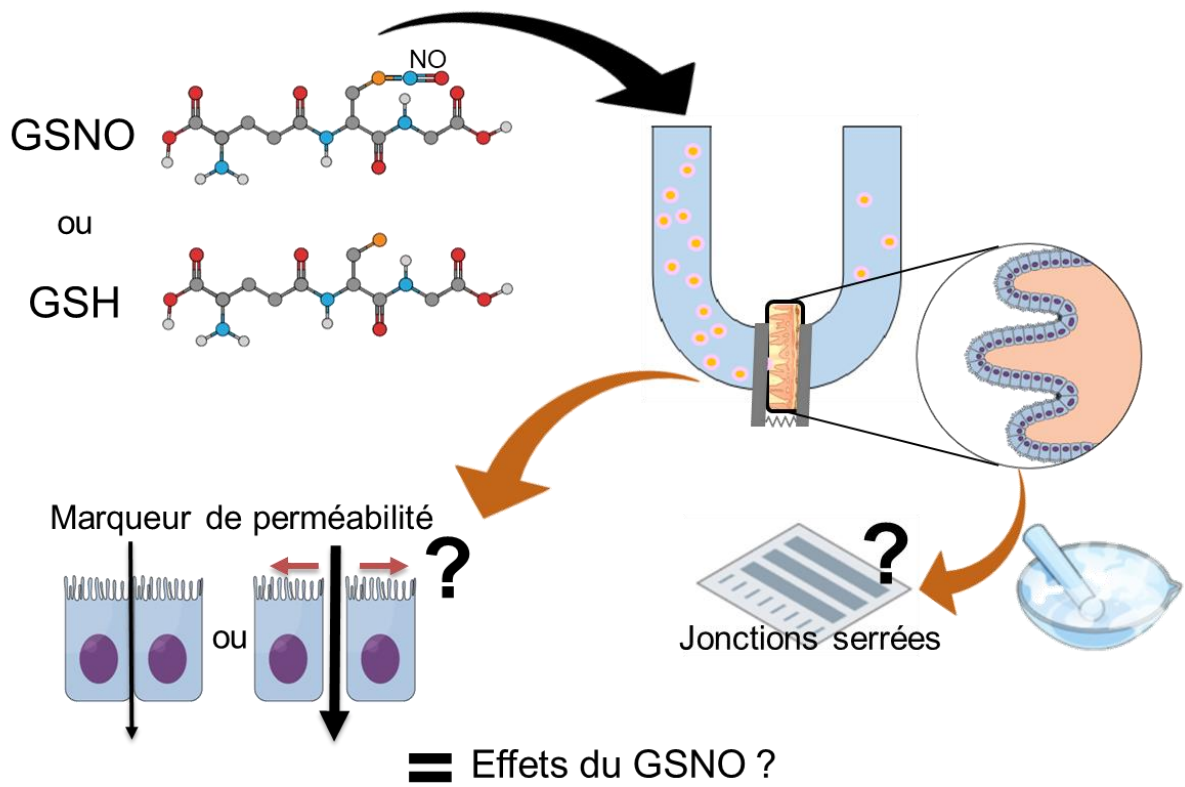
2. Conclusion

Grâce à la mise en place du modèle *ex vivo* de chambre de Ussing et de la méthode analytique de quantification des espèces NO marquées à l'azote 15, développés et mis au point dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons pu réaliser l'étude des mécanismes de prise en charge du GS¹⁵NO depuis la lumière intestinale jusqu'au compartiment muqueux : l'activité enzymatique de la gamma-glutamyltransférase (GGT) et l'implication des thiols présents au niveau intestinal ont été mises en évidence. Il reste cependant de nombreuses questions en suspens, et notamment il serait intéressant de pouvoir déterminer plus précisément d'où provient cette activité enzymatique de la GGT, vient-elle de l'intestin lui-même, ou bien vient-elle plutôt des bactéries commensales ?

De ce fait, il reste encore beaucoup d'éléments à explorer pour mieux comprendre la prise en charge du GSNO au niveau intestinal, en étudiant notamment les autres voies de métabolisme du GSNO présentées en introduction de ce chapitre : effectivement, nous n'avons pas vérifié l'implication de la GSNO réductase, et il serait bon d'effectuer ces vérifications en utilisant des inhibiteurs de cette enzyme (N91115 ou N6022), pour vérifier dans quelle mesure la perméabilité des espèces NO est modifiée lorsque cette enzyme est inhibée.

Il y a également des études complémentaires à réaliser, en ce qui concerne l'utilisation des activateurs – inhibiteurs de GGT et de thiols : en effet, la stratégie adoptée jusqu'alors était dans un esprit cumulatif, c'est-à-dire que nous avons utilisé le substrat de la GGT, puis nous avons ajouté son inhibiteur, puis nous avons ajouté le bloqueur de thiols, etc. Or, cette méthode bien qu'informatrice ne nous permet pas encore de déterminer la part d'implication de chacun de ces acteurs, pris indépendamment, dans la prise en charge du GSNO.

3e Chapitre : Effets du GSNO sur la barrière intestinale



1. Impact du GSNO sur la barrière intestinale

Nous avons vu dans l'introduction générale que le monoxyde d'azote (NO) est un gazotransmetteur indispensable à l'intégrité de la barrière intestinale, et qu'il est notamment produit par les *nitric oxide synthase* (NOS). Du NO est sécrété par les cellules entériques gliales, qui se transforme par la suite en S-nitrosoglutathion (GSNO), réserve et donneur de NO, par des phénomènes de S-nitrosation des glutathions (GSH) environnants (Cheadle et al., 2013; Savidge et al., 2007).

Dans le premier chapitre, nous avons vu que le modèle *ex vivo* de chambre de Ussing permet principalement de déterminer la perméabilité d'un composé. Cependant, son utilisation dans le cadre de l'étude de l'impact d'une molécule sur les propriétés de la barrière intestinale est peu mise en œuvre.

Dans ce troisième chapitre, nous souhaitons comprendre davantage les effets pharmacologiques induits par le GSNO sur les propriétés de la barrière intestinale. La finalité est d'évaluer en quoi le GSNO peut être considéré comme candidat médicament dans le cas d'une perturbation en niveau de NO dans l'organisme. Aussi, plusieurs hypothèses sont soulevées : le GSNO a-t-il un effet concentration-dépendant sur la barrière intestinale (augmentation ou diminution de la perméabilité intestinale en fonction de la concentration en GSNO) ? si le GSNO apporté dans la lumière intestinale (exogène) a un effet, est-il NO-dépendant, c'est-à-dire quelle est la part du -NO et du -SH dans l'action du GSNO sur la barrière intestinale ? et enfin, l'effet du GSNO apporté est-il modifié quand la production endogène de NO est inhibée ? Ces différents points sont davantage détaillés ci-après.

Dans cette perspective, il est important de garder en mémoire les critères de classification « Biopharmaceutical classification system », BCS, permettant de classer les médicaments en fonction de leur solubilité (à différents pH) et de leur perméabilité (à hauteur de 90% de la dose) mais pas seulement. En effet, sont également pris en compte la présence de métabolites, leur identité, leur quantité, la pureté de la molécule active, ou encore la dose maximale par prise utilisable en clinique.

Article 4 : “ Luminal S-nitrosoglutathione effects on intestinal barrier in an ex vivo model of Ussing chamber” (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics).

Les protocoles détaillés relatifs à cet article se trouvent en fin de manuscrit (voir Annexes) intitulés “Ussing Chamber experiment (Harvard Apparatus®)”, “Measurement of sodium fluorescein permeability on Ussing chamber”, et “Extraction and identification of intestinal proteins by western blot.

L'article présenté ci-après montre la démarche suivie afin de mieux comprendre les effets du GSNO sur la barrière intestinale, ceci en utilisant le modèle *ex vivo* de chambre de Ussing, préalablement mis en place au laboratoire (cf. chapitre 1 de ce manuscrit). Cette démarche a été réalisée en plusieurs étapes pour répondre à plusieurs questions en parallèle : tout d'abord, il a été étudié la perméabilité intestinale de la fluorescéine sodique, lorsque que le tissu est exposé à du GSNO à de faibles concentrations (0,1 et 1 μM) ou à des concentrations plus élevées (10 et 100 μM). Lors de cette première étape, il s'avère que le GSNO semble agir de manière concentration-dépendante sur la perméabilité intestinale puisque, si les faibles concentrations étudiées ne modifient pas la perméabilité comparativement au groupe contrôle, les concentrations plus élevées entraînent une augmentation significative de celle-ci. Cette première étape semble donc démontrer un effet délétère d'une concentration élevée en GSNO sur la barrière intestinale. Ensuite, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement au GSNO, qui est un glutathion (GSH) nitrosé : en tentant de savoir si l'effet préalablement observé du GSNO provenait de sa partie NO ou de sa partie GSH (connu pour avoir des propriétés antioxydantes), nous avons donc étudié la perméabilité de la NaFlu en présence du GSH aux même concentrations que précédemment : le résultat indique qu'il n'y a aucune modification de la perméabilité intestinale, et ce quelle que soit la concentration étudiée. Cela nous mène à affirmer que l'action du GSNO vient de sa partie « NO ». Pour aller encore plus loin dans la réflexion, nous nous sommes intéressés de savoir comment le NO, apporté de manière exogène sous forme de GSNO, pouvait agir à l'échelle intestinale, et pour cela nous avons déjà voulu écarter la synthèse endogène de NO par les différents isoformes de NO synthases présentes : nous avons donc choisi d'utiliser du L-NAME afin d'inhiber de manière non spécifique ces NO synthases, et il s'avère que , en absence de GSNO, il n'y a pas de perturbation de la perméabilité intestinale. Aussi, il

reste encore à aller plus loin dans l'étude en faisant le comparatif en présence de GSNO.

Ainsi, les travaux présentés dans cet article permettent d'engager sérieusement la compréhension des phénomènes – d'un point de vue davantage mécanistique – menant aux effets du GSNO sur la barrière intestinale, et ouvre de larges voies pour la poursuite des études présentées dans ce manuscrit : diverses approches permettront de mieux comprendre comment agit le GSNO sur la barrière intestinale, et sous quelle forme il faut l'administrer, ceci dans la perspective d'un traitement chronique par administration orale. Le but ultime de ces travaux serait, *via* l'apport de monoxyde d'azote, d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de pathologies inflammatoires telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Luminal S-nitrosoglutathione effects on intestinal barrier in an *ex vivo* model of Ussing chamber

Romain SCHMITT^a, Hui MING^a, Franck HANSMANNEL^b, Caroline GAUCHER^a, Pierre LEROY^a, Isabelle LARTAUD^a, Anne SAPIN-MINET^{a*}

^a *University of Lorraine, CITHEFOR EA 3452; Faculty of Pharmacy, BP 80403 Nancy Cedex, France.*

^b *University of Lorraine, NGERE Inserm U1256 and Department of Hepato-Gastroenterology, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.*

Authors: Same contribution in both experimental part and writing part to this article

*Corresponding author: Anne SAPIN-MINET

CITHEFOR EA 3452

Campus Santé Brabois

9, Avenue de la Forêt de Haye,

F-54505 VANDOEUVRE-LÈS-NANCY CEDEX

Tel: +33 (0)3 72 74 73 04

Email: anne.sapin@univ-lorraine.fr

Conflicts of interest: none.

This work was supported by the 'Université de Lorraine, Région Lorraine and FEDER.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Word count: original article:

- *Word limit: not more than 6,000 words (including references)*
- *Abstract: not more than 250 words*
- *Figures/Tables: at no more than a combined total of 7 figures and/or tables*

Abstract:

Background: NO is secreted by enteric glial cells and plays a large role in the maintenance of intestinal barrier homeostasis, which is impaired in inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: these diseases are disabling pathologies affecting young patients who undergo high relapses of acute inflammatory episodes all over their life. Moreover, it was showed that NO level is highly increased in active phase of IBD but come back to baseline in remission phase. Therefore, an innovative chronic treatment to maintain the biological NO balance, for example as an IBD treatment may rely on supplementation of small amounts of nitric oxide to preserve the intestinal barrier integrity. As NO is an unstable radical, NO donors are interesting because of their higher stability, especially the endogenously produced *S*-nitrosoglutathione (GSNO). In this preliminary pre-clinical study, impacts of GSNO on epithelial cells junctions and barrier permeability were evaluated, using the Ussing Chamber model.

Methods: The Ussing Chamber model is an *ex vivo* model composed of an oriented rat intestine tissue (0.25 cm², ileum segment) separating two compartments (luminal and mucosal). Intestinal barrier integrity was evaluated by measuring the intestinal permeability of sodium fluorescein (NaFlu, medium permeability, paracellular transport) during 2-hours incubation of different concentrations of GSNO (0.1, 10 and 100 μM). Cell junction proteins expression were examined then by western blot. The involvement of NO in potential GSNO effects were verified using glutathione (GSH) and a NO synthase inhibitor, L-NAME.

Results: High concentration of GSNO (10 and 100 μM) increased the intestinal permeability of NaFlu while low concentration (0.1 μM) not. Moreover, as GSH did not modified the intestinal permeability, GSNO effect is due to NO, and not to antioxidant properties. The inhibition of NOS with L-NAME did not modify the intestinal permeability.

Conclusion: In conclusion, NO supplementation, through the administration of low concentrations of GSNO (≤ 0.1 μM), could be a good strategy to maintain the intestinal barrier integrity.

Keywords: GSNO, Ussing chamber, intestinal barrier integrity, pharmacological effect

Introduction

Several actors ensure integrity and permeability of the intestinal barrier which both play a critical role in the defense of the body against external environmental aggressions. The intestine mucosa allows renewing of the epithelium through stem cells every 3 to 5 days (Potten et al., 2002). Cell junctions – which are divided, from intraluminal to deeper parts of the intestinal wall, into tight junctions, adherent junctions and desmosomes – are the main elements involved in the maintenance of integrity (desmosomes) and function of the intestinal barrier: tight junctions and adherent junctions especially regulate intestinal permeability and absorption, as entry of luminal elements through conjunctive tissues to intestinal vessels (Turner, 2000). Under physiological conditions, intercellular crossing is limited to small molecules. A selective crossing through enterocytes is also possible using transporters. Mucus – composed of glycoproteins (mainly mucins) and forming a gel recovering the epithelium (Kim and Ho, 2010) – also contributes to intestine integrity. Immune cells, in Peyer's patches and in conjunctive tissue, reinforce the role and the maintenance of the barrier integrity by an innate immune response and a control of inflammation (Hooper and Macpherson, 2010). Finally, the intestine microbiota takes over food components that cannot be absorbed such as fibers and digestible polysaccharidic compounds and contributes to the renewing and maturation of the epithelium, and to cellular differentiation (Payros et al., 2014).

At the intestinal level, nitric oxide (NO) is secreted by enteric glial cells and plays an important but paradoxical role. In one hand, NO has beneficial effects: at small concentrations, it is the most important gastro-intestinal neurotransmitter, allowing controlling gastric motility. It also allows to control intestinal secretion of mucus and to improve absorption in physiological conditions (Kochar et al., 2011). In the other hand, excessive production of NO has been correlated with sustained inflammation in the colon, particularly observed for epithelial cells near to the inflammation site (Kolios et al., 2004). This is due to an increased production of peroxynitrites ions (ONOO⁻), which may occur during inflammatory bowel diseases (IBD). Crohn's Disease and Ulcerative Colitis are disabling pathologies affecting young patients who undergo high relapses of acute inflammatory episodes all over their life. Few studies showed that there is a difference in NO level between an active phase of IBD and remission phase: indeed, there is a large increase of NO level when the disease is active, whereas it is at baseline level during the remission phase, suggesting the use of NO as a biomarker of IBD (Avdagić et al., 2013). Innovative therapeutic strategies for IBD may rely on protection of the intestinal barrier integrity and permeability during remission periods, avoiding treatment during acute inflammatory episodes. In this context, maintaining low protective concentrations of NO during remission periods of IBD (Kochar et al., 2011), e.g by supplementation of low concentrations

of NO, has to be considered as potential therapeutics.

However, under its gaseous form, NO is unstable (half-life within seconds) and is easily and uncontrollably reacted in its environment (Dattilo and Makhoul, 1997). Thus, NO donors are necessary to avoid this drawback. NO donors show longer half-life and some of them are already used in therapeutic (i.e. cardiovascular context (M. Parent et al., 2013)). One family of NO donors is the *S*-nitrosothiols (RSNO) with *S*-nitrosoglutathione (GSNO) as the leader molecule. GSNO is a very interesting molecule as it is naturally produced in the organism and is derived from the most important intracellular thiol, glutathione (GSH). GSNO secreted by enteric glial cells after stimulation of the vagus nerve prevents inflammatory events and preserves barrier integrity (Cheadle et al., 2013; Savidge et al., 2007).

Before setting a prevention treatment of IBD using oral administration of GSNO, its ability to maintain or reinforce intestinal barrier integrity remains to be evaluated: this is the goal of the present study, using the Ussing diffusion Chamber model.

Amongst the different models used to evaluate intestine permeability, the Ussing diffusion Chamber model developed by Hans Henriksen Ussing in 1946, allows *ex vivo* study of the transport of ions, nutrients or drugs through a donor to an acceptor compartments separated by an insert on which is fixed the intestinal tissue (Clarke, 2009). Both sides of the intestinal tissue are immersed in an osmotic solution maintained at 37°C. This technique permits to study absorption differences, by dosage of components in both compartments and inside the tissue, according to the different intestinal sections. This requires low amounts of molecules. In this model, morphological and functional modifications can be observed during the experiment. Intestinal permeability is witnessed by measuring the crossing (flux) of a substance through the intestinal barrier, while intestinal integrity is reflected by the trans-epithelial electrical resistance (TEER). The later traduces the viability of the tissue and witnesses the open state of cell junctions (Srinivasan et al., 2015). The effect of an active substance on the barrier itself can be evaluated using markers of intestinal permeability (sodium fluorescein, NaFlu, medium permeability, paracellular transport).

In the present study, intestinal barrier permeability and integrity were evaluated by measuring flux and apparent permeability (Papp) of NaFlu, and TEER, in the presence or not of GSNO. The expression of cell junction proteins was also evaluated by Western Blot: occludin and claudin-1 were chosen as markers of tight junction, beta-catenin and e-cadherin as markers of adherens junctions (Turner, 2009). We also investigated whether the protective effect of GSNO relies on GSH or not, using incubation with GSH instead of GSNO. Moreover, we evaluated whether endogenous NO secreted by nitric oxide synthase (NOS) interferes or not, using a NO synthase non-specific inhibitor, the ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME).

Material and Methods

Substances used and synthesis of GSNO

All reagents were of analytical grade and all solutions prepared with ultrapure deionized water ($>18.2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$ at 25°C). Sodium nitrite was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and all other reagents (including glutathione, L-NAME, sodium fluorescein) from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Antibodies for occludin (71-1500) and claudin-1 (37-4900) were purchased from Invitrogen; antibody for E-cadherin (SC-7870) from Santa-Cruz; antibody for β -catenin (MA1-2001) from Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology, USA); antibody for β -actin loading control (HRP) (ab197277) from Abcam; antibody for HRP conjugated secondary goat-rabbit/mouse from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. S-nitrosoglutathione synthesis was performed in the laboratory according to a previously described method (Marianne Parent et al., 2013) and all experiments involving GSNO were conducted under conditions of subdued light and at 4°C in order to minimize light- and temperature-induced GSNO degradation. The concentration of GSNO was assessed by UV spectrophotometry (UV-1800, Shimadzu, France) using the specific molar absorbance of the S-NO bond at 334 nm using the Beer-Lambert law (molar absorbance $922 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); the expected concentration is of 10^{-2} M with a tolerance of $\pm 5 \%$.

Animals and ethical statement

Intestinal barrier integrity was evaluated on ilea isolated from 12-week-old, male, normotensive, Wistar rats (Janvier Laboratories, Le Genest-St-Isle, France; 400-500 g). All experiments were performed in accordance with the European Community guidelines (2010/63/EU) for the use of experimental animals in the respect of the 3 Rs' requirements for Animal Welfare. The project untitled "Nitro-Vivo", renewed as "Bis Nitro-Vivo" was positively evaluated by the regional ethical committee for animal experiments and approved by the French Ministry of Research (n°APAFIS#1614-2015090216575422v2 et #15598-2018061619129620v3). Animals were kept under standard conditions (temperature: $21 \pm 1^\circ\text{C}$, hygrometry $60 \pm 10\%$, light on from 6 am to 6 pm) and had diet ad libitum (A04, Safe, Villemoisson-sur-Orge, France) and water (reverse osmosis system, Culligan, Brussels, Belgium).

Wistar rats were sacrificed by exsanguination under profound anesthesia (isoflurane 4%/O₂). An ileum segment (around 12 cm) of the rat intestine was removed and immediately placed in cold Krebs-Henseleit buffer (NaCl 119, NaHCO₃ 24, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂:2H₂O 1.6 and glucose 10 mM; pH adjusted to 7.4 and equilibrated with 95 % O₂ / 5 %

CO₂ for 30 minutes before use). Intestine pieces were cleaned from fat tissue and cut into 2-cm long segments (6 segments per rat). The segments were opened along the mesenteric vein, cleaned with cold Krebs-Henseleit buffer, pinned on insert and immediately placed in Ussing Chamber system. A 6-Ussing Chamber bench (P2404 Physiologic Instrument®, Easymount LVSYS, Harvard Apparatus) was used. In each chamber, compartments were filled with Krebs-Henseleit buffer (2.5 mL), temperature was maintained at 37°C in continuous circulation (using a water bath) and pH was maintained at 7.4 with gas infusion (12 mL/min using a peristaltic pump). A current electrode and a voltage electrode (multimeter, Millicell-ERS2, Millipore®; electrodes P2020, Physiologic Instrument®) were placed in each compartment for TEER measurement. TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$) was determined by the $U = R \times I$ law after inducing a current from one compartment to the other, with U the potential gradient, I the induced current by the apparatus and R the resistance of the tissue (Ω) multiplied by the tissue area separating both compartments (cm^2). At the beginning of the experiment, the intestine tissues which showed TEER values less than $30 \Omega \times \text{cm}^2$ were discarded which, according to previously determined quality criteria (Schmitt et al, 2019, to be submitted).

Permeability experiments

NaFlu (2.7 mM) permeability (from donor/luminal compartment to acceptor/mucosal compartment) was assessed by measuring changes in concentration of the compound with time. Samples (250 μL of medium) were harvested in the acceptor compartment at different times (every 30 min, until 2 hours; each removed volume was replaced by an equal volume of 37°C pre-heated Krebs-Henseleit buffer) for the quantification of permeability markers flux. Quality criteria were checked as previously described (Schmitt et al, 2019, to be submitted). [NaFlu] was evaluated with a spectro-fluorimeter (BioTek®, $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$). The flux (J) of compounds or their apparent permeability (P_{app}) through the intestine were calculated according to the following formulae:

$$J = \left(\frac{dQ}{A \cdot dt} \right) \quad P_{\text{app}} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \times \left(\frac{1}{AC_0} \right) = \frac{J}{C_0}$$

$\left(\frac{dQ}{dt} \right)$ is the the slope of the steady state portion of the amount of the drug permeated during time t, A the tissue area separating both compartments and C₀ the initial concentration in active molecule; units: J in $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, P_{app} in $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$; Q in mg; t in s; A in cm^2 , C₀ in $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$).

Evaluation of the effects of GSNO on intestine permeability and integrity

As GSNO is a very fragile and sensitive molecule which can be degraded easily by light, temperature or oxygenation by bubbling during Ussing Chamber experiment, its stability in Ussing Chamber was tested, adding 100 μM of GSNO (*i.e.* 500 nmol) to the donor compartment

(at 37 °C, Krebs-Henseleit buffer with 95% O₂ / 5% CO₂ at 12 mL/min) in the absence of any intestine tissue.

Then, intestinal segments were exposed to GSNO (0.1 μM – 100 μM, donor compartment), with 10 min equilibrium before starting the experiment on 2 hours, in order to measure permeability markers and TEER. In parallel, for each series of 6 Ussing Chambers, one or two were dedicated to control conditions (therefore, the control group includes the highest number of experiments, see Figure 1), in order to evaluate quality and viability of the segments and allow comparison of results between each series of Ussing experiments. Quality criteria were evaluated according to a previous study (Schmitt et al, 2019, to be submitted). At the end of the experiment, intestinal tissues were taken out of the Ussing chambers and placed in plastic tubes, frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C until western blot analysis.

The same measurement of NaFlu permeability was done replacing GSNO by an equal concentration of GSH.

Another series of NaFlu permeability experiment was performed with chambers filled with Krebs containing L-NAME 10⁻⁴M. Then, intestinal segments were exposed to GSNO (0.1 μM – 100 μM, donor compartment).

Cell junction proteins expression

Intestinal piece was taken out from -80°C and mashed into powder, using mortar and pestle, in liquid nitrogen. Proteins were extracted from the tissue in RIPA buffer (NaCl 140; NaH₂PO₄ 12; KH₂PO₄ 2 mM; sodium deoxycholate 0.5%; nonidet P-40 1%, SDS 1%) with additional polymethylsulfonyl fluoride, sodium orthovanadate and protease inhibitor cocktail. Firstly, tissue powder was incubated with RIPA buffer (ice, 10 mins), then homogenized. Mixture was frozen and thawed, for 3 cycles, in liquid nitrogen and 37°C water bath. After centrifugation (12 000 × g, 4°C, 30 mins), supernatant was used for proteins quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay.

Protein samples were mixed with an equal volume of Laemmli 2X sample buffer and heated to 95°C for 5 mins. Total proteins (30 μg) were separated with sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were blocked with 5% bovine serum albumin or non-fat milk/TBST for 1 hour at room temperature and then incubated with primary antibodies (occludin, 1:600; claudin-1, 1:600; E-cadherin, 1:800; β-catenin, 1:700) overnight at 4°C. After washing in TBST, the appropriate HRP-conjugated secondary antibody was added, and the membrane was incubated for 1h at room temperature. After further washing in TBST, the proteins were detected using an ECL or ECL PLUS kit (Amersham, Velizy-Villacoublay, France), and with the “fusion” software

(Vilber®). Densitometric analysis was performed with “Image J” software.

β-actin was used as a reference protein, and so the relative amount was expressed as the ratio of protein /beta-actin expressions. Results were normalized from “wild type” group and expressed in percentage: “wild type” is a tissue harvested from animal and directly frozen; control+Ussing is a tissue that has been set in Ussing system and frozen after 2-hours experiment without treatment.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard deviation (sem). Statistical comparisons were performed using a 2-way ANOVA (time and groups) or a t-test of Student, when appropriate with $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (GraphPad Software version 5.0, San Diego, USA).

Results

Evaluation of the effects of GSNO on intestine permeability and integrity

First, stability of GSNO (100 μM) was confirmed by measuring its concentration, not significantly affected all over the 2 hours under experimental conditions without intestine (data not shown).

TEER values did not show any significant difference between groups, while decreasing along the 2-hours of experiment ongoing; this traduces a decrease of tissue integrity with time (data not shown). In parallel, the flux of fluorescein through the intestine increased along the 2-hours experiment during exposure to GSNO (Figure 1a) or GSH (Figure 1b).

However, a concentration-dependent effect of GSNO (but not of GSH) was observed on healthy tissue, with high concentrations of GSNO (100 μM) increasing NaFlu flux (and Papp values, mpTable 1) compared to the Control group. Low concentrations of GSNO (0.1 μM) tended to decrease the NaFlu flux (or Papp, Table 1) compared to Control, and significantly decreased this paracellular marker compared to GSNO (100 μM).

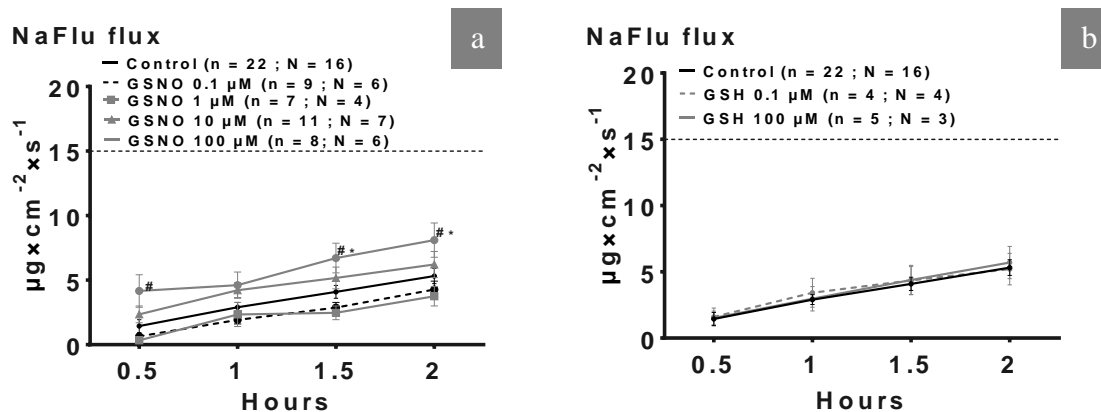


Figure 1. Evolution of the sodium fluorescein (NaFlu, 2.7 mM) in the presence or not of GSNO (0.1 or 100 μM) with $p_{\text{interaction}} = 0.9834$, $p_{\text{time}} < 0.0001$, $p_{\text{groups}} < 0.0001$ (a); or GSH (0.1 μM or 100 μM) with $p_{\text{interaction}} = 0.9995$, $p_{\text{time}} < 0.0001$, $p_{\text{groups}} = 0.9354$ (b) during 2 h in Ussing chamber * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs GSNO 0.1 μM ; 2-way ANOVA (time and groups)

Table 1. Evolution of the apparent permeability coefficient (P_{app}) of sodium fluorescein (NaFlu, 2.7 mM). * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs 100 μM ; t-test.

Time	GSNO(μM)		
	0	0.1	100
0.5 h – 2 h	1.7 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1#	3.1 \pm 0.5*

Inhibition of NO synthase with L-NAME

The nitric oxide synthase (NOS) which are present in the intestine can produce nitric oxide (NO), which can act itself, or reacts with other species in the environment to form some RSNO. Thus, the inhibition of these enzymes using ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), is a crucial point to better understand the real effect of exogenous supply of NO with GSNO (avoiding the noise which can be caused by endogenous NO production). The effect of NOS inhibition on the intestinal barrier integrity, using L-NAME 10⁻⁴M, was evaluated by adding permeability marker, sodium fluorescein (NaFlu), in the donor (luminal) compartment, and following the marker permeation during 2 h. in acceptor (mucosal) compartment The Figure 2 showed that there is no significant modification of NaFlu when the intestine is exposed to L-NAME, whatever the exposure time of the intestine to NOS inhibitor.

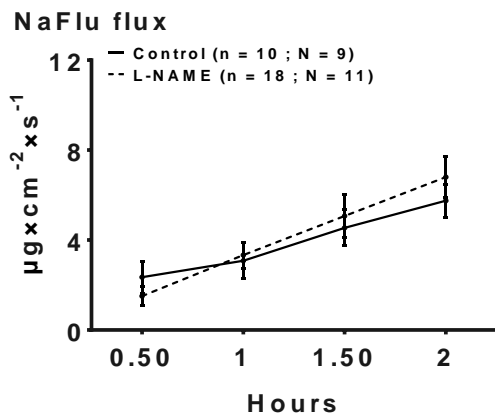


Figure 2. Evolution of sodium fluorescein (NaFlu, 2.7 mM) flux in the presence or not of L-NAME 10⁻⁴M during 2 h in Ussing chamber. *p < 0.05 vs Control, statistical; 2-way ANOVA (time and groups)

Cell junction proteins expression after GSNO treatment in Ussing Chamber

The relative amount of Claudin-1 and Occludin did not significantly change in tissue during the experiment (Control) when compared with fresh tissue (WT) (Figure 3). A similar result was observed with E-cadherin proteins. Unexpectedly, the apparent molecular weight of E-cadherin appears to be smaller in the control tissue compared with fresh tissue, which might be linked to protein degradation in this *ex vivo* model. No significant changes in the amount of these cell junction proteins were observed with both low and high concentration of GSNO. Despite this lack of statistical significance, we noted that the amount of occludin is reduced by 50 % in the presence of 100 µM of GSNO.

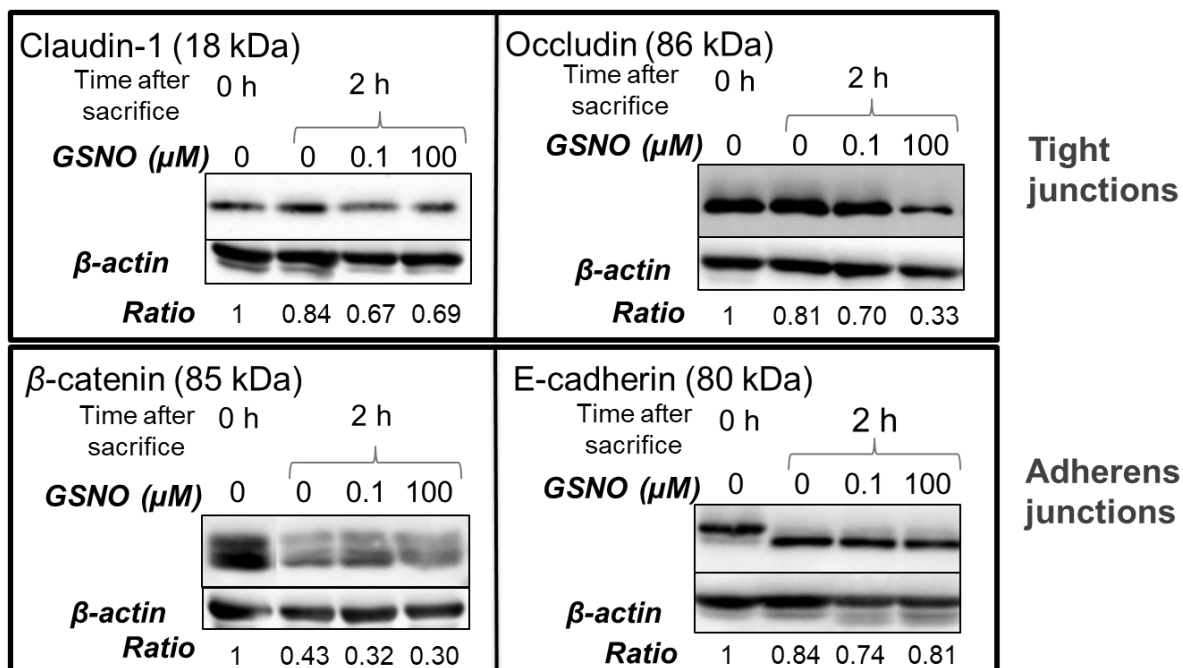


Figure 3. Expression of cell junction proteins by western blotting after 2-hours exposure to different concentrations of GSNO in Ussing chamber. The ratio value was normalized results from WT; two-way ANOVA (groups and proteins), n=5. 0 h: a tissue harvested from animal and directly frozen, 2 h: tissue after 2-hour of GSNO exposure in Ussing chamber system.

Discussion and conclusion

The nitric oxide is a gaseous radical mainly involved as a neurotransmitter crucial for the organism. It is known to be implicated in a lot of physiological role and especially in cardiovascular disease by avoiding platelet aggregation, favorizing vasodilation. Moreover, it has been shown to be storable under the *S*-nitrosoglutathion (GSNO) form. Nitric oxide, and the NO donor GSNO, are also crucial at the intestinal level, as it was showed that it permits to enhance mucosal secretion, increase cell junction proteins expressions, recruit immune cells and many other roles. As GSNO is secreted endogenously by enteric glial cells, it is of crucial interest to study it, to better understand its impact on the intestinal barrier, and to highlight some potential therapeutic targets. The dynamic equilibrium between all the actors of the barrier and the interactions between mucus, epithelial cells, microbiota, and immune defense, are essential for the maintenance of the barrier integrity and the intestinal homeostasis. The disruption of this homeostasis induced an increase of the permeability and leads to an inflammation and strong damages of the mucosa which is not able anymore to ensure the vital function of protection and absorption. It is what happened in the context of Inflammatory Bowel Diseases (IBD). IBD have showed a perturbation in NO level, which is different between a recurrent phase and remission phase: indeed, if the NO level is largely increased in active phase of IBD, it returns to baseline during the remission phase. This point is interesting as it highlights a perturbation in NO level in the gastrointestinal tract. Investigating this perturbation, and finding a way to counterbalance it, is important to develop new and more efficient therapeutic strategies. The study the intestinal barrier can be done using many existing models, and from them, the *ex vivo* model of Ussing chamber can be used as it is a simple and powerful technique to investigate the intestinal permeability and drugs effects on it. In the present study, Ussing Chamber system was chosen to investigate the GSNO effects on intestinal barrier integrity by following the intestinal permeability to a paracellular marker (NaFlu) because of its convenience, effectiveness (6 tissues in parallel) and better mimicking *in vivo* environment in compared with Caco-2 cells monolayer. Upon removal from the animal, an *ex vivo* intestinal preparation and incubation in Krebs-Henseleit buffer has limited viability (Clarke, 2009). Thus, the limitation of this system is the difficulties to ensure the tissue viability, with a maximum of 2- to 3-h experiment. Therefore, all the experiments and data analysis were performed under quality criteria to get reliable and analyzable result, which were established and described in our previous study [Schmitt et al, 2019, to be submitted].

A preliminary study showed that GSNO is stable in experimental conditions, *i.e.* at least 60 min, at 37°C under conditions providing high oxygenation rate (fast rotation, mimicking oxygenation in Ussing chamber), and with subdued light. Our study showed that a high

concentration of GSNO (10 and 100 μ M) in the luminal compartment of the Ussing chamber significantly increased the intestinal permeability while a low concentration of GSNO (0.1 μ M) did not affect the permeability. Many authors have showed a beneficial and protective action of mucosal GSNO on the intestinal barrier (Cheadle et al., 2013; Li et al., 2016; Savidge et al., 2007). Enteric glia cells-derived GSNO was identified by Savidge in 2007 as a potent inducer of intestinal barrier function *ex vivo* and *in vivo* and of attenuated tissue inflammation by an increased expression of perijunctional F-actin and tight-junction-associated proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and occludin (Savidge et al., 2007). Same idea was published by Cheadle and co-workers in 2013 with *in vitro* cells model: GSNO secreted by enteric glia cells prevented intestinal barrier failure after injury and improved expression and localization of tight junction proteins including ZO-1 and occludin (Cheadle et al., 2013). Li and co-workers showed that exogenous femoral venous injected GSNO protected intestinal barrier under endotoxin-induced inflammation by preserving tight junction protein ZO-1 expression and reducing inflammation marker releasing (IL-1 β and TNF- α) through inhibiting NF- κ B pathway (Li et al., 2016). These studies support the idea expressed in the publication of Dijkstra *et al* in 2002, explaining the link between intestinal NO and NF- κ B, and possible novel therapeutic strategies of NO supplementation (Dijkstra et al., 2002). The present work is the first one that mentioned about the GSNO derived from oral administration route (luminal side) effects on intestinal integrity. The inhibition of NO synthases, in a non-specific manner using L-NAME, is a way to avoid endogenous production of NO by enteric glial cells. This strategy is very informative to study the impact of an exogenous GSNO supplementation: our preliminary data showing no difference when NOS are inhibited suggest that the endogenous NO production in an isolated rat intestine is minor, and so its inhibition did not perturbate the intestinal barrier integrity. However, it could be interesting to study the exogenous GSNO supplementation in concomitance to NOS inhibition, to better understand the exogenous GSNO effect, without the proper intestinal NO action. The permeability study and western blot results suggested that GSNO can affect intestinal barrier in a dose-dependent manner, which proved the same idea as mentioned by Savidge (Savidge et al., 2007). This is in accordance with our hypothesis that the delivery of a low concentration of NO donor on the luminal side of the intestinal mucosa might be a good approach to avoid the disruption of the mucosal barrier integrity, and to have a continuous stimulation and surveillance of the immune system. The exact mechanism has not been investigated yet, but it could be associated with hypothetic action like post-translational modifications of proteins caused by addition of NO (Figure 4).

We speculate that different NO concentrations may cause different post-translational modifications of proteins according to the literatures. In the presence of low concentration of

NO (0.1 μM and lower), it might be a *S*-nitrosation caused by an interaction between NO and cystein residue of protein. The final product RSNO (*S*-nitrosothiol) could also act as a storage form of NO (as known at the cardiovascular level). In contrast, in the presence of high concentration of NO (10 μM and higher) with oxidative stress condition, there might exist nitration of proteins on the tyrosine residue, which may provoke an increase of the intestinal permeability or a modulation of the activity of the immune response effectors and finally trigger the pathological inflammation process. Through different literatures, different proteins could be the interesting targets of different post-translational modification way caused by NO, which may finally modulate the intestinal barrier integrity.

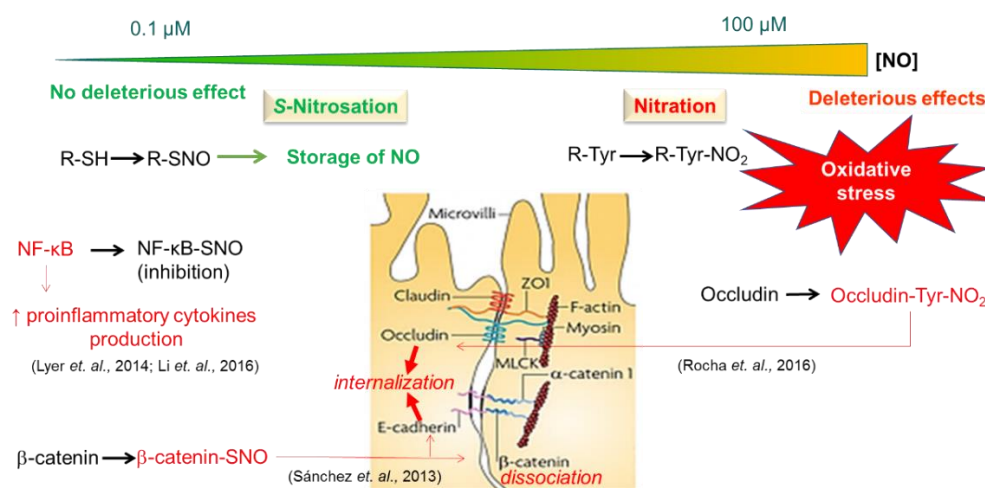


Figure 4: Possible mechanism of intestinal barrier integrity modulation by NO.

NF- κ B ability to induce the production of proinflammatory cytokines is reduced after a *S*-nitrosation step and thus this might be associated with the potential protective action in intestinal barrier integrity of NO (Li et al., 2016). Another target of *S*-nitrosation caused by NO could be adherens junction proteins. As reported in literature, *S*-nitrosation of β -catenin leads to changes in microvascular permeability after administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) for 15 min (Thibeault et al., 2010): *S*-nitrosation amino acid of β -catenin was Cysteine 619 which is located at the interaction site of β -catenin with VE-cadherin. Its *S*-nitrosation causes dissociation of the complex and an increase in microvascular permeability (Thibeault et al., 2010). p120-catenin was considered as another target of *S*-nitrosation (Marín et al., 2012). Cys 579 as the main *S*-nitrosated-residue was the responsible amino acid in p120-catenin. Cys 579 is also located in the interaction site with VE-cadherin. Thus, *S*-nitrosation regulated protein-protein interactions and promoted the dissociation of the adherens junction complex. *S*-nitrosation of β -catenin and p120-catenin destabilizes the adherens junction complex, which leads to changes in the localization and interaction between these proteins at the adherens junction, which finally induce the internalization of VE-cadherin. All these actions

were well investigated within microvascular. Thus, we hypothesize that similar mechanism could occurs in intestinal mucosa. *S*-nitrosation of β -catenin caused by NO incubation leads to E-cadherin internalization, which finally increased the intestinal permeability.

Occludin was reported that could be nitrated by NO through the tyrosine residue, which may finally lead to the internalization and destroy the tight-junction between epithelial cells (Rocha et al., 2016).

For further study of mechanism exploration, more work needs to be done, such as identification of post-translational modifications (*S*-nitrosation or nitration) targets and quantification of the modification level to understand the modulation process of the intestinal barrier integrity in the presence of NO. Moreover, the identification of nitrosated proteins – and associated clusters – could highlight some signaling pathways involved in the intestinal barrier regulation and modified by NO, helping to develop novel therapeutic strategies.

To conclude about the present study, different GSNO concentrations (0.1, 10 and 100 μ M) were added in the luminal side of intestine to investigate its effect on intestinal barrier integrity in Ussing chamber system by following the intestinal permeability to a paracellular marker (NaFlu). The preliminary mechanism was studied by western blot to follow the expression of tight junction proteins (claudin-1 and occludin) and adherens junction proteins (E-cadherin and β -catenin). Finally, a dose-dependent effect was observed for GSNO effects on intestinal barrier integrity. High concentration of GSNO (100 μ M) showed to increase intestinal barrier permeability while low concentration of GSNO (0.1 μ M) did not modify intestinal permeability with healthy intestine tissue. Through the current study, we can conclude that the secure concentration of GSNO for a NO supplementation should be equal or less than 0.1 μ M. In order to confirm the feasibility of luminal GSNO preventing intestinal barrier disruption, further study is necessary to continue with an *ex vivo* inflammation model that can induce the disruption of intestinal barrier (need to be explored, because no existing model in the literatures) or with a proposal of formulation to deliver GSNO orally in an *in vivo* inflammation model which has been well investigated. Meanwhile, the mechanism of GSNO regulating intestinal barrier integrity will also be studied by following the GSNO metabolism (involved enzymes) in contact with intestine tissue and the functionalization of GSNO by post-translation (nitrosation/nitrosylation/nitration) of proteins. Therefore, an innovative chronic treatment of IBD – in order to prevent relapses of inflammation - may rely on supplementation of small amounts of nitric oxide to maintain the intestinal barrier integrity.

References

- Cheadle, G.A., Costantini, T.W., Lopez, N., Bansal, V., Eliceiri, B.P. & Coimbra, R., 2013. Enteric glia cells attenuate cytomix-induced intestinal epithelial barrier breakdown. *PloS one*, 8, e69042.
- Clarke, L.L., 2009. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G1151-66.
- Clère, N., Faure, S. & Guerriaud, M., 2014. *Bases fondamentales en pharmacologie: Sciences du médicament*: Elsevier Masson.
- Dattilo, J.B. & Makhoul, R.G., 1997. The role of nitric oxide in vascular biology and pathobiology. *Annals of vascular surgery*, 11, 307-314.
- Forsgård, R., Korpela, R., Stenman, L., Österlund, P. & Holma, R., 2014. Deoxycholic acid induced changes in electrophysiological parameters and macromolecular permeability in murine small intestine with and without functional enteric nervous system plexuses. *Neurogastroenterology & Motility*, 26, 1179-1187.
- Fortuna, A., Alves, G., Falcao, A. & Soares-Da-Silva, P., 2012. Evaluation of the permeability and P-glycoprotein efflux of carbamazepine and several derivatives across mouse small intestine by the Ussing chamber technique. *Epilepsia*, 53, 529-38.
- Hooper, L.V. & Macpherson, A.J., 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews. Immunology*, 10, 159.
- Kim, Y.S. & Ho, S.B., 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current gastroenterology reports*, 12, 319-330.
- Kochar, N.I., Chandewal, A.V., Bakal, R.L. & Kochar, P.N., 2011. Nitric oxide and the gastrointestinal tract. *Int. J. Pharmacol*, 7, 31-39.
- Kolios, G., Valatas, V. & Ward, S.G., 2004. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, 113, 427-437.
- Li, Z., Zhang, X., Zhou, H., Liu, W. & Li, J., 2016. Exogenous S-nitrosoglutathione attenuates inflammatory response and intestinal epithelial barrier injury in endotoxemic rats. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 80, 977-984.
- Marin, N., Zamorano, P., Carrasco, R., Mujica, P., Gonzalez, F.G., Quezada, C., Meininger, C.J., Boric, M.P., Duran, W.N. & Sanchez, F.A., 2012. S-Nitrosation of beta-catenin and p120 catenin: a novel regulatory mechanism in endothelial hyperpermeability. *Circ Res*, 111, 553-63.
- Parent, M., Dahboul, F., Schneider, R., Clarot, I., Maincent, P., Leroy, P. & Boudier, A., 2013a. A complete physicochemical identity card of S-nitrosoglutathione. *Current Pharmaceutical Analysis*, 9, 31-42.
- Parent, M., Dupuis, F., Maincent, P., Vigneron, C., Leroy, P. & Boudier, A., Year. Quel avenir en thérapeutique cardiovasculaire pour le monoxyde d'azote et ses dérivés? *Annales Pharmaceutiques Françaises*, Elsevier, 84-94.
- Payros, D., Secher, T., Boury, M., Brehin, C., Ménard, S., Salvador-Cartier, C., Cuevas-Ramos, G., Watrin, C., Marcq, I. & Nougayrède, J.-P., 2014. Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microbes*, 5, 313-512.
- Potten, C.S., Owen, G. & Booth, D., 2002. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci*, 115, 2381-2388.
- Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R. & Sofroniew, M.V., 2007. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology*, 132, 1344-1358.
- Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L. & Hickman, J.J., 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation*, 20, 107-126.
- Stephens, R.H., Tanianis-Hughes, J., Higgs, N.B., Humphrey, M. & Warhurst, G., 2002. Region-dependent modulation of intestinal permeability by drug efflux transporters: in vitro studies in *mdr1a(-/-)* mouse intestine. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 1095-101.

- Thibeault, S., Rautureau, Y., Oubaha, M., Faubert, D., Wilkes, B.C., Delisle, C. & Gratton, J.-P., 2010. S-Nitrosylation of β -catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Molecular cell*, 39, 468-476.
- Turner, J.R., 2000. Show me the pathway!: Regulation of paracellular permeability by Na⁺-glucose cotransport. *Advanced drug delivery reviews*, 41, 265-281.
- Turner, J.R., 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 9, 799.
- Woitiski, C.B., Sarmiento, B., Carvalho, R.A., Neufeld, R.J. & Veiga, F., 2011. Facilitated nanoscale delivery of insulin across intestinal membrane models. *International journal of pharmaceutics*, 412, 123-131.

2. Conclusion

Nous avons pu montrer qu'il y avait probablement un effet concentration-dépendant du GSNO, puisqu' une forte concentration en GSNO (10 et 100 μM) augmente la perméabilité du tissu intestinal, à l'inverse des faibles concentrations qui n'entraînent pas de modification de la perméabilité du marqueur fluorescent. Par ailleurs, ces effets observés sont bien dus au NO provenant du GSNO, puisque le GSH aux mêmes concentrations n'a aucun effet sur la perméabilité intestinale. De façon plutôt surprenante, aucune modification drastique n'a été observée sur les jonctions cellulaires, même si l'on a observé une diminution de 50% de la quantité d'occludine en présence de GSNO 100 μM : cela laisse penser à un impact négatif d'une forte concentration en GSNO sur les jonctions serrées. Il a été mis en évidence dans la littérature une activité des NO synthases au niveau intestinal, et notamment au niveau de l'iléon que nous utilisons en chambre de Ussing (Gookin et al., 2004) : ces NO synthases permettant une production endogène de GSNO, il est possible qu'il y ait un effet cumulatif ou synergique entre le NO apporté exogène et le NO produit de manière endogène, exacerbant les effets d'une concentration déjà élevée en GSNO. Or, l'inhibition des NO synthases en présence de L-NAME, permet de maintenir la perméabilité de la fluorescéine sodique, après 2 h d'exposition. Il serait intéressant d'aller plus loin dans l'exploration de cette piste en exposant le tissu à du GSNO en concomitance à l'inhibition des NO synthases : ceci permettrait potentiellement de déterminer le réel impact du NO apporté (exogène), vis-à-vis du NO endogène produit par les cellules entériques gliales, sur l'intégrité de la barrière intestinale.

Il serait intéressant d'explorer davantage la balance RedOx par l'identification des espèces réactives de l'oxygène (EROs) / de l'azote (ERNs) : le dosage de ces espèces secrétées dans les compartiments de la chambre de Ussing (dont ONOO-) permettrait de déterminer l'importance du stress tissulaire. En effet, ceci permettrait d'une part de comprendre ce que subit le tissu intestinal dans ce modèle de chambre de Ussing, et d'autre part cela permettrait d'expliquer en partie l'effet délétère de l'apport d'une concentration élevée en GSNO : il est connu qu'apporter du NO dans une configuration combinant déjà stress et inflammation n'est pas des plus favorables pour l'intestin. Également, l'identification de protéines nitrosées en présence/absence de L-NAME au sein du tissu (par la méthode de Western Blot), ou encore pouvant être retrouvées dans le milieu d'incubation : étant donné le peu de protéines que l'on peut s'attendre à retrouver dans le milieu d'incubation, la deuxième solution semble davantage complexe. En effet, il a été démontré que les NO synthases, et en particulier

la eNOS était impliquée dans la régulation de la S-nitrosation des protéines jonctionnelles (Durán et al, 2013 ; Sánchez et al, 2013). Aussi, il a été démontré que des protéines des jonctions intercellulaires pouvaient être S-nitrosées, et notamment les jonctions adhérentes comme la β -caténine (Marín et al., 2012). Les protéines nitrosées identifiées permettraient de mettre potentiellement en évidence des clusters impliqués dans certaines voies de signalisation (par la méthode de Biotin Switch), telles que les voies présentées dans la revue de l'introduction générale : aussi, il serait intéressant d'aller plus loin et de vérifier les voies de signalisation impactées par la nitrosation (Rho/ROCK, chaînes légères de la myosine, cytokines anti- et pro-inflammatoires, mucus, toll-like receptors, ...).

Parmi les résultats non montrés dans l'article, nous avons étudié l'hypothèse selon laquelle le GSNO agirait par transnitrosation : il libérerait son -NO qui lui permettrait de traverser la barrière intestinale et de former de nouveaux S-nitrosothiols (RSNO) en interagissant avec les protéines et -SH environnants. Pour cela, un réducteur fort de la liaison -S-H / -S-NO a été utilisé afin d'empêcher la formation de nouveaux RSNO : l'ascorbate. Après avoir vérifié que l'ascorbate $5 \cdot 10^{-6}$ M n'avait pas d'effet direct sur la barrière intestinale, nous avons vérifié l'effet du GSNO à 0.1 ou 100 μ M, en présence de l'ascorbate, sur la perméabilité intestinale (Figure 16). De manière intéressante, alors que nous avons observé précédemment une augmentation de la perméabilité en présence de GSNO 100 μ M seul, nous n'observons plus ce phénomène lorsqu'il est en présence d'ascorbate : cela peut certainement s'expliquer par le fait que le GSNO apporté voit sa propre liaison -S-NO clivée par l'ascorbate. Ainsi, le GSNO serait rapidement transformé en GS- + -NO, et le NO serait très rapidement transformé et dégradé en ions nitrite (NO_2^-) puis ions nitrate (NO_3^-). Dans la littérature, il a été démontré que les nitrites provenant de l'alimentation permettaient d'induire la nitration des occludines – donc des jonctions intercellulaires – au niveau de l'estomac : aussi, il est d'un intérêt majeur de vérifier que l'effet du GSNO vient du NO, ou bien de ses métabolites (NO_2^- et NO_3^-) (Rocha et al., 2016).

NaFlu flux

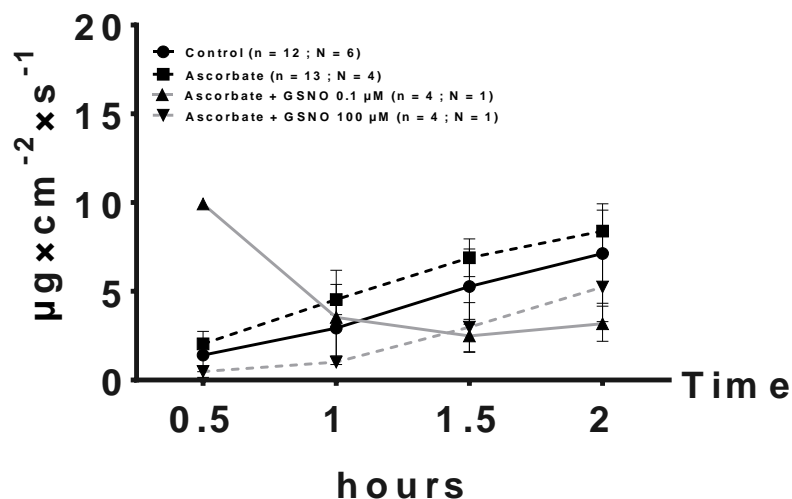


Figure 16 : Evolution du flux de fluorescéine sodique (NaFlu, 2.7 mM) en présence ou non d'ascorbate 5.10^{-6} M et de GSNO (0.1 ou 100 μ M), pendant 2 h en chambre de Ussing. $p < 0.05$ vs Control; t test

Afin de compléter les études déjà réalisées dans cette partie, plusieurs autres pistes sont prochainement envisagées : une étude morphologique, par coloration à l'hématoxyline-éosine-bleu alcian comme réalisé pour la mise en place du système *ex vivo* de chambre de Ussing (cf. chapitre 1), mais cette fois après exposition du tissu intestinal à différentes concentrations en GSNO (0.1 μ M vs 100 μ M) : cela permettrait potentiellement de visualiser directement les modifications morphologiques infligées à la barrière intestinale par le GSNO. Nous avons vérifié que les effets du GSNO ne provenaient pas de sa partie -SH, il serait cependant intéressant de vérifier qu'ils ne viennent pas non plus d'autres formes de NO, dont les métabolites du GSNO comme les ions nitrites : ainsi, un contrôle de la perméabilité de la fluorescéine sodique après exposition intestinale au nitrite de sodium (NaNO_2) permettrait de mieux comprendre si le GSNO agit par l'intermédiaire de ses dérivés (ions nitrite NO_2^-).

Discussion, Conclusion Générale et Perspectives

L'intestin, et plus précisément la barrière intestinale, est un élément indispensable puisque de son « bon état » dépend la « bonne santé » des individus. L'intégrité de la barrière intestinale est quelque chose d'encore peu connu et maîtrisé, même si de nombreuses équipes de recherche travaillent sur ce sujet. Et pour cause, puisque mieux comprendre comment est régulée la barrière intestinale, c'est pouvoir dégager de nouvelles pistes et stratégies thérapeutiques. Ceci n'est pas négligeable quand nous savons que les pathologies intestinales, et notamment les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), ne représentent pas moins de 200 000 nouveaux cas par an rien qu'en France : dans les pays occidentaux, si l'incidence des MICI s'est stabilisée ces dernières années, leur prévalence reste néanmoins élevée (Ng et al., 2017). C'est dans ce contexte que l'importance d'étudier la barrière intestinale prend toute son ampleur, afin de trouver des moyens de maintenir la barrière intestinale, et donc l'homéostasie intestinale : c'est ce à quoi nous nous sommes attachés dans ces travaux de thèse. Dans un contexte plus général, mieux comprendre la physiologie intestinale et la régulation de la barrière permet de proposer et développer de nouvelles thérapies basées sur des formes médicamenteuses plus efficaces permettant de moduler la biodisponibilité de principes actifs.

Le laboratoire CITHEFOR au sein duquel ont été réalisés ces travaux est multidisciplinaire, et s'intéresse au monoxyde d'azote (NO) et ses enjeux tant d'un point de vue physico-chimique (caractérisation de principes actifs), que d'un point de vue galénique (formulation de principes actifs) et pharmacologique (études pré-cliniques de l'efficacité de principes actifs). Comme le monoxyde d'azote sous sa forme gazeuse libre et radicalaire ne peut être utilisé tel quel, sont communément développés des donneurs de NO, comme par exemple les S-nitrosothiols (RSNO), dont le S-nitrosoglutathion (GSNO) est le chef de file.

Précédemment au laboratoire, le GSNO a déjà été étudié sous différents aspects, tout d'abord avec l'établissement d'une caractérisation physico-chimique complète de ce principe actif permettant de connaître ses propriétés et de pouvoir en tirer des avantages pour l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques : le fait de pouvoir le synthétiser de manière fiable et reproductible en fait un candidat médicament particulier, d'autant plus qu'il a déjà été l'objet de plusieurs essais cliniques ces dernières années principalement en application cardiovasculaire (Marianne Parent et al., 2013). Le GSNO présente l'avantage d'être relativement stable (demi-vie de plusieurs heures), bien plus que d'autres composés comme la S-nitrosoacétylpénicillamine ou la S-nitrosocystéine (demi-vie de quelques minutes) ; d'être produit biologiquement et étant donc biocompatible, et d'être aisément

synthétisable et conservable sous atmosphère azotée (afin d'éviter toute oxydation qui dégraderait le GSNO). Cependant, il possède moins de « NO » que d'autres composés comme la *S,S*-dinitrosobucillamine ($\text{Buc}(\text{NO})_2$, qui possède deux fois plus de NO, donc il faudrait théoriquement administrer deux fois plus de GSNO pour apporter autant de NO qu'avec de la $\text{Buc}(\text{NO})_2$ par exemple), et reste sensible aux facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, ou encore le pH.

Le GSNO a ensuite été étudié pour des effets sur le système cardiovasculaire : il a notamment été démontré qu'en plus des propriétés vasodilatatrices du GSNO *via* la libération du NO, il était également possible de stocker du GSNO au niveau vasculaire : ceci est d'autant plus intéressant que ce stockage de NO sous forme de GSNO est mobilisable par la suite (Dahboul et al., 2014). A l'échelle intestinale, des études *in vitro* préalables ont été réalisées sur des cellules d'adénocarcinome colique humain (Caco-2), montrant que le GSNO était une molécule située entre les classes I et III de la classification BCS (Biopharmaceutical Classification System), avec une forte solubilité et une perméabilité intermédiaire, ce qui en fait un principe actif de choix dans l'optique d'un traitement chronique par administration orale (Bonetti et al., 2018).

C'est dans le but de mieux comprendre les effets du GSNO sur l'intégrité de la barrière intestinale que les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés, en développant des méthodes appropriées au sein-même du laboratoire : un modèle d'étude *ex vivo* de chambre de Ussing permettant d'utiliser de l'intestin isolé avec une structure multicouche bien plus complexe et proche des conditions réelles que les monocouches de cellules Caco-2 (cf. article 1 de ce manuscrit); et une méthode de quantification des espèces ^{15}NO pour pouvoir suivre ce GSNO apporté dans la lumière intestinale. Une fois marqué à l'isotope ^{15}N , sous forme de GS^{15}NO ou de ses dérivés $^{15}\text{NO}_2^-$ et $^{15}\text{NO}_3^-$ (cf. article 2 de ce manuscrit), il est plus aisé de distinguer le GSNO apporté de celui produit par l'organisme. Cette technique ouvre des perspectives d'études pharmacocinétiques et de détermination de la biodisponibilité du GSNO, ce qui n'a jamais été fait jusqu'alors et qui est indispensable pour proposer le GSNO comme candidat médicament.

Le premier chapitre traite des méthodologies qui ont été mises en place lors de ces travaux de thèse, à savoir la mise en place du modèle *ex vivo* de chambre de Ussing, ainsi que la méthode analytique de marquage isotopique et quantification du GSNO par l'azote 15 en chromatographie liquide haute performance (CLHP). Cette première étape, bien que longue à mettre au point et complexe d'un point de vue technique, était malgré tout indispensable puisque c'est la base même des travaux présentés dans ce manuscrit. Cela a permis non seulement de définir la perméabilité

« basale » de l'intestin en présence de deux marqueurs de passage différents – la fluorescéine sodique et le propranolol – dans des conditions expérimentales proches des conditions physiologiques ; mais également de pouvoir confronter ces résultats à la littérature et d'en vérifier la concordance : ainsi, plusieurs études portées sur la perméabilité de la NaFlu (Berginc et al., 2012; Elginaid Osman et al., 1998; Forsgård et al., 2014; Legen and Kristl, 2003) et du propranolol (Leithner et al., 2011; Polentarutti et al., 1999; Ungell et al., 1998) ont été réalisées par d'autres équipes et montrent des valeurs similaires quoique bien plus variables que ce que nous avons obtenus. Cela n'est pas surprenant et c'est l'essence même du premier article de ce manuscrit : afin de limiter la variabilité d'une méthode particulièrement technique et à plusieurs étapes critiques, il nous semblait indispensable de poser des critères qualité attestant de la fiabilité des résultats alors recueillis par ces expérimentations. Cette étude a donc permis de répondre à l'objectif de départ qui était d'avoir à disposition des outils fiables pour l'étude de la relation entre le GSNO et la barrière intestinale.

Sur un autre aspect avec la mise en place de la méthode analytique à l'azote 15, il nous semblait important avant tout de valider la méthodologie sur des critères analytiques tels que linéarité, répétabilité et précision : ces travaux font l'objet du second article présenté dans ce manuscrit en étroite collaboration avec Haiyan YU, alors doctorante et collègue au sein du laboratoire CITHEFOR. Ces travaux ont d'ailleurs fait l'objet d'une autre publication de H. Yu précisant la mise en place et l'optimisation de la méthodologie analytique (Yu et al., 2019a). Cette mise en place de la méthode analytique de quantification des espèces NO marquées à l'azote 15 a ouvert un large champ d'étude puisqu'elle permet de pouvoir étudier la perméabilité du GSNO et de ses produits dérivés, alors marqués à l'azote 15 : ceci présente un double intérêt, d'une part situer le GSNO en fonction de sa perméabilité et de sa solubilité confirmant son appartenance intermédiaire aux classes BCS I et III, et d'autre part pouvoir différencier les espèces NO provenant du GS¹⁵NO apporté (exogène, ¹⁵N) de celles provenant de la production endogène par les NO synthases (¹⁴N)

Le second chapitre traite plus particulièrement de la prise en charge du GSNO par la barrière intestinale, en se basant sur la méthodologie développée dans le chapitre précédent. Ce point est primordial puisque, en fonction de la manière dont le GSNO est pris en charge, il pourra être envisagé différentes stratégies pour son administration afin d'avoir un effet local / intestinal ou au contraire cardiovasculaire. Si nous avons pu montrer qu'il y avait une activité enzymatique de la gamma-glutamyl-transférase (GGT) et une action des thiols permettant le métabolisme du GSNO (*cf.* article 3), il y a également d'autres enzymes pouvant intervenir dans la prise en charge

du GSNO, et il reste à déterminer la réelle implication de chacun de ces acteurs indépendamment des autres. Aussi, il n'est pas absurde de penser à un double marquage GSNO et GSH (Mutlib et al., 2005), afin de voir s'il y a une prise en charge différente de ces deux composés, et de mieux comprendre si c'est le GSNO qui est pris en charge dans son intégralité ou bien s'il y a clivage enzymatique et libération du NO avec action du GSH en tant que molécule antioxydante. Cela permettrait tout au moins de corroborer les résultats avancés dans le chapitre suivant montrant que – *a priori* – l'effet observé du GSNO (augmentation de la perméabilité intestinale à forte concentration $\geq 10 \mu\text{M}$, aucun effet à faible concentration $\leq 0,1 \mu\text{M}$) viendrait bien du NO apporté puisque le GSH n'a aucun effet sur la perméabilité intestinale : nous y reviendrons par la suite.

Concernant cette prise en charge du GSNO, quand nous nous intéressons aux différents acteurs de la barrière intestinale introduits dans le chapitre précédent (*cf.* revue), il n'est pas absurde de se dire que les bactéries y prennent une part prépondérante : il est connu que les bactéries intestinales telles qu'*Helicobacter sp.* possèdent une activité GGT (Hanigan and Frierson, 1996; Shen et al., 2016), et une importante quantité de bactéries sont « emprisonnées » dans le mucus recouvrant l'épithélium intestinal : aussi, la prise en charge du GSNO au niveau muqueux par ces bactéries semble une piste très intéressante et mériterait d'être davantage étudiée, pourquoi pas en faisant un profil des bactéries présentes à ce niveau et en déterminant leur activité enzymatique de manière plus fine. Le microbiote intestinal est un monde auquel les chercheurs s'intéressent particulièrement dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), ayant montré une modification de la représentation des familles bactériennes en fonction du profil pathologique (diminution des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes*, augmentation des actinobactéries, Manichanh et al., 2012), aussi il serait intéressant de vérifier davantage à quel point la modification de ces populations pourrait influencer l'activité enzymatique et donc la prise en charge du GSNO à l'échelle intestinale. Par ailleurs, il n'y a pas que la GGT qui a été mise en cause dans la prise en charge du GSNO puisque d'autres enzymes telles que la protéine disulfure isomérase (PDI) est également impliquée (Belcastro et al., 2017; Iida et al., 1996; Shah et al., 2007; Sliskovic et al., 2005) : il serait tout aussi intéressant d'évaluer, à la manière de la GGT, son activité et sa modification en fonction de différents profils bactériens (population bactérienne physiologique vs pathologique).

En partant également des acteurs de la barrière intestinale (*cf.* revue), nous avons également discuté de la prise en charge du GSNO au niveau de la barrière intestinale

par des transporteurs de type L-aminotransférase (L-AT) : faisant suite à l'activité enzymatique de la GGT qui va produire du CysGlyNO, celui-ci va être pris en charge par un dipeptide qui va le transformer en CysNO. C'est alors que la L-AT entre en action en prenant en charge la CysNO et en faisant 1) libérer le NO qui pourra diffuser au niveau systémique ou à travers la barrière intestinale, ou 2) en internalisant la CysNO. Le NO seul qui aura diffusé au sein de la barrière intestinale pourra alors réagir avec des cystéines et protéines à cystéine environnantes pour former des CysNO, permettant de former un stockage de NO, de modifier des voies de signalisation ou encore de former de nouveaux S-nitrosothiols (RSNO, dont le GSNO par réaction avec les GSH environnants) (Gaucher et al., 2012). Également, l'alimentation est un point important de la formation de RSNOs au niveau intestinal puisque l'apport en ions nitrite et ions nitrate (provenant de la laitue par exemple), et leur arrivée au niveau stomacal va permettre - grâce au pH acide - de former des RSNOs (Oliveira-Paula and Tanus-Santos, 2019).

Par ailleurs, dans le cadre de l'utilisation d'un principe actif donneur de NO comme le GSNO en chambre de Ussing, il est possible de suivre le NO au cours des expérimentations en temps réel : en effet, l'utilisation de méthodes électrochimiques comme une électrode à NO permet de quantifier le NO de 0,3 nM à 100 μ M avec une détection en temps réel, ampérométrie (Bedioui et al., 2018; Hunter et al., 2013; Jensen et al., 2013). Cela permettrait, en disposant le GSNO dans le compartiment donneur, de quantifier le NO qui traverse le tissu intestinal et se retrouve dans le compartiment accepteur (perméabilité de NO). L'utilisation du marqueur fluorescent diaminofluorescéine-diacétate (DAF2-DA) qui permettrait de mieux comprendre où se situe le NO, c'est-à-dire jusqu'à quel niveau il pénètre dans la structure du tissu intestinal : cette sonde fluorescente peut être utilisée soit qualitativement (pour une localisation du NO au sein d'un tissu par exemple), soit quantitativement en mesurant son intensité de fluorescence (Gomes et al., 2006; Kojima et al., 1998).

Le troisième et dernier chapitre s'intéresse aux effets du GSNO sur la barrière intestinale, et nous y avons montré qu'il y avait un effet concentration- et NO-dépendant du GSNO sur la perméabilité intestinale (*cf.* article 4) : en effet, une concentration importante en NO ($\geq 10 \mu$ M) augmente la perméabilité intestinale contrairement à de faibles concentrations ($\leq 0,1 \mu$ M) n'ayant aucun effet, et l'effet observé n'est plus retrouvé en substituant le GSNO par du GSH aux mêmes concentrations, démontrant un effet propre du NO apporté par le GSNO. Cependant cet aspect de l'étude n'en est qu'à ses débuts et il reste encore beaucoup à explorer : plus tôt, nous nous sommes intéressés aux possibilités qu'avait le GSNO pour agir,

notamment à travers son NO se retrouvant dans la barrière intestinale. Aussi, il pourrait être intéressant d'aller plus loin en utilisant des inhibiteurs de NO synthase : leur utilisation permettrait de déterminer la part réelle d'action du GSNO exogène, sans avoir de bruit de fond dû à la production endogène de NO par ces enzymes (Gookin et al., 2004, 2002). De plus, il serait intéressant d'étudier l'effet du GSNO sur les voies de signalisation régulant l'homéostasie intestinale : en effet, il est possible que des phénomènes de nitrosation ou transnitrosation de protéines impliquées dans ces voies de signalisation aient lieu, et modifient donc le comportement de la barrière intestinale. En effet, la modification conformationnelle de ces protéines engendrera soit l'activation soit l'inhibition des voies de signalisation sous-jacentes, et aura donc nécessairement des répercussions sur l'état de la barrière intestinale. Cet « état » de barrière intestinale comprend bien sûr les processus inflammatoires et le système immunitaire mais pas uniquement : il est connu que les protéines de jonctions intercellulaires peuvent être nitrosées (Marín et al., 2012; Noth et al., 2011; Rocha et al., 2016; Sánchez et al., 2013), et il paraît intéressant d'étudier l'impact de cette nitrosation sur ces jonctions. De ces éléments, il paraît de première importance d'identifier, déterminer et quantifier les protéines nitrosées au niveau intestinal, puis de les analyser en fonction de leur rôle et de leur implication dans telle voie de signalisation ou dans tel rôle du maintien de la barrière intestinale.

Plus généralement, mieux comprendre comment est pris en charge le GSNO, et mieux comprendre ses effets sur la barrière intestinale est quelque chose de primordial et prometteur pour pouvoir l'envisager en tant que potentiel candidat médicament, et ce pour ouvrir à de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, l'avancée de ces études permettra de déterminer tout d'abord l'action du GSNO sur la barrière intestinale, et permettra donc de voir s'il a un effet davantage local, ou si son administration a des répercussions à l'échelle systémique : ceci est loin d'être anodin, puisque de cette action locale ou systémique va orienter le ciblage de la stratégie thérapeutique, soit en action locale sur la barrière intestinale avec en ligne de mire les pathologies intestinales et MICI, soit en action systémique avec cette fois des orientations vers les pathologies cardiovasculaires. On ne peut parler de ces points sans évoquer les études de pharmacocinétique qui devront donc être mises en œuvre pour déterminer, après administration orale, comment se distribue le GSNO dans le corps, quelles actions il a non seulement au niveau intestinal, mais aussi sur les autres organes et à l'échelle cardiovasculaire. Cet aspect pourra se baser sur l'utilisation d'un GSNO marqué à l'azote 15 afin de pouvoir suivre le GSNO exogène, la méthode de quantification ayant déjà été mise en place lors de ces travaux de thèse et de ceux de

Haiyan YU.

La problématique ne s'arrête pourtant pas là puisque, en amont de ces études pharmacocinétiques, il faudra déjà déterminer comment administrer le GSNO : il s'agit non seulement de déterminer la dose à administrer – pour avoir une concentration de l'ordre du micromolaire voire même du nanomolaire ($\leq 0,1 \mu\text{M}$) pouvant agir au niveau intestinal – mais également de la forme d'administration du principe actif. En effet, le GSNO en tant que tel sera difficilement utilisable par voie orale, du fait des nombreuses variations de pH tout au long du tractus gastro-intestinal, mais également des nombreuses enzymes pouvant dégrader la liaison S-NO, aussi il faudra certainement faire intervenir une expertise en formulation pour protéger le GSNO jusqu'à ce qu'il arrive au site d'action désiré : il peut être envisagé d'utiliser des formulations basées sur des polymères d'ores et déjà utilisés en pharmacie comme l'alginate, permettant d'avoir un produit gastro-résistant et à libération prolongée du GSNO au niveau local / intestinal (Tønnesen and Karlsen, 2002) – ou au contraire permettant un passage dans le compartiment sanguin et l'atteinte de cibles cardiovasculaires ou cérébrales. D'ailleurs, des études ont déjà été entreprises au laboratoire CITHEFOR sur ces aspects galéniques, avec le développement de plusieurs formulations soit à visée locale intestinale, soit à visée systémique cardiovasculaire. Plusieurs types de formulations sont envisagés : 1) une formulation de type particule nanocomposite d'alginate, c'est-à-dire des nanoparticules comportant du GSNO, incluses dans une microparticule ; 2) une formulation de type alginate-GSH, permettant d'avoir plusieurs GSH à disposition, et donc de fonctionnaliser la particule par phénomènes de nitrosation dans l'organisme de ces GSH, cela consiste donc en des thiomères ; et 3) une formulation de type alginate-GSNO qui permet d'augmenter considérablement la charge en GSNO, avec un greffage de principe actif à la surface de la particule. Ces formulations vont déstructurer la couche de mucus du fait de la charge négative de l'alginate et du mucus : ces forces se répulsant vont relâcher, déstabiliser la couche de mucus, et permettre au NO d'être libéré à proximité de la barrière intestinale et diffuser à travers cette couche de mucus. Le premier type de formulation a été précédemment développé par la doctorante Wen WU au sein du laboratoire CITHEFOR, qui a mis au point et caractérisé des particules nanocomposites à base d'alginate chargées en GSNO : l'optimisation qui a été faite du procédé de préparation de ces objets a permis d'établir une caractérisation physico-chimique, de réaliser des tests de libération et des tests de perméabilité intestinale sur cellules Caco-2, en concluant sur une utilisation possible de ces nanocomposites dans le cadre de pathologies intestinales

pour avoir une libération prolongée et un effet local de GSNO (Wu et al., 2016). Le second type de formulation a pour principe de charger les thiomères en GSH, favorisant une transnitrosation locale en pH acide, par réaction avec le NO environnant produit par les NO synthases, ce type de formulation ayant également déjà été développé au laboratoire (Shah et al., 2017).

Il est également possible d'imaginer des formulations doubles, c'est-à-dire enveloppant deux principes actifs, notre principe actif d'intérêt qui est le GSNO, mais aussi un autre principe actif qui pourrait être une spécialité gastrorésistante ou encore des anti-inflammatoires tels que des dérivés salicylés, des corticoïdes, des immunosuppresseurs, des antibiotiques des anti-TNF α . L'idée serait donc d'apporter à la fois le GSNO et un traitement symptomatique. Pour ce dernier point, il pourrait être envisagé là encore plusieurs stratégies de co-formulation du GSNO avec 1) des aminosalicyles comme le 5-ASA : ce dernier, arrivant au niveau des cellules épithéliales, va être pris en charge par la N-acétyltransférase-1 qui va le transformer en N-acétyl-5-ASA, qui pourra alors se fixer à PPAR γ , favorisant sa translocation et son entrée cellulaire : il y aura alors inhibition de NF κ B et de la voie MAP kinase, ce qui induira une diminution des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6) ainsi qu'une diminution des prostaglandines (PGE2 et PGF2) (Hauso et al., 2015; Pouchard et al., 1992) ; ou encore une co-formulation du GSNO avec 2) des immunomodulateurs comme l'anti-TNF α , le TNF α qui est produit par les macrophages se fixe sur les récepteurs TNF α des cellules et induit une inflammation, ce qui est empêché par les immunomodulateurs en capturant le TNF α avant sa fixation au récepteur, c'est le principe des anticorps monoclonaux comme l'infliximab ou encore l'adalimumab mais ceux-ci présentent une perte de réponse chez certains patients, lorsqu'ils sont utilisés seuls (Peyrin-Biroulet et al., 2016).

De plus, en partant de ces formulations, et dans l'optique où elles seraient prêtes à être utilisées pour une administration chronique par voie orale, afin d'avoir une action locale / intestinale, il nous faut poser la question du comportement de ces formulations une fois à l'approche de la barrière intestinale. En effet, ces formulations vont rencontrer un obstacle et non des moindres, puisqu'il s'agit de la couche de mucus recouvrant l'épithélium : que va-t-il se passer au niveau de cette interface entre formulation et barrière intestinale ? va-t-il y avoir mucoadhésion ou mucopénétration de ces objets ? est-ce qu'ils vont lentement se décomposer pour libérer le(s) principe(s) actif(s) qu'ils renferment ? ou bien l'objet va pouvoir lui-même pénétrer à travers la couche de mucus pour agir à l'intérieur de la barrière intestinale ? Encore beaucoup de questions restent en suspens à l'heure actuelle, et je n'ai nul doute que mes

successeurs et collègues galénistes trouveront de qui s'y atteler et retirer nombre de ces points d'interrogation au fil des années à venir.

Afin de poursuivre les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse, il y a encore énormément de pistes à aborder mais ce ne sera pas nécessairement avec le modèle *ex vivo* mis en place lors de ces mêmes travaux : en effet, nous connaissons les limites de ce modèle, du fait de n'avoir qu'un segment intestinal isolé et ne pouvant être étudié que pendant deux heures d'expérimentation. Or, même si ce modèle reste très informatif pour établir des données préliminaires, il paraît compliqué, afin de pouvoir effectuer des études plus poussées et avec une machinerie encore plus complexe et proche des conditions physiologiques, de ne pas passer sur l'animal entier. De la même façon pour les études pharmacocinétiques qui sont le propre des études pré-cliniques, il est là aussi indispensable de passer sur l'animal entier. Cela n'empêche pas pour autant de confronter les résultats sur différents modèles en étudiant par exemple la nitrosation protéique sur culture cellulaire de type Caco-2, ce qui serait plus simple d'un point de vue technicité, et de compléter les données ainsi obtenues avec un dosage sanguin de NO (ou RSNO) : retrouver davantage de RSNO dans le sang, c'est potentiellement mettre le doigt sur des phénomènes de nitrosation ou transnitrosation. En effet, d'autres modèles comme le modèle *in vitro* de cellules Caco-2 ou encore des modèles *in vivo* permettront une exposition prolongée avec le principe actif (> 2 heures), permettant de mettre en évidence des modifications post traductionnelles / post transcriptionnelles par exemple, et qui ne sont pas observables sur le modèle de Ussing du fait des restrictions de temps d'étude (< 2 heures).

Enfin, dans un contexte où la stratégie serait de développer un principe actif afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques, il serait bien évidemment intéressant d'étudier l'efficacité du GSNO – libre ou formulé – sur des modèles pathologiques animaux. Par exemple, il existe le modèle d'inflammation par administration de lipopolysaccharides (LPS), ou plus classiquement utilisé le modèle de colite chimioinduite par administration de sulfate de dextran sodique (DSS) : ces substances sont préférentiellement utilisées sur animal entier par administration orale (eau de boisson sur une semaine par exemple), puisque le temps d'exposition est trop court en chambre de Ussing pour observer de réels impacts de ces composés sur la barrière intestinale. En effet, il semble compliqué d'évaluer le recrutement de cellules immunitaires ou l'inflammation proprement dite (cytokines pro- et anti-inflammatoires) en chambre de Ussing. C'est pourquoi des modèles *in vivo* aideraient à étudier les

effets bénéfiques du GSNO apporté de façon chronique par voie orale. Également, en plus de pouvoir effectuer des études plus longues, le modèle animal permet une déclinaison des protocoles expérimentaux tels qu'un pré-traitement au GSNO avant induction de la colite par exemple, afin de voir si le GSNO pourrait être utilisé en traitement préventif. Autre possibilité, administrer du GSNO après deux phases courtes d'induction inflammatoire, pour voir si un traitement au GSNO durant les phases de rémission permet d'espacer les phénomènes inflammatoires ayant lieu pendant les phases de poussée.

La mise en place du modèle *ex vivo* de chambre de Ussing et de la méthode analytique à l'azote 15 ont permis de dégager des perspectives intéressantes, quant à l'utilisation du S-nitrosoglutathion comme nouvelle stratégie thérapeutique. L'évaluation de sa prise en charge et de ses effets sur la barrière intestinale, bien qu'avancés lors de ces travaux de thèse, nécessitent cependant d'être approfondis avec d'autres approches. *In fine*, le GSNO pourrait être une piste thérapeutique intéressante dans le cadre de pathologies intestinales, mais également cardiovasculaires ou cérébrales, et ce afin d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de pathologies chroniques.

Références

- Aktary, Z., Alaei, M., Pasdar, M., 2017. Beyond cell-cell adhesion: Plakoglobin and the regulation of tumorigenesis and metastasis. *Oncotarget* 8, 32270–32291. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15650>
- Al-Sa'doni, H.H., Khan, I.Y., Poston, L., Fisher, I., Ferro, A., 2000. A Novel Family of S-Nitrosothiols: Chemical Synthesis and Biological Actions. *Nitric Oxide* 4, 550–560. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0315>
- Amidon, G.L., Lennernäs, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research* 12, 413–420. <https://doi.org/10.1023/A:1016212804288>
- Amiot, A., Cazals-Hatem, D., Corcos, O., Treton, X., Stefanescu, C., Joly, F., Bouhnik, Y., 2012. Maladies de la motricité de l'intestin grêle. *Hépatogastro- & Oncologie Digestive* 19, 536–46. <https://doi.org/10.1684/hpg.2012.0756>
- Anderberg, E.K., Lindmark, T., Artursson, P., 1993. Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route. *Pharm. Res.* 10, 857–864.
- Anderson, G.J., Frazer, D.M., 2017. Current understanding of iron homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 106, 1559S-1566S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155804>
- Angeli, V., Tacito, A., Paolicchi, A., Barsacchi, R., Franzini, M., Baldassini, R., Vecoli, C., Pompella, A., Bramanti, E., 2009. A kinetic study of gamma-glutamyltransferase (GGT)-mediated S-nitrosoglutathione catabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 481, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.10.027>
- Arnold, Y., Thorens, J., Bernard, S., Kalia, Y., 2019. Drug Transport across Porcine Intestine Using an Ussing Chamber System: Regional Differences and the Effect of P-Glycoprotein and CYP3A4 Activity on Drug Absorption. *Pharmaceutics* 11, 139. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030139>
- Asanuma, K., Huo, X., Agoston, A., Zhang, X., Yu, C., Cheng, E., Zhang, Q., Dunbar, K.B., Pham, T.H., Wang, D.H., Iijima, K., Shimosegawa, T., Odze, R.D., Spechler, S.J., Souza, R.F., 2016. In oesophageal squamous cells, nitric oxide causes S-nitrosylation of Akt and blocks SOX2 (sex determining region Y-box 2) expression. *Gut* 65, 1416–1426. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309272>
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L., 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G922-929. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922>
- Avdagić, N., Začiragić, A., Babić, N., Hukić, M., Šeremet, M., Lepara, O., Nakaš-Ićindić, E., 2013. Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease. *Bosn J of Basic Med Sci* 13, 5. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2013.2402>
- Bălăeț, C., Coculescu, B.I., Manole, G., Bălăeț, M., Dincă, G.V., 2018. Gamma-glutamyltransferase, possible novel biomarker in colon diverticulosis: a case-control study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 33, 428–432. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1428802>
- Balzan, S., de Almeida Quadros, C., de Cleve, R., Zilberstein, B., Cecconello, I., 2007. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22, 464–471. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04933.x>
- Barnett, S.D., Buxton, I.L.O., 2017. The role of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in human disease and therapy. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 52, 340–354. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1304353>

- Bateman, R.L., Rauh, D., Tavshanjian, B., Shokat, K.M., 2008. Human Carbonyl Reductase 1 Is an S-Nitrosoglutathione Reductase. *J. Biol. Chem.* 283, 35756–35762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807125200>
- Bauer, H., Stelzhammer, W., Fuchs, R., Weiger, T.M., Danninger, C., Probst, G., Krizbai, I.A., 1999. Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. *Exp. Cell Res.* 250, 434–438. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4558>
- Bazzoni, G., 2003. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 525–530.
- Bedioui, F., Ismail, A., Griveau, S., 2018. Electrochemical detection of nitric oxide and S-nitrosothiols in biological systems: Past, present & future. *Current Opinion in Electrochemistry* 12, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.04.014>
- Belcastro, E., Wu, W., Fries-Raeth, I., Corti, A., Pompella, A., Leroy, P., Lartaud, I., Gaucher, C., 2017. Oxidative stress enhances and modulates protein S-nitrosation in smooth muscle cells exposed to S-nitrosoglutathione. *Nitric Oxide* 69, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.07.004>
- Benjamin, N., O’Driscoll, F., Dougall, H., Duncan, C., Smith, L., Golden, M., McKenzie, H., 1994. Stomach NO synthesis. *Nature* 368, 502–502. <https://doi.org/10.1038/368502a0>
- Berginc, K., Kristl, A., Trontelj, J., 2012. Physiological barriers to the oral delivery of curcumin 518–524. <https://doi.org/10.1691/ph.2012.1112>
- Berglund, J.J., Riegler, M., Zolotarevsky, Y., Wenzl, E., Turner, J.R., 2001. Regulation of human jejunal transmucosal resistance and MLC phosphorylation by Na(+)-glucose cotransport. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G1487-1493. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.6.G1487>
- Bergmann, H., Rogoll, D., Scheppach, W., Melcher, R., Richling, E., 2009. The Ussing type chamber model to study the intestinal transport and modulation of specific tight-junction genes using a colonic cell line. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 1211–1225. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800498>
- Billat, P.-A., Roger, E., Faure, S., Lagarce, F., 2017. Models for drug absorption from the small intestine: where are we and where are we going? *Drug Discovery Today* 22, 761–775. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.007>
- Bonetti, J., Zhou, Y., Parent, M., Clarot, I., Yu, H., Fries-Raeth, I., Leroy, P., Lartaud, I., Gaucher, C., 2018. Intestinal absorption of S-nitrosothiols: Permeability and transport mechanisms. *Biochemical Pharmacology* 155, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.018>
- Boucher, M.-J., Laprise, P., Rivard, N., 2005. Cyclic AMP-dependent protein kinase A negatively modulates adherens junction integrity and differentiation of intestinal epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 202, 178–190. <https://doi.org/10.1002/jcp.20104>
- Bramanti, E., Angeli, V., Paolicchi, A., Pompella, A., 2011. The determination of S-nitrosothiols in biological samples—Procedures, problems and precautions. *Life Sciences* 88, 126–129. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.024>
- Brayden, D.J., Bzik, V.A., Lewis, A.L., Illum, L., 2012. CriticalSorb™ Promotes Permeation of Flux Markers Across Isolated Rat Intestinal Mucosae and Caco-2 Monolayers. *Pharmaceutical Research* 29, 2543–2554. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0785-6>
- Brayden, D.J., Maher, S., Bahar, B., Walsh, E., 2015. Sodium caprate-induced increases in intestinal permeability and epithelial damage are prevented by misoprostol. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 94, 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.013>
- Breen, E., Steele, G., Mercurio, A.M., 1995. Role of the E-cadherin/alpha-catenin complex in modulating cell-cell and cell-matrix adhesive properties of invasive colon carcinoma cells. *Ann. Surg. Oncol.* 2, 378–385.

- Brenchley, J.M., Douek, D.C., 2012. Microbial Translocation Across the GI Tract. *Annual Review of Immunology* 30, 149–173. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075001>
- Broniowska, K.A., Diers, A.R., Hogg, N., 2013. S-Nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, 3173–3181. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.004>
- Bryan, N.S., Grisham, M.B., 2007. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine* 43, 645–657. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026>
- Carbone, D.L., Doorn, J.A., Kiebler, Z., Petersen, D.R., 2005. Cysteine Modification by Lipid Peroxidation Products Inhibits Protein Disulfide Isomerase. *Chemical Research in Toxicology* 18, 1324–1331. <https://doi.org/10.1021/tx050078z>
- Carter, B.Z., Wiseman, A.L., Orkiszewski, R., Ballard, K.D., Ou, C.-N., Lieberman, M.W., 1997. Metabolism of Leukotriene C₄ in γ -Glutamyl Transpeptidase-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* 272, 12305–12310. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12305>
- Castellano, I., Merlino, A., 2013. Gamma-glutamyl transpeptidases: structure and function, *SpringerBriefs in biochemistry and molecular biology*. Springer, Basel ; New York.
- Cera, M.R., Del Prete, A., Vecchi, A., Corada, M., Martin-Padura, I., Motoike, T., Tonetti, P., Bazzoni, G., Vermi, W., Gentili, F., Bernasconi, S., Sato, T.N., Mantovani, A., Dejana, E., 2004. Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 114, 729–738. <https://doi.org/10.1172/JCI21231>
- Cheadle, G.A., Costantini, T.W., Lopez, N., Bansal, V., Eliceiri, B.P., Coimbra, R., 2013. Enteric Glia Cells Attenuate Cytomix-Induced Intestinal Epithelial Barrier Breakdown. *PLoS ONE* 8, e69042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069042>
- Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T., Sawada, N., 2008. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.017>
- Cho, Y.-E., Yu, L.-R., Abdelmegeed, M.A., Yoo, S.-H., Song, B.-J., 2018. Apoptosis of enterocytes and nitration of junctional complex proteins promote alcohol-induced gut leakiness and liver injury. *Journal of Hepatology* 69, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.005>
- Choi, M.S., 2018. Pathophysiological Role of S-Nitrosylation and Transnitrosylation Depending on S-Nitrosoglutathione Levels Regulated by S-Nitrosoglutathione Reductase. *Biomol Ther (Seoul)* 26, 533–538. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.179>
- Clarke, L.L., 2009. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 296, G1151–G1166. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90649.2008>
- Clevers, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
- Collins, J.T., Badireddy, M., 2019. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Conner, S.D., Schmid, S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>
- Costa, M., 2000. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47, 15iv–1519. https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv15
- Cummins, P.M., 2012. Occludin: One Protein, Many Forms. *Molecular and Cellular Biology* 32, 242–250. <https://doi.org/10.1128/MCB.06029-11>
- Da Silva, L.C., Da Silva, T.L., Antunes, A.H., Rezende, K.R., 2015. A Sensitive Medium-Throughput Method to Predict Intestinal Absorption in Humans Using Rat Intestinal Tissue Segments. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104, 2807–2812. <https://doi.org/10.1002/jps.24372>

- Dahboul, F., Leroy, P., Maguin Gate, K., Boudier, A., Gaucher, C., Liminana, P., Lartaud, I., Pompella, A., Perrin-Sarrado, C., 2012. Endothelial γ -Glutamyltransferase Contributes to the Vasorelaxant Effect of S-Nitrosoglutathione in Rat Aorta. *PLoS ONE* 7, e43190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043190>
- Dahboul, F., Perrin-Sarrado, C., Boudier, A., Lartaud, I., Schneider, R., Leroy, P., 2014. S,S'-dinitrosobucillamine, a new nitric oxide donor, induces a better vasorelaxation than other S-nitrosothiols. *European Journal of Pharmacology* 730, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.02.034>
- Damacena-Angelis, Célio, Oliveira-Paula, G.H., Pinheiro, L.C., Crevelin, E.J., Portella, R.L., Moraes, L.A.B., Tanus-Santos, J.E., 2017. Nitrate decreases xanthine oxidoreductase-mediated nitrite reductase activity and attenuates vascular and blood pressure responses to nitrite. *Redox Biology* 12, 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.003>
- Damacena-Angelis, Celio, Oliveira-Paula, G.H., Pinheiro, L.C., Crevelin, E.J., Portella, R.L., Moraes, L.A.B., Tanus-Santos, J.E., 2017. Nitrate decreases xanthine oxidoreductase-mediated nitrite reductase activity and attenuates vascular and blood pressure responses to nitrite. *Redox Biol.* 12, 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.003>
- Dattilo, J.B., Makhoul, R.G., 1997. The Role of Nitric Oxide in Vascular Biology and Pathobiology. *Annals of Vascular Surgery* 11, 307–314. <https://doi.org/10.1007/s100169900052>
- Davis, M.A., Reynolds, A.B., 2006. Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland. *Dev. Cell* 10, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.12.004>
- de La Pomélie, D., Santé-Lhoutellier, V., Gatellier, P., 2018a. Mechanisms and kinetics of heme iron nitrosylation in an in vitro gastro-intestinal model. *Food Chemistry* 239, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.092>
- de La Pomélie, D., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Gatellier, P., 2018b. Oxidation and nitrosation of meat proteins under gastro-intestinal conditions: Consequences in terms of nutritional and health values of meat. *Food Chemistry* 243, 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.135>
- Dijkstra, G., Moshage, H., Jansen, P.L.M., 2002. Blockade of NF- κ B Activation and Donation of Nitric Oxide: New Treatment Options in Inflammatory Bowel Disease? *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 37, 37–41. <https://doi.org/10.1080/003655202320621436>
- Ebnet, K., 2008. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem. Cell Biol.* 130, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0418-7>
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., Vestweber, D., 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J. Cell. Sci.* 117, 19–29. <https://doi.org/10.1242/jcs.00930>
- Eichman, J.D., Robinson, J.R., 1998. Mechanistic studies on effervescent-induced permeability enhancement. *Pharm. Res.* 15, 925–930.
- Elginaid Osman, N., Weström, B., Wang, Q., Persson, L., Karlsson, B., 1998. Spermine affects intestinal in vitro permeability to different-sized molecules in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 120, 211–216. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)00042-5)
- Ellgaard, L., Ruddock, L.W., 2005. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* 6, 28–32. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400311>
- Fallingborg, J., Christensen, L.A., Ingeman-Nielsen, M., Jacobsen, B.A., Abildgaard, K., Rasmussen, H.H., 1989. pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 3, 605–613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.1989.tb00254.x>

- Faure, S., Clère, N., Guerriaud, M., Plotkine, M., 2014. Bases fondamentales en pharmacologie sciences du médicament. Elsevier, Masson, Issy-les-Moulineaux.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., Huelsken, J., 2007. Wnt/ -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology* 27, 7551–7559. <https://doi.org/10.1128/MCB.01034-07>
- Fihn, B.M., Sjöqvist, A., Jodal, M., 2000. Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport. *Gastroenterology* 119, 1029–1036.
- Fletcher, S.J., Rappoport, J.Z., 2009. The role of vesicle trafficking in epithelial cell motility. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 1072–1076. <https://doi.org/10.1042/BST0371072>
- Forsgård, R.A., Korpela, R., Stenman, L.K., Österlund, P., Holma, R., 2014. Deoxycholic acid induced changes in electrophysiological parameters and macromolecular permeability in murine small intestine with and without functional enteric nervous system plexuses. *Neurogastroenterology & Motility* 26, 1179–1187. <https://doi.org/10.1111/nmo.12383>
- Furness, J.B., Callaghan, B.P., Rivera, L.R., Cho, H.-J., 2014. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv. Exp. Med. Biol.* 817, 39–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., Tsukita, S., 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* 156, 1099–1111. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110122>
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S., 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.* 127, 1617–1626.
- Galligan, J.J., Petersen, D.R., 2012. The human protein disulfide isomerase gene family. *Human Genomics* 6, 6. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-6-6>
- Gaucher, C., Boudier, A., Dahboul, F., Parent, M., Leroy, P., 2012. S-nitrosation/Denitrosation in Cardiovascular Pathologies: Facts and Concepts for the Rational Design of S-nitrosothiols. *Current Pharmaceutical Design* 19, 458–472. <https://doi.org/10.2174/13816128130312>
- Getsios, S., Huen, A.C., Green, K.J., 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 271–281. <https://doi.org/10.1038/nrm1356>
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., 2006. Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. *J Fluoresc* 16, 119–139. <https://doi.org/10.1007/s10895-005-0030-3>
- Gookin, J.L., Duckett, L.L., Armstrong, M.U., Stauffer, S.H., Finnegan, C.P., Murtaugh, M.P., Argenzio, R.A., 2004. Nitric oxide synthase stimulates prostaglandin synthesis and barrier function in *C. parvum*-infected porcine ileum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287, G571–G581. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00413.2003>
- Gookin, J.L., Rhoads, J.M., Argenzio, R.A., 2002. Inducible nitric oxide synthase mediates early epithelial repair of porcine ileum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 283, G157–G168. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00005.2001>
- Green, L.S., Chun, L.E., Patton, A.K., Sun, X., Rosenthal, G.J., Richards, J.P., 2012. Mechanism of Inhibition for N6022, a First-in-Class Drug Targeting S - Nitrosoglutathione Reductase. *Biochemistry* 51, 2157–2168. <https://doi.org/10.1021/bi201785u>
- Greenspon, J., Li, R., Xiao, L., Rao, J.N., Sun, R., Strauch, E.D., Shea-Donohue, T., Wang, J.-Y., Turner, D.J., 2011. Sphingosine-1-Phosphate Regulates the Expression of Adherens Junction Protein E-Cadherin and Enhances Intestinal Epithelial Cell Barrier

- Function. *Digestive Diseases and Sciences* 56, 1342–1353.
<https://doi.org/10.1007/s10620-010-1421-0>
- Groschwitz, K.R., Hogan, S.P., 2009. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124, 3–20.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- Gross, A., Pack, L.A.P., Schacht, G.M., Kant, S., Ungewiss, H., Meir, M., Schlegel, N., Preisinger, C., Boor, P., Guldiken, N., Krusche, C.A., Sellge, G., Trautwein, C., Waschke, J., Heuser, A., Leube, R.E., Strnad, P., 2018. Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury. *Mucosal Immunology* 11, 1630–1639. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0062-z>
- Guo, X., Rao, J.N., Liu, L., Zou, T.-T., Turner, D.J., Bass, B.L., Wang, J.-Y., 2003. Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285, C1174–C1187. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00015.2003>
- Haiyan, Y., Romain, S., Anne, S., Patrick, C., Pierre, L., 2018. Comparison between two derivatization methods of nitrite ion labeled with ¹⁵N applied to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* 10, 3830–3836.
<https://doi.org/10.1039/C8AY01206G>
- Han, T., Tang, Y., Li, Jing, Xue, B., Gong, L., Li, Jingxin, Yu, X., Liu, C., 2017. Nitric oxide donor protects against acetic acid-induced gastric ulcer in rats via S-nitrosylation of TRPV1 on vagus nerve. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02275-1>
- Hanigan, M.H., Frierson, H.F., 1996. Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 44, 1101–1108. <https://doi.org/10.1177/44.10.8813074>
- Hara, A., Endo, S., Matsunaga, T., El-Kabbani, O., Miura, T., Nishinaka, T., Terada, T., 2017. Human carbonyl reductase 1 participating in intestinal first-pass drug metabolism is inhibited by fatty acids and acyl-CoAs. *Biochemical Pharmacology* 138, 185–192.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.023>
- Harrison, O.J., Brasch, J., Lasso, G., Katsamba, P.S., Ahlsen, G., Honig, B., Shapiro, L., 2016. Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 7160–7165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606272113>
- Hauso, Ø., Martinsen, T.C., Waldum, H., 2015. 5-Aminosalicylic acid, a specific drug for ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 50, 933–941.
<https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1018937>
- Häussinger, D., Ahrens, T., Sass, H.-J., Pertz, O., Engel, J., Grzesiek, S., 2002. Calcium-dependent homoassociation of E-cadherin by NMR spectroscopy: changes in mobility, conformation and mapping of contact regions. *J. Mol. Biol.* 324, 823–839.
- Hayashi, M., Tomita, M., 2007. Mechanistic Analysis for Drug Permeation Through Intestinal Membrane. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 22, 67–77.
<https://doi.org/10.2133/dmpk.22.67>
- Heinrich, T.A., da Silva, R.S., Miranda, K.M., Switzer, C.H., Wink, D.A., Fukuto, J.M., 2013. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology: NO chemical biology and terminology. *British Journal of Pharmacology* 169, 1417–1429.
<https://doi.org/10.1111/bph.12217>
- Helander, H.F., Fändriks, L., 2014. Surface area of the digestive tract - revisited. *Scand. J. Gastroenterol.* 49, 681–689. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
- Heyman, M., Desjeux, J.F., 2006. Cytokine-Induced Alteration of the Epithelial Barrier to Food Antigens in Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 915, 304–311. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05258.x>
- Hooper, L.V., Macpherson, A.J., 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* 10, 159–169.
<https://doi.org/10.1038/nri2710>

- Huber, A.H., Weis, W.I., 2001. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105, 391–402.
- Hunter, R.A., Privett, B.J., Henley, W.H., Breed, E.R., Liang, Z., Mittal, R., Yoseph, B.P., McDunn, J.E., Burd, E.M., Coopersmith, C.M., Ramsey, J.M., Schoenfisch, M.H., 2013. Microfluidic amperometric sensor for analysis of nitric oxide in whole blood. *Anal. Chem.* 85, 6066–6072. <https://doi.org/10.1021/ac400932s>
- Ignarro, L.J., 2000. Nitric oxide biology and pathobiology. Academic Press, San Diego.
- Iida, K.I., Miyaishi, O., Iwata, Y., Kozaki, K.I., Matsuyama, M., Saga, S., 1996. Distinct distribution of protein disulfide isomerase family proteins in rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 751–759.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., Tsukita, S., 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* 147, 1351–1363.
- Ivanov, A.I., Naydenov, N.G., 2013. Dynamics and Regulation of Epithelial Adherens Junctions, in: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 27–99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407697-6.00002-7>
- Jensen, G.C., Zheng, Z., Meyerhoff, M.E., 2013. Amperometric nitric oxide sensors with enhanced selectivity over carbon monoxide via platinum oxide formation under alkaline conditions. *Anal. Chem.* 85, 10057–10061. <https://doi.org/10.1021/ac402633t>
- Jimison, L.H., Tria, S.A., Khodagholy, D., Gurfinkel, M., Lanzarini, E., Hama, A., Malliaras, G.G., Owens, R.M., 2012. Measurement of Barrier Tissue Integrity with an Organic Electrochemical Transistor. *Adv. Mater.* 24, 5919–5923. <https://doi.org/10.1002/adma.201202612>
- Jobgen, W.S., Jobgen, S.C., Li, H., Meininger, C.J., Wu, G., 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 851, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.018>
- Jones, D.P., 2002. [11] Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 93–112. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)48630-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)48630-2)
- Kaji, N., Horiguchi, K., Iino, S., Nakayama, S., Ohwada, T., Otani, Y., Firman, Murata, T., Sanders, K.M., Ozaki, H., Hori, M., 2016. Nitric oxide-induced oxidative stress impairs pacemaker function of murine interstitial cells of Cajal during inflammation. *Pharmacological Research* 111, 838–848. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.030>
- Kauffman, A.L., Gyurdieva, A.V., Mabus, J.R., Ferguson, C., Yan, Z., Hornby, P.J., 2013. Alternative functional in vitro models of human intestinal epithelia. *Frontiers in Pharmacology* 4. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00079>
- Khan, M., Sakakima, H., Dhammu, T.S., Shunmugavel, A., Im, Y.-B., Gilg, A.G., Singh, A.K., Singh, I., 2011. S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms of neurorepair following traumatic brain injury in rats. *J Neuroinflammation* 8, 78. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-78>
- Kim, Y.S., Ho, S.B., 2010. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Current Gastroenterology Reports* 12, 319–330. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0131-2>
- Klunder, L.J., Faber, K.N., Dijkstra, G., van IJendoorn, S.C.D., 2017. Mechanisms of Cell Polarity–Controlled Epithelial Homeostasis and Immunity in the Intestine. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9, a027888. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027888>
- Koch, A.W., Pokutta, S., Lustig, A., Engel, J., 1997. Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry* 36, 7697–7705. <https://doi.org/10.1021/bi9705624>
- Kochar, N.I., Chandewal, A.V., Bakal, R.L., Kochar, P.N., 2011. Nitric Oxide and the Gastrointestinal Tract. *International Journal of Pharmacology* 7, 31–39. <https://doi.org/10.3923/ijp.2011.31.39>
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T., 1998. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent

- Indicators: Diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* 70, 2446–2453.
<https://doi.org/10.1021/ac9801723>
- Kolios, G., Valatas, V., Ward, S.G., 2004. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* 113, 427–437.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01984.x>
- Konishi, Y., Shimizu, M., 2003. Transepithelial Transport of Ferulic Acid by Monocarboxylic Acid Transporter in Caco-2 Cell Monolayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67, 856–862. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.856>
- Kottke, M.D., Delva, E., Kowalczyk, A.P., 2006. The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J. Cell. Sci.* 119, 797–806. <https://doi.org/10.1242/jcs.02888>
- Kourtidis, A., Ngok, S.P., Anastasiadis, P.Z., 2013. p120 Catenin, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 409–432.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2>
- Kowalczyk, A.P., Green, K.J., 2013. Structure, Function, and Regulation of Desmosomes, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 95–118.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4>
- Kratz, J., Schneider, N., Caon, T., R. Teixeira, M., Mascarello, A., Nunes, R., Koester, L., Simões, C., 2013. Evaluation of In Vitro Intestinal and Cutaneous Permeability of Pentyl Gallate. *Lat Am J Pharm* 30, 1508–1515.
- Lal-Nag, M., Morin, P.J., 2009. The claudins. *Genome Biology* 10, 235.
<https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-8-235>
- Lash, L.H., Qian, W., Putt, D.A., Jacobs, K., Elfarra, A.A., Krause, R.J., Parker, J.C., 1998. Glutathione conjugation of trichloroethylene in rats and mice: sex-, species-, and tissue-dependent differences. *Drug Metab. Dispos.* 26, 12–19.
- Laukoetter, M.G., Nava, P., Lee, W.Y., Severson, E.A., Capaldo, C.T., Babbitt, B.A., Williams, I.R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J.A., Dermody, T.S., Nusrat, A., Parkos, C.A., 2007. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J. Exp. Med.* 204, 3067–3076. <https://doi.org/10.1084/jem.20071416>
- Lee, L.-Y., Wu, C.-M., Wang, C.-C., Yu, J.-S., Liang, Y., Huang, K.-H., Lo, C.-H., Hwang, T.-L., 2008. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer and their relation to claudin-4 expression. *Histol. Histopathol.* 23, 515–521.
<https://doi.org/10.14670/HH-23.515>
- Legen, I., Kristl, A., 2003. pH and energy dependent transport of ketoprofen across rat jejunum in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 56, 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00039-0)
- Leithner, K., Grabovac, V., Albrecht, K., Hombach, J., Klima, G., Bernkop-Schnürch, A., 2011. Permeation studies on freshly excised rat gastric mucosa: influence of pH. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 37, 518–525.
<https://doi.org/10.3109/03639045.2010.527348>
- Lennernas, H., 2007. Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 1103–1120. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.016>
- Li, H., Jin, H.-E., Shim, W.-S., Shim, C.-K., 2013. An improved prediction of the human *in vivo* intestinal permeability and BCS class of drugs using the *in vitro* permeability ratio obtained for rat intestine using an Ussing chamber system. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 39, 1515–1522.
<https://doi.org/10.3109/03639045.2012.714787>
- Li, Z., Zhang, X., Zhou, H., Liu, W., Li, J., 2016. Exogenous S-nitrosoglutathione attenuates inflammatory response and intestinal epithelial barrier injury in endotoxemic rats: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 80, 977–984.
<https://doi.org/10.1097/TA.0000000000001008>
- Linder, M.C., Zerounian, N.R., Moriya, M., Malpe, R., 2003. Iron and copper homeostasis and intestinal absorption using the Caco2 cell model. *Biometals* 16, 145–160.

- Liu, T., Yan, Q.-L., Feng, L., Ma, X.-C., Tian, X.-G., Yu, Z.-L., Ning, J., Huo, X.-K., Sun, C.-P., Wang, C., Cui, J.-N., 2018. Isolation of γ -Glutamyl-Transferase Rich-Bacteria from Mouse Gut by a Near-Infrared Fluorescent Probe with Large Stokes Shift. *Anal. Chem.* 90, 9921–9928. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02118>
- Macierzanka, A., Mackie, A.R., Krupa, L., 2019. Permeability of the small intestinal mucus for physiologically relevant studies: Impact of mucus location and ex vivo treatment. *Sci Rep* 9, 17516. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53933-5>
- Manichanh, C., Borrueal, N., Casellas, F., Guarner, F., 2012. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 599–608. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.152>
- Manukhina, E.B., Smirin, B.V., Malyshev, I.Yu., Stoclet, J.-C., Muller, B., Solodkov, A.P., Shebeko, V.I., Vanin, A.F., 2002. [No title found]. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences* 29, 477–486. <https://doi.org/10.1023/A:1020465810586>
- Marín, N., Zamorano, P., Carrasco, R., Mujica, P., González, F.G., Quezada, C., Meininger, C.J., Boric, M.P., Durán, W.N., Sánchez, F.A., 2012. S-Nitrosation of β -Catenin and p120 Catenin: A Novel Regulatory Mechanism in Endothelial Hyperpermeability. *Circ Res* 111, 553–563. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.274548>
- Markov, A.G., Vishnevskaya, O.N., Okorokova, L.S., Fedorova, A.A., Kruglova, N.M., Rybalchenko, O.V., Aschenbach, J.R., Amasheh, S., 2019. Cholera toxin perturbs the paracellular barrier in the small intestinal epithelium of rats by affecting claudin-2 and tricellulin. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 471, 1183–1189. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02294-z>
- Marozkina, N.V., Gaston, B., 2012. S-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1820, 722–729. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.017>
- Meckenstock, R.U., Haderlein, S.B., Schmidt, T.C., Zwank, L., Elsner, M., Berg, M., 2004. Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 283–300. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2350-y>
- Mehta, S., Nijhuis, A., Kumagai, T., Lindsay, J., Silver, A., 2015. Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ β -catenin) in inflammatory bowel disease. *Cell and Tissue Research* 360, 749–760. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1994-6>
- Meister, A., Tate, S.S., Griffith, O.W., 1981. Gamma-glutamyl transpeptidase. *Meth. Enzymol.* 77, 237–253.
- Meng, M., Klingensmith, N.J., Coopersmith, C.M., 2017. New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure. *Curr Opin Crit Care* 23, 143–148. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000386>
- Menon, R.M., Barr, W.H., 2003. Comparison of ceftibuten transport across Caco-2 cells and rat jejunum mounted on modified ussing chambers. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 24, 299–308. <https://doi.org/10.1002/bdd.366>
- Mineo, H., Amano, M., Chiji, H., Shigematsu, N., Tomita, F., Hara, H., 2004. Indigestible disaccharides open tight junctions and enhance net calcium, magnesium, and zinc absorption in isolated rat small and large intestinal epithelium. *Dig. Dis. Sci.* 49, 122–132.
- Mineo, H., Hara, H., Shigematsu, N., Okuhara, Y., Tomita, F., 2002. Melibiose, difructose anhydride III and difructose anhydride IV enhance net calcium absorption in rat small and large intestinal epithelium by increasing the passage of tight junctions in vitro. *J. Nutr.* 132, 3394–3399. <https://doi.org/10.1093/jn/132.11.3394>
- Mittal, R., Coopersmith, C.M., 2014. Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends Mol Med* 20, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.08.004>
- Moriez, R., Salvador-Cartier, C., Theodorou, V., Fioramonti, J., Eutamene, H., Bueno, L., 2005. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption

- of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am. J. Pathol.* 167, 1071–1079. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61196-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61196-0)
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 511–516.
- Mutlib, A., Lam, W., Atherton, J., Chen, H., Galatsis, P., Stolle, W., 2005. Application of stable isotope labeled glutathione and rapid scanning mass spectrometers in detecting and characterizing reactive metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3482–3492. <https://doi.org/10.1002/rcm.2223>
- Natarajan, K., Abraham, P., 2016. Methotrexate administration induces differential and selective protein tyrosine nitration and cysteine nitrosylation in the subcellular organelles of the small intestinal mucosa of rats. *Chemico-Biological Interactions* 251, 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.032>
- Nava, P., Laukoetter, M.G., Hopkins, A.M., Laur, O., Gerner-Smidt, K., Green, K.J., Parkos, C.A., Nusrat, A., 2007. Desmoglein-2: A Novel Regulator of Apoptosis in the Intestinal Epithelium. *Molecular Biology of the Cell* 18, 4565–4578. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0426>
- Nekrasova, O., Green, K.J., 2013. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol.* 23, 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.06.004>
- Netter, F.H., 2019. *Atlas of human anatomy*. Elsevier, Philadelphia.
- Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., 2017. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet* 390, 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Noach, A.B.J., Kurosaki, Y., Blom-Roosemalen, M.C.M., de Boer, A.G., Breimer, D.D., 1993. Cell-polarity dependent effect of chelation on the paracellular permeability of confluent caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics* 90, 229–237. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90195-L](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90195-L)
- Noth, R., Lange-Grumfeld, J., Stüber, E., Kruse, M.-L., Ellrichmann, M., Häslner, R., Hampe, J., Bewig, B., Rosenstiel, P., Schreiber, S., Arlt, A., 2011. Increased intestinal permeability and tight junction disruption by altered expression and localization of occludin in a murine graft versus host disease model. *BMC Gastroenterol* 11, 109. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-109>
- Nunbhakdi-Craig, V., Machleidt, T., Ogris, E., Bellotto, D., White, C.L., Sontag, E., 2002. Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J. Cell Biol.* 158, 967–978. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206114>
- Oliveira-Paula, G.H., Tanus-Santos, J.E., 2019. Nitrite-stimulated Gastric Formation of S-nitrosothiols As An Antihypertensive Therapeutic Strategy. *CDT* 20, 431–443. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180816120816>
- Orlowski, M., Meister, A., 1963. Gamma-Glutamyl-Rho-Nitroanilide - a New Convenient Substrate for Determination and Study of L- and D-Gamma-Glutamyltranspeptidase Activities. *Biochimica Et Biophysica Acta* 73, 679–.
- Ozeki, K., Kato, M., Sakurai, Y., Ishigai, M., Kudo, T., Ito, K., 2015. Evaluation of the appropriate time range for estimating the apparent permeability coefficient (Papp) in a transcellular transport study. *International Journal of Pharmaceutics* 495, 963–971. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.035>
- Palumbo, P., Picchini, U., Beck, B., van Gelder, J., Delbar, N., DeGaetano, A., 2008. A general approach to the apparent permeability index. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 35, 235–248. <https://doi.org/10.1007/s10928-008-9086-4>
- Parent, M., Boudier, A., Perrin, J., Vigneron, C., Maincent, P., Violle, N., Bisson, J.-F., Lartaud, I., Dupuis, F., 2015. In Situ Microparticles Loaded with S-Nitrosoglutathione

- Protect from Stroke. PLoS ONE 10, e0144659.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144659>
- Parent, Marianne, Dahboul, F., Schneider, R., Clarot, I., Maincent, P., Leroy, P., Boudier, A., 2013. A Complete Physicochemical Identity Card of S-nitrosoglutathione. *Current Pharmaceutical Analysis* 9, 31–42. <https://doi.org/10.2174/1573412911309010006>
- Parent, M., Dupuis, F., Maincent, P., Vigneron, C., Leroy, P., Boudier, A., 2013. Quel avenir en thérapeutique cardiovasculaire pour le monoxyde d’azote et ses dérivés ? *Annales Pharmaceutiques Françaises* 71, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2012.12.004>
- Park, J.W., Lee, C.-M., Cheng, J.S., Morgan, E.T., 2018. Posttranslational regulation of CYP2J2 by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 121, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.576>
- Park, S.-W., Zhen, G., Verhaeghe, C., Nakagami, Y., Nguyenvu, L.T., Barczak, A.J., Killeen, N., Erle, D.J., 2009. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 6950–6955. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808722106>
- Parodi, O., De Maria, R., Roubina, E., 2007. Redox state, oxidative stress and endothelial dysfunction in heart failure: the puzzle of nitrate–thiol interaction: *Journal of Cardiovascular Medicine* 8, 765–774. <https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e32801194d4>
- Payros, D., Secher, T., Boury, M., Brehin, C., Ménard, S., Salvador-Cartier, C., Cuevas-Ramos, G., Watrin, C., Marcq, I., Nougayrède, J.-P., Dubois, D., Bedu, A., Garnier, F., Clermont, O., Denamur, E., Plaisancié, P., Theodorou, V., Fioramonti, J., Olier, M., Oswald, E., 2014. Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring’s intestinal homeostasis. *Gut Microbes* 5, 313–512. <https://doi.org/10.4161/gmic.28932>
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., Fuchs, E., 2003. Sticky Business. *Cell* 112, 535–548. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00108-9)
- Perrin-Sarrado, C., Pongas, M., Dahboul, F., Leroy, P., Pompella, A., Lartaud, I., 2016. Reduced Activity of the Aortic Gamma-Glutamyltransferase Does Not Decrease S-Nitrosoglutathione Induced Vasorelaxation of Rat Aortic Rings. *Front Physiol* 7, 630. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00630>
- Petersen, S.B., Nolan, G., Maher, S., Rahbek, U.L., Guldbrandt, M., Brayden, D.J., 2012. Evaluation of alkylmaltosides as intestinal permeation enhancers: Comparison between rat intestinal mucosal sheets and Caco-2 monolayers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47, 701–712. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.08.010>
- Peyrin-Biroulet, L., Bouhnik, Y., Roblin, X., Bonnaud, G., Hagège, H., Hébuterne, X., 2016. French national consensus clinical guidelines for the management of ulcerative colitis. *Digestive and Liver Disease* 48, 726–733. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2016.03.029>
- Pinheiro, L.C., Amaral, J.H., Ferreira, G.C., Portella, R.L., Ceron, C.S., Montenegro, M.F., Toledo, J.C., Tanus-Santos, J.E., 2015. Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension. *Free Radical Biology and Medicine* 87, 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.038>
- Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S.L., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G., Blasig, I.E., 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *The FASEB Journal* 22, 146–158. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8319com>
- Polentarutti, B.I., Peterson, A.L., Sjöberg, A.K., Anderberg, E.K., Utter, L.M., Ungell, A.L., 1999. Evaluation of viability of excised rat intestinal segments in the Ussing chamber: investigation of morphology, electrical parameters, and permeability characteristics. *Pharm. Res.* 16, 446–454.

- Pompella, A., Corti, A., Paolicchi, A., Giommarelli, C., Zunino, F., 2007. Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 7, 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.04.004>
- Potten, C.S., Owen, G., Booth, D., 2002. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J. Cell. Sci.* 115, 2381–2388.
- Punchard, N.A., Greenfield, S.M., Thompson, R.P.H., 1992. Mechanism of action of 5-aminosalicylic acid. *Mediators of Inflammation* 1, 151–165. <https://doi.org/10.1155/S0962935192000243>
- Riordan, J.F., 1977. The role of metals in enzyme activity. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 7, 119–129.
- Rocha, B.S., Correia, M.G., Fernandes, R.C., Gonçalves, J.S., Laranjinha, J., 2016. Dietary nitrite induces occludin nitration in the stomach. *Free Radical Research* 50, 1257–1264. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1234049>
- Rodrigues, S.F., Granger, D.N., 2015. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers* 3, e978720. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.978720>
- Rodriguez, J., Maloney, R.E., Rassaf, T., Bryan, N.S., Feelisch, M., 2003. Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 336–341. <https://doi.org/10.1073/pnas.0234600100>
- Rombeau, J.L., Takala, J. (Eds.), 1996. *Gut Dysfunction in Critical Illness, Update in Intensive Care and Emergency Medicine*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-80224-9>
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Munemitsu, S., Polakis, P., 1995. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J. Biol. Chem.* 270, 5549–5555.
- Ruhl, A., Nasser, Y., Sharkey, K.A., 2004. Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil* 16, 44–49. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00474.x>
- Salim, S.Y., Söderholm, J.D., 2011. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases: *Inflammatory Bowel Diseases* 17, 362–381. <https://doi.org/10.1002/ibd.21403>
- Sánchez, F.A., Ehrenfeld, I.P., Durán, W.N., 2013. S-nitrosation of proteins: An emergent regulatory mechanism in microvascular permeability and vascular function. *Tissue Barriers* 1, e23896. <https://doi.org/10.4161/tisb.23896>
- Sansonetti, P.J., 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology* 4, 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1499>
- Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., Sofroniew, M.V., 2007. Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132, 1344–1358. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.051>
- Saxena, N., Won, J., Choi, S., Singh, A.K., Singh, I., 2018. S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) inhibitor as an immune modulator in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Free Radical Biology and Medicine* 121, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.558>
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 1191–1212. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4)
- Schiele, F., Artur, Y., Bagrel, D., Petitclerc, C., Siest, G., 1981. Measurement of plasma gamma-glutamyltransferase in clinical chemistry: kinetic basis and standardisation propositions. *Clinica Chimica Acta* 112, 187–195. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(81\)90377-6](https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90377-6)
- Schneider, M.R., Dahlhoff, M., Horst, D., Hirschi, B., Trülzsch, K., Müller-Höcker, J., Vogelmann, R., Allgäuer, M., Gerhard, M., Steininger, S., Wolf, E., Kolligs, F.T., 2010. A Key Role for E-cadherin in Intestinal Homeostasis and Paneth Cell Maturation. *PLoS ONE* 5, e14325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014325>

- Schroeder, B.O., 2019. Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterology Report* 7, 3–12. <https://doi.org/10.1093/gastro/goy052>
- Schulzke, J.D., Gitter, A.H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., Saitou, M., Tsukita, S., Fromm, M., 2005. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1669, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.01.008>
- Shah, C.M., Bell, S.E., Locke, I.C., Chowdrey, H.S., Gordge, M.P., 2007. Interactions between cell surface protein disulphide isomerase and S-nitrosoglutathione during nitric oxide delivery. *Nitric Oxide* 16, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.08.001>
- Shah, K.U., Shah, S.U., Dilawar, N., Khan, G.M., Gibaud, S., 2017. Thiomers and their potential applications in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 14, 601–610. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1227787>
- Shen, W., Matsui, T., 2019. Intestinal absorption of small peptides: a review. *Int J Food Sci Technol* 54, 1942–1948. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14048>
- Shen, Z., Mannion, A., Whary, M.T., Muthupalani, S., Sheh, A., Feng, Y., Gong, G., Vandamme, P., Holcombe, H.R., Paster, B.J., Fox, J.G., 2016. *Helicobacter saguini*, a Novel *Helicobacter* Isolated from Cotton-Top Tamarins with Ulcerative Colitis, Has Proinflammatory Properties and Induces Typhlocolitis and Dysplasia in Gnotobiotic IL-10^{-/-} Mice. *Infect. Immun.* 84, 2307–2316. <https://doi.org/10.1128/IAI.00235-16>
- Shin, S., Fung, H.-L., 2011a. Evaluation of an LC-MS/MS assay for ¹⁵N-nitrite for cellular studies of L-arginine action. *J Pharm Biomed Anal* 56, 1127–1131. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.08.017>
- Shin, S., Fung, H.-L., 2011b. Evaluation of an LC-MS/MS assay for ¹⁵N-nitrite for cellular studies of L-arginine action. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56, 1127–1131. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.08.017>
- Sliskovic, I., Raturi, A., Mutus, B., 2005. Characterization of the S-Denitrosation Activity of Protein Disulfide Isomerase. *Journal of Biological Chemistry* 280, 8733–8741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408080200>
- Smalley-Freed, W.G., Efimov, A., Burnett, P.E., Short, S.P., Davis, M.A., Gumucio, D.L., Washington, M.K., Coffey, R.J., Reynolds, A.B., 2010. p120-catenin is essential for maintenance of barrier function and intestinal homeostasis in mice. *Journal of Clinical Investigation* 120, 1824–1835. <https://doi.org/10.1172/JCI41414>
- Smith, J.N., Dasgupta, T.P., 2000. Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by L-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide* 4, 57–66. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0272>
- Spindler, V., Meir, M., Vigh, B., Flemming, S., Hütz, K., Germer, C.-T., Waschke, J., Schlegel, N., 2015. Loss of Desmoglein 2 Contributes to the Pathogenesis of Crohn's Disease: *Inflammatory Bowel Diseases* 1. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000486>
- Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., Hickman, J.J., 2015. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *Journal of Laboratory Automation* 20, 107–126. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>
- Staab, C.A., Hartmanová, T., El-Hawari, Y., Ebert, B., Kisiela, M., Wsol, V., Martin, H.-J., Maser, E., 2011. Studies on reduction of S-nitrosoglutathione by human carbonyl reductases 1 and 3. *Chemico-Biological Interactions* 191, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.01.016>
- Sun, X., Wasley, J.W.F., Qiu, J., Blonder, J.P., Stout, A.M., Green, L.S., Strong, S.A., Colagiovanni, D.B., Richards, J.P., Mutka, S.C., Chun, L., Rosenthal, G.J., 2011. Discovery of S-Nitrosoglutathione Reductase Inhibitors: Potential Agents for the Treatment of Asthma and Other Inflammatory Diseases. *ACS Med. Chem. Lett.* 2, 402–406. <https://doi.org/10.1021/ml200045s>

- Takanaga, H., Tamai, I., Tsuji, A., 1994. pH-Dependent and Carrier-mediated Transport of Salicylic Acid Across Caco-2 Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46, 567–570. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03858.x>
- Tate, S., Meister, A., 1978. Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 4806–4809.
- Thibeault, S., Rautureau, Y., Oubaha, M., Faubert, D., Wilkes, B.C., Delisle, C., Gratton, J.-P., 2010. S-Nitrosylation of β -Catenin by eNOS-Derived NO Promotes VEGF-Induced Endothelial Cell Permeability. *Molecular Cell* 39, 468–476. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.013>
- Thomson, A., Smart, K., Somerville, M.S., Lauder, S.N., Appanna, G., Horwood, J., Sunder Raj, L., Srivastava, B., Durai, D., Scurr, M.J., Keita, A.V., Gallimore, A.M., Godkin, A., 2019. The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease. *BMC Gastroenterol* 19, 98. <https://doi.org/10.1186/s12876-019-1002-4>
- Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Daniel, J.M., Ireton, R.C., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hummingbird, D.K., Reynolds, A.B., 2000. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J. Cell Biol.* 148, 189–202.
- Tønnesen, H.H., Karlsen, J., 2002. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28, 621–630. <https://doi.org/10.1081/DDC-120003853>
- Treuer, A.V., Gonzalez, D.R., 2015. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities (Review). *Molecular Medicine Reports* 11, 1555–1565. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2968>
- Tsuji, A., Takanaga, H., Tamai, I., Terasaki, T., 1994. [No title found]. *Pharmaceutical Research* 11, 30–37. <https://doi.org/10.1023/A:1018933324914>
- Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M., 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285–293. <https://doi.org/10.1038/35067088>
- Turksen, K., Troy, T.-C., 2004. Barriers built on claudins. *J. Cell. Sci.* 117, 2435–2447. <https://doi.org/10.1242/jcs.01235>
- Turner, J.R., 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 799–809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
- Turner, J.R., 2000. Show me the pathway! Regulation of paracellular permeability by Na(+)-glucose cotransport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41, 265–281.
- Turner, J.R., Rill, B.K., Carlson, S.L., Carnes, D., Kerner, R., Mrsny, R.J., Madara, J.L., 1997. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 273, C1378-1385.
- Uchiyama, T., Sugiyama, T., Quan, Y.S., Kotani, A., Okada, N., Fujita, T., Muranishi, S., Yamamoto, A., 1999. Enhanced permeability of insulin across the rat intestinal membrane by various absorption enhancers: their intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of n-lauryl-beta-D-maltopyranoside. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 1241–1250.
- Ulluwishewa, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Wells, J.M., Roy, N.C., 2011. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *The Journal of Nutrition* 141, 769–776. <https://doi.org/10.3945/jn.110.135657>
- Ungell, A.L., Nylander, S., Bergstrand, S., Sjöberg, A., Lennernäs, H., 1998. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *J Pharm Sci* 87, 360–366. <https://doi.org/10.1021/js970218s>
- Ungewiß, H., Vielmuth, F., Suzuki, S.T., Maiser, A., Harz, H., Leonhardt, H., Kugelmann, D., Schlegel, N., Waschke, J., 2017. Desmoglein 2 regulates the intestinal epithelial barrier via p38 mitogen-activated protein kinase. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06713-y>
- van de Kerkhof, E.G., Ungell, A.-L.B., Sjöberg, A.K., de Jager, M.H., Hilgendorf, C., de Graaf, I.A.M., Groothuis, G.M.M., 2006. Innovative Methods to Study Human

- Intestinal Drug Metabolism in Vitro: Precision-Cut Slices Compared with Ussing Chamber Preparations. *Drug Metabolism and Disposition* 34, 1893–1902. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.011148>
- van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J.N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J.M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J.D., Quaschnig, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V., Lüscher, T.F., 2000. Enhanced Peroxynitrite Formation Is Associated with Vascular Aging. *J Exp Med* 192, 1731–1744. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1731>
- Verma, V.V., Gupta, R., Goel, M., 2015. “Phylogenetic and evolutionary analysis of functional divergence among Gamma glutamyl transpeptidase (GGT) subfamilies.” *Biol Direct* 10, 49. <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0080-7>
- Volynets, V., Rings, A., Bárdos, G., Ostaff, M.J., Wehkamp, J., Bischoff, S.C., 2016. Intestinal barrier analysis by assessment of mucins, tight junctions, and α -defensins in healthy C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Tissue Barriers* 4, e1208468. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1208468>
- Wickham, S., West, M.B., Cook, P.F., Hanigan, M.H., 2011. Gamma-glutamyl compounds: Substrate specificity of gamma-glutamyl transpeptidase enzymes. *Analytical Biochemistry* 414, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.03.026>
- Wu, W., Gaucher, C., Fries, I., Hu, X., Maincent, P., Sapin-Minet, A., 2015. Polymer nanocomposite particles of S -nitrosoglutathione: A suitable formulation for protection and sustained oral delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 495, 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.074>
- Wu, W., Perrin-Sarrado, C., Ming, H., Lartaud, I., Maincent, P., Hu, X.-M., Sapin-Minet, A., Gaucher, C., 2016. Polymer nanocomposites enhance S -nitrosoglutathione intestinal absorption and promote the formation of releasable nitric oxide stores in rat aorta. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12, 1795–1803. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.05.006>
- Yamauchi, K., Rai, T., Kobayashi, K., Sohara, E., Suzuki, T., Itoh, T., Suda, S., Hayama, A., Sasaki, S., Uchida, S., 2004. Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4690–4694. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306924101>
- Yoo, B.B., Mazmanian, S.K., 2017. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity* 46, 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.011>
- Yu, H., Bonetti, J., Gaucher, C., Fries, I., Vernex-Loiset, L., Leroy, P., Chaimbault, P., 2019a. Higher-energy collision-induced dissociation for the quantification by liquid chromatography/tandem ion trap mass spectrometry of nitric oxide metabolites coming from S-nitroso-glutathione in an in vitro model of the intestinal barrier. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 33, 1–11. <https://doi.org/10.1002/rcm.8287>
- Yu, H., Chaimbault, P., Clarot, I., Chen, Z., Leroy, P., 2019b. Labeling nitrogen species with the stable isotope ^{15}N for their measurement by separative methods coupled with mass spectrometry: A review. *Talanta* 191, 491–503. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.011>
- Yu, H., Schmitt, R., Sapin, A., Chaimbault, P., Leroy, P., 2018. Comparison between two derivatization methods of nitrite ion labeled with ^{15}N applied to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* 10, 3830–3836. <https://doi.org/10.1039/C8AY01206G>
- Yu, Q., Wang, Z., Li, P., Yang, Q., 2013. The effect of various absorption enhancers on tight junction in the human intestinal Caco-2 cell line. *Drug Dev Ind Pharm* 39, 587–592. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.692376>
- Žakelj, S., Legen, I., Veber, M., Kristl, A., 2004. The influence of buffer composition on tissue integrity during permeability experiments “in vitro.” *International Journal of Pharmaceutics* 272, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.014>

Annexes

1. Liste des protocoles :

- 1) Ussing Chamber experiment (Harvard Apparatus®)
- 2) Measurement of sodium fluorescein permeability on Ussing chamber
- 3) Dosage du propranolol par CLHP à polarité de phases inversée couplée à une détection spectrofluorimétrique
- 4) Etude morphologique d'un tissu intestinal par coloration et observation microscopique
- 5) Purification of azo adduct and 2,3-naphthotriazole adduct by HPLC coupled with UV/Vis detection
- 6) Nitrite, nitrate ions and S-nitrosothiols measurement using 2,3-diaminonaphthalene assay by HPLC coupled with tandem mass spectrometry
- 7) Nitrite, nitrate ions and S-nitrosothiols measurement using 2,3-diaminonaphthalene assay by spectrofluorometry
- 8) Quantification of S-nitrosothiols in the rat intestine with 2,3-diaminonaphthalene assay by HPLC coupled with fluorescence detection
- 9) Measurement of γ -glutamyltransferase activity by spectrophotocolorimetry
- 10) Permeability studies of S-nitrosothiols in isolated rat intestine using Ussing chamber
- 11) Extraction and identification of intestinal proteins by western blot

APPROBATION	REDACTION	DATE
Anne SAPIN-MINET	Romain SCHMITT	25/06/2018

1. Principle of the method

The Ussing chamber was invented by the Danish zoologist and physiologist Hans Henriksen Ussing in 1946. It is an apparatus for measuring the transport of ions, nutrients or drugs across various epithelial tissues, barrier model with cells or synthetic membrane. It can detect and quantify transport and explore barrier functions of living tissue. Drug diffusion but also absorption process can be studied by this technique.

The basic design of a classical Ussing chamber is illustrated in Fig. 1. The membrane (tissue, cells or synthetic membrane) is oriented, vertically localized and separates 2 compartments (equal volume): a donor compartment (also referred to as the apical, mucosal or luminal-side membrane) and an acceptor compartment (also referred to as the basolateral, serosal, or “blood-side” membrane). Samples can be harvested in each compartment to determine for example permeability of a drug or membrane characteristics...

In the example of drug transport study across rat intestine barrier (the experiment type designed in the lab):

- the intestine tissue corresponds to the membrane, defining a luminal (donor) and a serosal (acceptor) compartments.
- in each compartment, solution is maintained in continuous circulation, 37°C with gas infusion (to preserve intestine tissue). Solution and gas composition are depending on the study (classically for our experiment, we use Krebs-Henselheit buffer and a gas mixed 95 % O₂ / 5 % CO₂, infused at 12 mL/min by peristaltic pump)
- controls of barrier integrity are performed systematically (transepithelial electrical resistance (TEER) measurements and transport evaluation of a fluorescent marker such as inulin-FITC, sodium fluorescein, propranolol...) during the experiment (quality criteria are mentioned below).

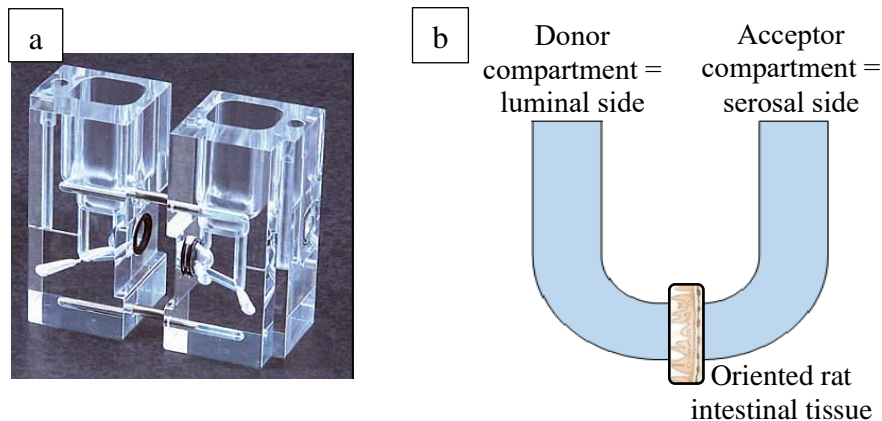


Figure 17: Ussing chamber (Harvard Apparatus, Physiologic Instruments) (a); Scheme of the Ussing chamber system (b)

2. Electrodes preparation (4% agarose / 3 M KCl) – the full preparation spends at least a half-day

Electrodes are necessary to measure the TransEpithelial Electrical Resistance (TEER): the use of a derivated Millicell-ERS apparatus (Millipore®), normally adapted to cell membrane resistance measurement, can give a tissue membrane resistance using alternative current. The impulsion of a fixed intensity and the measurement of voltage by the apparatus can give, by the physical rule $U = R \times I$, the resistance of any membrane (cell or tissue). This value is given directly by the Millicell-ERS apparatus.

2.1. Material

- Electrode Tips PK6/50 (ref Harvard apparatus: 69-0991; ref Physiologic Instruments P2023-50)
- 3 M KCl → prepared extemporaneously: Dissolve 11.175 g KCl ($M_r=74.55$; CARL ROTH; 6781.1) into 50 mL volumetric flask with ultrapure water ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$). Conserve it at 4°C for one month.
- 1 x Syringe 5 mL
- 1 x Syringe needle 21 G (or 23 G) (to transfer solution without any bubble)
- Agarose (ref.: A-9539, Sigma)
- Heating plate
- Crystallizer

- Temperature probe
- Beaker 5 mL
- Pipette 100 mL
- Empty tip box with 50 mL of 3 M KCl

2.2. Preparation

The preparation of the electrodes is a critical step and delicate experiment. At least half a day is necessary to prepare the 24 electrodes required for the experiment. It determined the quality of the TEER measurement.

Pre-heat water in a small crystallizer to 95°C-100°C on a heating plate (don't need to have a stirring).

Weight 96 mg of agarose in a 5-mL beaker, add 2.4 mL of 3 M KCl.

When the temperature reached 95-100°C, deposit the beaker in the crystallizer and wait for dissolution of the agarose powder (use a small magnetic stirrer if necessary, but normally not). Maintain the agarose in fusion during the electrode's preparation. Fix the electrode tip on a 100- μ L pipette, adjust the volume to 75 μ L. Then, aspirate agarose slowly, and avoid any air bubble: wait 10 seconds after having filled the tip and stay in the agarose of the beaker → it avoids bubble incoming in the tip.

Put the electrode tip in a tip box (previously filled with 50 mL of 3 M KCl) and fulfill the electrode tip with 3 M KCl, using a syringe and a needle (a long one, to be closed to the polymerized agarose).

Connect electrode tips to black (voltage) and white (intensity) electrodes, carefully to not destroy the agarose bridge in the tip. It can be necessary to use a syringe to add 3 M KCl if there is bubble, or if the electrode is not full.

Store the electrode tips in the box, at 4°C for 1 month.

Write the date of the preparation on the tip box and in the laboratory book.

Rq: Because 24 electrodes are required for the 6 chambers, this preparation must be done at least 2 times. More electrodes can be prepared (total \approx 35-40): the supplementary electrodes will be conserved at 4°C in the tip box with 3M KCl, in case of troubleshooting of the electrodes.

2.3. Electrodes renewing (every month)

To renew the “old” electrodes (after about one month of use):

- Put the old electrodes in a 200-mL beaker fulfilled with water,
- Heat the water to 95°C-100°C, directly on a heating plate (don't need to have a stirring),
- Up and down the electrode tips with a 100- μ L pipette to remove the agarose bridge and to empty the tips,
- Rinse the electrodes tips with distilled water at room temperature (up-down the tips with the 100- μ L pipette).

If the electrode tip is broken or cannot be used anymore, through it away in the plastic trash.

Empty tips can be air-dried and stored in a tip box at room temperature, without 3M KCl. After cleaning, the tips can be directly re-used to prepare new electrodes as mentioned in 2.2

3. Krebs-Henseleit buffer preparation

Krebs-Henseleit buffer was developed in the early 1930's by Hans Krebs and Kurt Henseleit. It is often used in *ex vivo* experiment to maintain the biological activity of tissue and in the majority of Ussing Chamber experiment ^{1,2}. Bicarbonate ions are used to maintain the pH and have a buffering effect all along the experiment, with a O₂/CO₂ (95/5%)⁴ supply.

3.1. Krebs-Henseleit stock solution preparation (should be prepared each week)

Powders are weighted in a plastic batch, and solutions are prepared in volumetric flasks (corresponding to the final volume, 4th column of following table). The solutions are then conserved **at 4°C in glass bottles**.

MW (g/mol)	Weight (g)	Volume (mL)	Concentration compared	Concentration (g/L)	Concentration (M)
---------------	---------------	----------------	---------------------------	------------------------	----------------------

		10X or 100X	ultrapure water (18,2 MΩ·cm)	with the final concentration used		
NaCl (Mr=58.44; ref: PROLABO 27810.364)	58	69	1000	10X	69	1.19
NaHCO ₃ (Mr=84.01; ref: PROLABO 27776.365)	84	20.2	1000	10X	20.2	0.24
KCl (Mr= 74.55; ref: CARL ROTH; 6781.1)	74.5	7	200	100X	35	0.47
MgSO ₄ (Mr=120.37; ref: SIGMA M2643)	120	2.8	200	100X	14	0.12
KH ₂ PO ₄ (Mr=136.09; ref: PROLABO 26 925.295)	136	3.2	200	100X	16	0.12
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Mr=147.02; ref: PROLABO analysis 22317.297)	147	4.7	200	100X	23.5	0.16

3.2. Krebs-Henseleit working solution preparation (should be prepared extemporaneously)

Calculation for 500 mL:

At least 30 min before the Ussing chamber experiment, mix stock solutions previously prepared as following (the order has no importance):

	Volume (mL)	Final concentration of the Kreb's solution (mM)
NaCl 10X	50	119
NaHCO ₃ 10X	50	24
KCl 100X	5	4.7
MgSO ₄ 100X	5	1.2
KH ₂ PO ₄ 100X	5	1.2
CaCl ₂ 100X	5	1.6
Glucose *	0.9g	10
milliQ water	380	

* Glucose is used as an energy source for cell or tissue maintenance.

After mixed, the buffer should be equilibrated with O₂/CO₂ (95/5%) for 30 minutes, then adjust pH with HCl to 7.4 (or another pH if it is required by the experimental scheme e.g. pH 5.5 for LPS study in Ussing chamber). After the pH adjustment, 100 mL of Krebs-Henseleit working solution is placed at 4°C for the tissue harvesting, the remaining buffer (400 mL) is placed in the water bath at 37°C for the experiment.

4. Ussing Chamber experiment

4.1. Material

- Ussing Chamber bench (Harvard Apparatus®) + heating water bath (Brookfield TC200) + circulating water bath (Lauda E100) + peristaltic pump (VC-MS/CA8-6, Ismatec®).
- Multimeter (Millicell-ERS, Millipore®)
- Box with prepared electrodes prepared as mentioned in §2.2
- 6 x Chamber inserts (ref P2404, for mouse intestine, Harvard Apparatus®)
- 2 x Syringe 10 mL
- 1 x Syringe needle 16 G

- 5-mL pipette
- Drug/testing solution (depending of the experiment)
- 200- μ L pipette
- 400 mL of 37°C Krebs-Henseleit buffer + 100 mL of ice-cold Krebs for intestine after its harvesting

4.2. Setting up

- Before all, switch on the water bath at least 30 min before the beginning of the experiment, to permit the Ussing system to reach 37°C: the heating water bath (Fig. 2a) should be setup at 37°C, the circulating water bath should be setup at 45°C (to heat the Ussing bench and reach 37°C in the chambers; Fig. 2b).

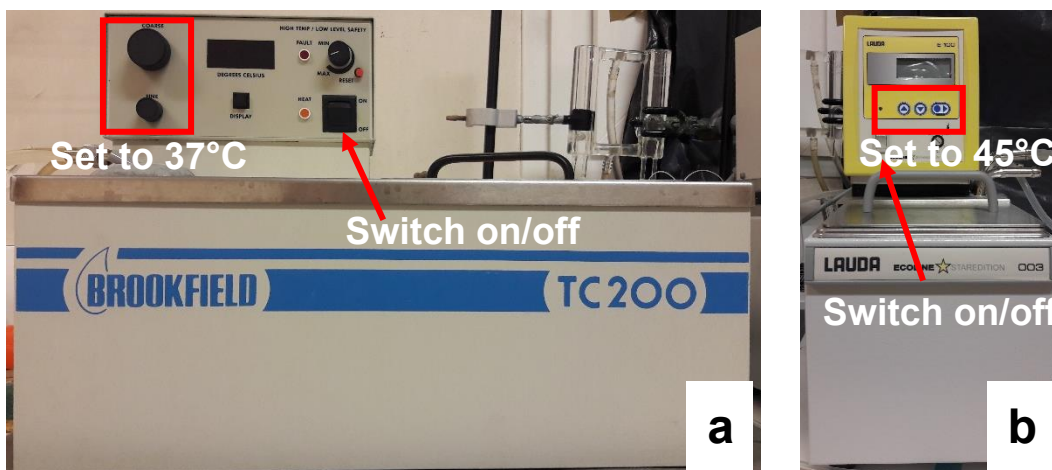


Figure 18: Heating water bath (a) and circulating water bath (b)

- Prepare Krebs-Henselheit working solution (500 mL) as mentioned in §3.2.
- The gas bottle should be opened to supply Krebs in O₂/CO₂ (big tap on the top), and then open the small tap on the manometer until the right mark (\approx 3 turns). The pressure can be followed on the manometer, to be sure that there is enough gas for the entire experiment. A tube goes from the gas bottle and arrive in an Erlenmeyer with a short volume of distilled water.
- After having added solution in the chamber's compartments and connected all the tubes, switch on both peristaltic pump (flow rate = 12 mL/min).

Rq: the flow rate of the pumps should be verified the day before: take a large container (as a dissection tray), fill it with tap water, take a volumetric cylinder and fill it with water also. Then, return the cylinder in the large container (without any

bubble). Introduce the tube connected to the gas bottle in the volumetric cylinder (bottom side), open the gas bottle and start to measure the time at the same moment. Wait one minute, close the gas bottle and stop the timer. Read the volume on the volumetric cylinder → The flow rate is the read volume per minute. This step should be done until 12 mL/min is reached.

4.3 Verification of electrodes quality, before the intestine tissue preparation:

- Set the chambers and the inserts (white part to the right) in the bench (Fig3 a, b)
- Connect gas tubes to each chamber, to corresponding left and right holes of chambers (Fig3 c, d)
- Insert electrodes to appropriate holes (black electrodes close to the tissue (voltage measurement); white electrodes (intensity impulse) in the most distant holes) (Fig. 3e, f)

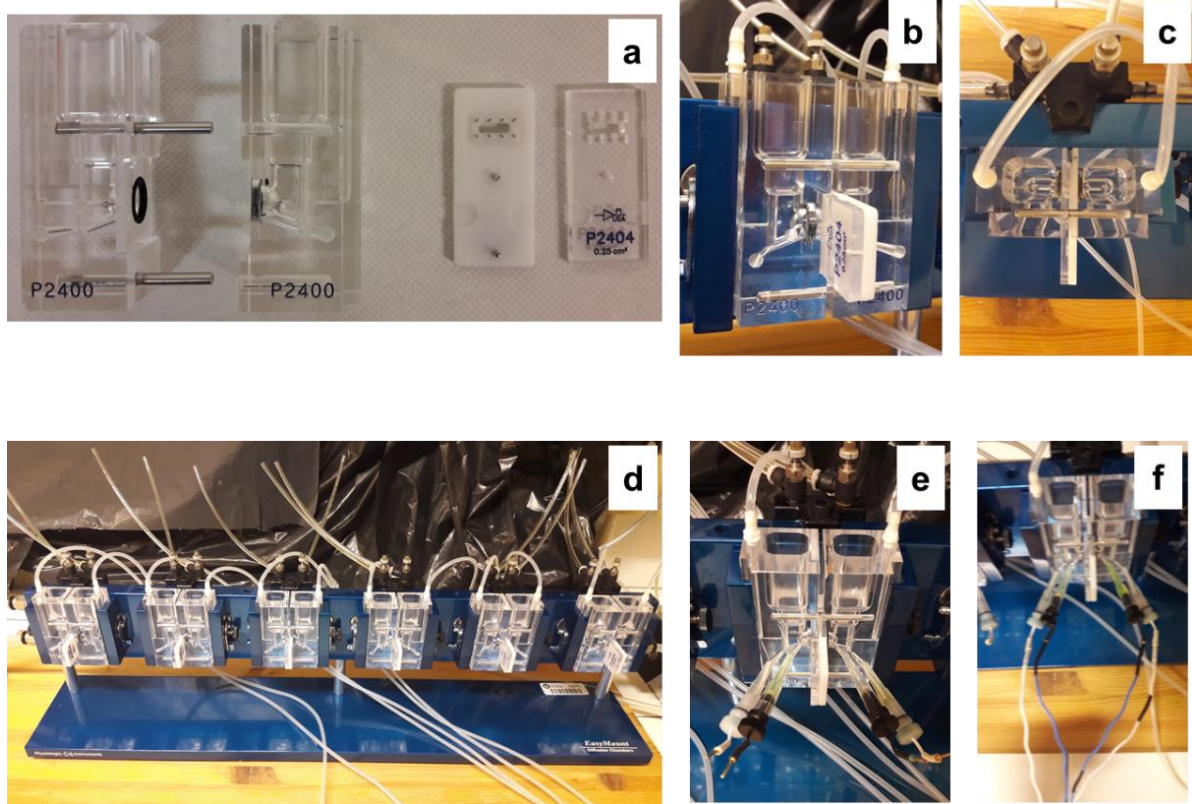


Figure 19: Setting of the Ussing chamber and inserts (a), placing inserts in the chambers (b), gas connections (c, d) and electrodes (e) with cables for TEER measurement (f)

- Add 2.5 mL of Krebs in each compartment (donor and acceptor) (Fig 4a)
- Connect the blue cable to the electrodes (in the order, left to right: full white cable, full blue cable, blue cable with black part, white cable with black part; connect the blue cable to the multimeter (Fig 4a, 4b). Switch on the left button of the multimeter
- Push the left button to read resistance for each chamber; value corresponds to blank value ($200 \pm 25 \Omega$) (Fig 4c)

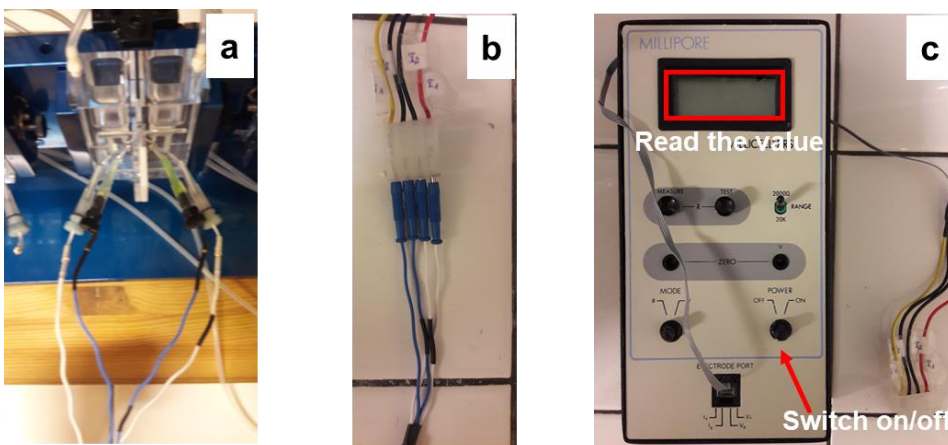


Figure 20: Measurement of TEER for blank values, from connecting blue cables for TEER measurements to the chambers (a), cables should be connected in a specific order (b) to multimeter (c)

Rq: If a wrong value during experiment:

- value different from expected: tissue integrity is affected; change the intestine fragment
- value < 0 ohm; or too high: apparatus will do a noise: Check current value:
 - If current is stable \rightarrow need to change WHITE electrodes
 - If current is unstable \rightarrow need to change BLACK electrodes

Remove holding device from the bench with the precaution to collect Krebs in garbage. Don't move the electrodes

5. Intestine tissue preparation

For current experiments, a rat intestine is adapted. However, other membranes as cells, mouse intestine or human biopsy can be included in the Ussing system: in these cases, the inserts and pins are different and should be adapted.

Furthermore, a tissue can be stripped before to be set in the Ussing system: it consists in removing the muscular layer part by carefully scratching the tissue.

Because this step is very delicate, we have chosen to not strip the tissue, to obtain a better experimental reproducibility.

5.1. Material

- Pentobarbital sodium (Ceva Santé Animale, 100 mL)
- 1 x Syringe 1 mL and 1 x syringe 10 mL
- 1 x Syringe needle 23G
- 1 x Dissecting tray
- Ice cold Krebs-Henselheit solution (prepared in ice bath)
- 2 x Petri dish
- A set of anatomical tools: blunt forceps, scissors, pins and corkboard

5.2. Protocol

Record all the information (species, gender, weight, serial number) of the rat which will be sacrificed in the users' book and in the official lab book. Cover the rat with a piece of cloth, then grasp the skin of rat's back. Anesthetize the rat with intraperitoneal injections (at lower left of rat's abdomen) of sodium pentobarbital (60 mg/kg).

Place the rat in a dissecting tray. To make the first cut (lengthwise) pinch some skin together on the abdomen and use the scissors to open the flesh.

Use the scissors to continue the cut as shown in Fig. 5a (only cut the part between line 2 and line 3 described in Fig. 5a), there are two layers you need to get through, skin and muscle.

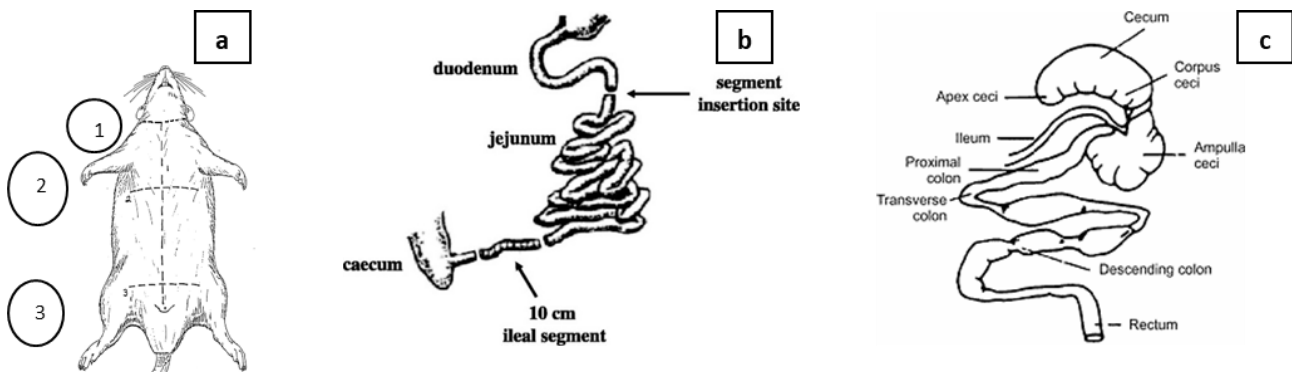


Figure 21: Rat dissection (a), Small intestine, right out of stomach-duodenum, middle section, jejunum, connects to cecum-ileum (b) and Large intestine, leaves cecum, connects to rectum and anus-colon (c)

Remove the intestine (Fig.5b and 5c) rapidly from the rat and harvest the selected part: duodenum (usually 2cm-6cm distance to the pylorus), jejunum (usually 10cm-14cm distance to the pylorus), ileum (usually 2cm-6cm distance before the cecum) and colon (usually 2cm-6cm distance after the cecum), put in a petri dish with 20 mL ice-cold Krebs buffer on ice.

Rq: Ileum is the selected parts of intestine we use; 20 cm fragment of intestine from 3 cm before cecum is harvested, avoiding Payer patches, placed in a petri dish with about 20 mL of 4 °C Krebs buffer and conserved in ice bath.

- Remove the fat tissue along the mesenteric attachment.
- Open the intestine segment longitudinally along the mesenteric attachment remains so that the mucosa which is likely to undergo less excision damage.
- Rinse the luminal contents from the intestinal segment with Krebs buffer.

Warning: to get a good viability, the preparation should be completed within 15 minutes after the tissue is removed from rat.

- Mount the intestine as a flat sheet on pins of the half-insert of the tissue holding device and fit to the opposing insert (Fig. 6). Pay attention to the luminal and serosal sides.



Figure 22: The intestine has to be mounted on pins of the serosal half of the Ussing chamber insert.

- Fit the tissue insert between the two parts of the Ussing chamber, and close tightly with the screw on the right.
- Renew this operation for the 6 chambers. Insert electrodes as described before (see §3.2)
- Add 2.5 mL of Krebs buffer to each side of the chamber system, by the hole on the top, close to the insert to avoid any bubble.
- Switch on the peristaltic pump and connect the white ends of the pipes to the chambers. The gas flow will be of 12 mL O₂/CO₂ (95/5%) per minute. Never switch off the pumps until the end of the experiment.
- Measure the resistance value in presence of tissues with multimeter immediately after having placed 6 intestines

Rq: After the tissue insertion the values of all the electrical parameters tend to oscillate. This is most often caused by mechanical stress imposed on the samples. Therefore, it is advisable to allow the tissue to equilibrate for a minimum 10 minutes so as to recover before the experimental protocol. This value is considered as TEER
t= 0 min

- After the equilibration, required amount of media is removed from the donor compartment and is replaced with an equal volume of drug solution/suspension and marker solution into the donor (luminal) side. (t= 0 min)

- Harvest certain volume of the media from the serosal side at regular time intervals (we used $t = 30\text{min}$, 1h, 1.5h, 2h) and replaced with fresh 37°C Krebs buffer. Measure the parameters in the samples you need. TEER is also measured at the same regular time intervals.

At the end of the experiment:

- Tissues and buffer can be conserved and frozen for analysis (in 1.5 mL tubes, and conservation at -80°C), such as Western Blot experiment, histology, or Nox detection. Cf. corresponding protocol.

Rq: if not conserved, tissue should be discarded with the same process as for rat corpse.

Practical points:

- For each experiment, the pressure of the gas bottle should be checked, to anticipate for ordering a new bottle of O₂/CO₂ if necessary (gas consumption should be followed).
- All liquids are collected and thrown in special yellow bottles for biological products.
- Electrodes are kept event if yellow, rinsed with distilled water and place again in their tips box for further use (remember to change electrodes every month).
- Clean the dissection instruments, directly after dissection steps and having started Ussing chamber experiment, under tap water, and then rinsing with deionized water. Let dry on paper.

6. Cleaning the Ussing system

- Clean the chambers. The chambers should be washed in warm water, and then rinsed rigorously with deionized water. Place the equipment inverted on a rack or toweling to dry.
- Every month, use DDN (a detergent, stored in 1st floor pharmacology, near to the sink) to clean Ussing chamber and inserts. This should be written in the user book.

- Dilute the DDN 10 times (200 µL of DDN for 2 L of water). Put the chambers and inserts in a container, recover them with prepared DDN and let act it overnight. The day after, rinse rigorously with deionized water.

References:

1. Neirinckx, E., et al. (2011). Feasibility of the Ussing chamber technique for the determination of in vitro jejunal permeability of passively absorbed compounds in different animal species. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 34(3): 290-297.
2. Yang, N., et al. (2010). Activation of submucosal 5-HT₃ receptors elicits a somatostatin-dependent inhibition of ion secretion in rat colon. *British journal of pharmacology* 159(8): 1623-1625.
3. <http://okbu.net/naturalsci/mcwill/Biol/lab%20rat%20diss.doc>
4. Strader, A. D., et al. (2005). Weight loss through ileal transposition is accompanied by increased ileal hormone secretion and synthesis in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 288(2), E447-E453.
5. Tuleu, C., et al. (2001). Colonic delivery of sodium butyrate via oral route: Acrylic coating design of pellets and in vivo evaluation in rats. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 23(5), 245-253.

Acknowledgements :

FEDER for financial supports to purchase Ussing chamber apparatus.



AIM: _____

1. Krebs-Henseleit buffer preparation (working solution, for 0.5 L):

	Volume (mL)	Final concentration of the Krebs solution (mM)
NaCl 10X	50	119
NaHCO₃ 10X	50	24
KCl 100X	5	4.7
MgSO₄ 100X	5	1.2
KH₂PO₄ 100X	5	1.2
CaCl₂ 100X	5	1.6
Glucose *	0.9g	10
MilliQ water	380	

* Glucose is used as an energy source for cell maintenance.

2. Protocol :

- ◆ Prepare electrodes the day before
- ◆ 30 min before experiment: switch on both water baths (37°C for Krebs buffer and 45°C for Ussing system) (the water bath has to be scheduled at 45°C to reach the good temperature).
- ◆ Prepare 0.5L Krebs buffer, heat it 30 min after preparation with O₂/CO₂ (95/5%) bubbling, and then adjust its pH to 7,4.
- ◆ Harvest the intestine, cut a 1-2cm piece, cut along the mesenteric vein and remove the luminal content. Then, rinse with ice-cold Krebs and mount the intestine as a flat sheet on pins of the half-chamber of the tissue holding device and fit to the opposing half-chamber. Pay attention to the luminal and serosal sides.
- ◆ Fit the tissue holding device between the two parts of the Ussing chamber, and close tightly with the screw on the right.
- ◆ Insert electrodes to appropriate holes (black electrodes close to the tissue; white electrodes in the most distant holes). Connect the blue cable to electrodes (in the order, left to right: full white cable, full blue cable, blue cable with black part, white cable with black part)
- ◆ Add 2,5 mL of Krebs buffer to each side of the chamber system, by the hole on the top, close to the insert to avoid any bubble

→ WAIT 10 MIN FOR EQUILIBRATION!

- ◆ After, remove required volume of media and replace it with an equal volume of drug solution/suspension and marker solution into the donor (mucosal) side.
- ◆ Harvest certain volume of the media from the serosal side at regular time intervals and replaced with fresh buffer. Measure the parameters in the samples you need. TEER was also measured at the same regular time intervals.
- ◆ Measure the resistance value in presence of tissues with multimeter: connect the blue cable to the multimeter according to the previous order; switch on the left button of the multimeter and push the left button to read resistance (ohm)
- ◆ At the end of the experiment, calculate TEER of the tissues by checking resistance with/without tissues in the tissue holding device.



- ◆ Clean the chambers. The chambers should be washed in warm water using a mild detergent (which one) and then rinsed rigorously with deionized water. Place the equipment inverted on a rack or towel to dry.

3. Timetable, animal information and chambers content:

Krebs preparation	h	min	pH adjustment	h	min
Animal number	N°		Animal weight	g	
Animal sacrifice	h	min	Tissue harvested	h	min
Beginning of experiment	h	min	End of experiment	h	min
Calibration curve	h	min			

	Ch.1	Ch.2	Ch.3	Ch.4	Ch.5	Ch.6
Content						
Placed	h min	h min	h min	h min	h min	h min
“Zero”	h min	h min	h min	h min	h min	h min

4. Sodium fluorescein calibration curve:

Medium: _____

With a 20 mg/mL frozen sodium fluorescein solution (mother solution, MS):

- ◆ Prepare in 6 Eppendorf tubes as following:

Solution	Solution (µL)	Diluant (µL)	Final concentration (µg/mL)
A	10 of MS	990	200
B	50 of A	950	10
C	500 of B	500	5
D	200 of C	800	1
E	500 of D	500	0.5
F	200 of E	800	0.1

- ◆ Prepare the calibration curve, directly in a 96-well black microplate as following:

Well Numbers	1	2	3	4	5
Concentration (mg/mL)	0	0.1	0.25	0.5	0.75
V Diluant (µL)	200	-	100	-	50
V Solutions (µL)	0	200 (F)	100 (E)	200 (E)	150 (D)

- ◆ Read fluorescent intensity of different wells, using the BioTek Fluorimeter, with $\lambda_{exc} = 485/20$ nm and $\lambda_{em} = 528/20$ nm.

5. Resistance values (ohm):

Time (min)	Ch.1	Ch. 2	Ch. 3	Ch. 4	Ch. 5	Ch. 6
BLANK						
10						
40						
70						
100						
130						

Dosage du propranolol par CLHP à polarité de phases inversée couplée à une détection spectrofluorimétrique

1. Principe

Le propranolol (fig. 1) est utilisé comme molécule de référence, afin de déterminer la perméabilité de la barrière intestinale : le propranolol est connu comme étant facilement perméable au niveau de l'épithélium intestinal (Ungell A.-L. *et al*, 1998).

Le dosage du propranolol est réalisé dans le tampon Krebs, utilisé dans le cadre d'études *ex vivo*. Ce dosage s'effectue par CLHP à polarité de phases inversée couplée à une détection spectrofluorimétrique.

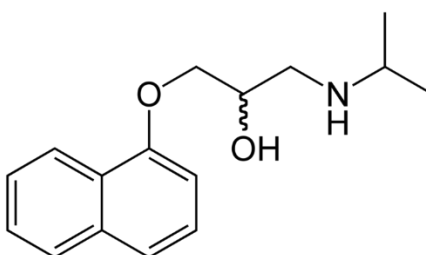


Figure 1 : structures du propranolol

Référence : Ungell, A.-L., Nylander, S., Bergstrand, S., Sjöberg, Å. and Lennernäs, H. (1998), Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *J. Pharm. Sci.*, 87: 360–366.

2. Réactifs et étalons

Tous les réactifs et solvants sont de qualité pour analyse ou pour CLHP.

2.1. Tampon phosphate de triéthylamine pH 2,50

Ajouter 2 mL de triéthylamine (ampoule 2 mL ; Fluka Analytical réf 17924) à 1 L d'eau ultra-pure. Ajuster le pH à $2,50 \pm 0,05$ à l'aide d'une solution d'acide phosphorique concentrée (acide orthophosphorique 85% pour analyse, ref Merck eurolab Prolabo : 20624.295).

2.2. Tampon Krebs

Composition : 6.9 g/L NaCl, 0.35 g/L KCl, 1.8 g/L glucose, 0.16 g/L KH_2PO_4 , 2.02 g/L NaHCO_3 , 0.14 g/L MgSO_4 , 0.35 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (voir le protocole de Ussing pour la préparation de ce tampon). Le pH est ajusté à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique 1 M.

2.3. Solution d'acide phosphorique diluée

Dans un microtube de type Eppendorf, ajouter 200 μL d'une solution d'acide phosphorique concentrée à 800 μL d'eau.

2.4. Phase mobile

Mélange acétonitrile – tampon phosphate de triéthylamine pH 2,50 (30 : 70 ; V/V), filtré et dégazé sur une membrane HVLP de porosité 0,45 μm .

2.5. Gamme d'étalonnage

Solution mère de propranolol à 1,5 mM : peser environ exactement 8,8 mg de chlorhydrate de propranolol (Sigma réf P-0884 ; masse molaire = $295,8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) dans une fiole jaugée de 20,0 mL. Compléter au trait de jauge avec du méthanol. Conserver à 4 °C pendant au maximum 1 mois.

Solution fille SF1 à 0,5 mM : préparée extemporanément par dilution au 1/3 de la solution mère dans le tampon HBSS Ca²⁺/Mg²⁺ ou Krebs.

Solution fille SF2 à 0,05 mM : préparée extemporanément par dilution au 1/10^{ème} de la solution SF1 dans le tampon HBSS Ca²⁺/Mg²⁺ ou Krebs.

Les solutions de la gamme d'étalonnage en propranolol sont préparées dans des microtubes de type Eppendorf de la façon suivante :

Tube n°	1	2	3	4	5
Concentration (µM)	0,5	2	5	7,5	10
SF2 (µL)	10	40	100	150	200
Tampon (µL)	990	960	900	850	800
Concentration finale (µM)	0,48	1,90	4,76	7,14	9,52

Conserver ces solutions au maximum pendant 1 jour.

Ajouter à chaque tube de la gamme 50 µL de la solution d'acide phosphorique diluée et injecter dans le système CLHP.

3. Préparation des échantillons réels

Prélever dans les 2 compartiments des dispositifs expérimentaux 1 mL, ajouter 50 µL de la solution d'acide phosphorique diluée, mélanger et congeler immédiatement à -20°C.

Décongeler rapidement les échantillons à 37 °C. Diluer éventuellement les échantillons dans la phase mobile afin de correspondre au domaine de linéarité correspondant au marqueur étudié (voir paragraphe 5.), puis injecter dans le système CLHP.

4. Conditions opératoires en CLHP

Le système CLHP est composé d'une pompe, d'un injecteur automatique ____, d'une boucle boucle calibrée de volume 100 µL, d'une colonne Macherey-Nagel LiChrospher RP18e (5 µm) 125 × 4 mm, d'un détecteur spectrofluorimétrique modèle Shimadzu RF-551 et d'un système informatique d'acquisition et de traitement des données (Azur Datalys).

Le débit de la phase mobile est de 1,0 mL.min⁻¹ et la température de la colonne est de 40 °C.

La pression résultante est de l'ordre de 80 bars. La détection s'effectue par spectrofluorimétrie : λ_{ex} : 230 nm ; λ_{ém} : 340 nm (sensitivity: HIGH)

Le temps de rétention du propranolol est de 3,7 min.

Le rinçage de la colonne s'opère par un mélange acétonitrile-eau (50 : 50 ; V/V) à un débit de 1,0 mL.min⁻¹, une température de colonne de 40 °C, pendant 15 min.

5. Domaines de linéarité et équations des droites d'étalonnage

Tampon	Krebs
Propranolol	0,5 – 10 µM
	y = (981 ± 81)x + (431 ± 277) (n = 6)

avec « x » la concentration en médicament (µM) et « y » la surface du pic (Unité Arbitraire).

APPROBATION	REDACTION	DATE
Anne SAPIN-MINET	Romain SCHMITT	18/03/2019

A. Principe

Le but de ce protocole est de permettre la coloration puis l'observation microscopique de tissu intestinal juste après prélèvement, ou après avoir subi une expérimentation de chambre de Ussing (des tests de tissu congelé dans azote liquide après inclusion en Tissue-Tek montrent des déchirures du tissu, la méthode n'est donc pas conseillée pour une étude morphologique). Pour conserver les différentes structures et conserver le tissu en l'état, il est nécessaire d'effectuer une fixation puis une inclusion en paraffine. Ensuite, sont réalisées les coupes, puis leur coloration avec trois colorants :

- Hématoxyline : colorant cationique (basique) permettant de colorer des éléments anioniques (acides, basophiles), comme le noyau,
- Éosine : colorant anionique (acide) permettant de colorer des éléments cationiques (bases, éosinophiles), comme le cytoplasme,
- Bleu alcian : colorant phtalocyanique permettant, lorsqu'il est utilisé à pH 2,5, de colorer les acides carboxylés et sulfatés, ainsi que les mucopolysaccharides et les sialomucines (glycoprotéines), comme le mucus.

Enfin, les coupes sont observées par microscopie.

B. Matériel

- Acide acétique glacial (Sigma, réf 33209)
- Acide chlorhydrique (HCl, Fluka, réf 35328)
- Albumine glycinée
- Bleu alcian 1% pH 2,5 (Sigma, réf 66011-100ML-F)
- Eosine (Sigma, réf E8761)
- Ethanol absolu (Sigma, réf 32221)
- Etuve à 56°C
- Hématoxyline de Harris (Sigma, réf HHS32-1L)
- Lames d'histologie
- Liquide de Bouin (Ral Diagnostics, réf 320700)
- MgSO₄ (Sigma, réf M2643)
- Milieu de montage (Poly-mount, réf 24176-120)
- NaHCO₃ (Prolabo, réf 27778.29)
- *n*-butanol (Carlo Erba, réf 414131)
- Paraffine
- Supports plastiques pour coupe
- Xylène (Prolabo, réf 28974.297), peut également remplacer le *n*-butanol



C. Préparation des solutions

- 1- Acide acétique 3% (conservation : température ambiante, 1 an)
 - 3 mL d'acide acétique glacial + 97 mL d'eau distillée
- 2- Albumine glycinée 2% (conservation : 4°C, 1 semaine)
 - 2 mL d'albumine glycinée + 98 mL d'eau distillée

3- Alcool :

Se référer à la table de Gay-Lussac

(éthanol 70% v/v à partir d'éthanol 96% v/v : 100 mL d'éthanol 96° + 41 mL d'eau distillée)

- 4- Alcool chlorhydrique 1% (conservation : température ambiante, 1 an) :
 - Dans 300 mL d'eau distillée, ajouter d'abord 10 mL d'HCl pur puis 700 mL d'éthanol 70°
- 5- Eosine (conservation : température ambiante, 1 mois) :
 - 1 g d'éosine dans 100 mL d'eau distillée
- 6- Hématoxyline de Harris (conservation : température ambiante) :
 - Filtrer si nécessaire avant utilisation
- 7- Solution de Scott (conservation : température ambiante, 1 mois) :
 - Dans 1 L d'eau distillée, ajouter 2 mg de NaHCO_3 + 20 mg de MgSO_4
 - Dissoudre les sels dans l'eau

D. Préparation du tissu

- 1- Découper le tissu intestinal après dissection (environ 1 x 0.5 cm), l'ouvrir longitudinalement et le fixer sur une planche en polystyrène avec des épingles.
- 2- Rincer à l'aide d'une pissette contenant du tampon Krebs.
- 3- Retourner le tissu (villosités contre la planche).
- 4- Rouler le tissu, à partir de l'extrémité la moins large, à l'aide de deux pinces (chacune maintenant un côté), délicatement, et en formant un rouleau le plus compact possible.
- 5- Insérer une épingle au centre du rouleau pour le maintenir et éviter qu'il ne se débobine.
- 6- Introduire le tissu dans 5 mL de liquide de Bouin, y compris l'aiguille.
- 7- **ATTENTION** : Si le tissu provient du Ussing, ouvrir l'insert en retirant la partie transparente, détacher délicatement le tissu de l'insert tout en le retournant sur la planche en polystyrène. Epingler le tissu, puis procéder aux **étapes 4 à 6**. Couper les deux extrémités du rouleau qui étaient écrasées par l'insert avant le dépôt dans le Bouin.

Remarque : éviter toute perturbation du tissu par des molécules fluorescentes (dont fluorescéine sodique), afin de ne pas altérer la future coloration et donc la visualisation microscopique.



E. Déshydratation et inclusion en paraffine du tissu

- 1- Après 24 h dans le liquide de Bouin, mettre le tissu dans un nouveau flacon.
- 2- Faire un rinçage rapide avec 5 mL d'alcool 80% v/v
- 3- Retirer l'alcool 80% devenu jaune, et rajouter 5 mL d'alcool 80% v/v.
- 4- Conserver à 4°C, et renouveler l'alcool 80% v/v toutes les > 2 h.
- 5- Répéter les **étapes 3 et 4** jusqu'à avoir une solution transparente (conservation 1 mois, 4°C, en renouvelant l'alcool 80% v/v)
- 6- Remplacer l'alcool 80% v/v par de l'alcool 95% v/v, et laisser 1 h 30 min.
- 7- Remplacer l'alcool 95% v/v par de l'alcool 100% v/v, et laisser 30 min.
- 8- Renouveler l'alcool 100% v/v, et laisser 45 min.
- 9- Renouveler l'alcool 100% v/v, et laisser 1 h 30 min.
- 10- Remplacer l'alcool 100% v/v par du *n*-Butanol (ou xylène), et laisser 45 min.
- 11- Renouveler le *n*-Butanol (ou xylène), et laisser 3 h.
- 12- Renouveler le *n*-Butanol (ou xylène), et laisser 1 nuit.
- 13- Faire fondre la paraffine à 56°C puis procéder à l'inclusion du tissu intestinal.
- 14- Laisser la paraffine prendre en masse (environ 2 h).
- 15- Conserver les blocs de tissu à température ambiante jusqu'à réalisation des coupes.

F. Coupe du tissu

- 1- Placer le bloc de paraffine, contenant le tissu intestinal, dans la pince du microtome.
- 2- Régler l'épaisseur de coupe à l'aide de la molette de gauche, à 5 µm.
- 3- Abaisser la manivelle de droite pour procéder à la coupe.
- 4- Allumer le banc chauffant.
- 5- Déposer de l'albumine glycinée 2% sur les lames préalablement annotées.
- 6- Préchauffer les lames sur le banc.
- 7- Couper le bloc de paraffine : les coupes doivent alors être récupérées délicatement avec une pince, puis déposées sur les lames préchauffées.
- 8- Une fois remplies, laisser sécher les lames, en position verticale.

G. Déparaffinage et réhydratation des coupes

- 1- Chauffer les lames dans une étuve à 56°C, pendant 15 min.
- 2- Mettre du xylène dans un bac de coloration, puis disposer les lames sur le panier porte-lames.
- 3- Effectuer 8 à 10 plongées, puis terminer par un bain de 5 min.



- 4- Mettre de l'alcool 100% v/v dans un bac de coloration, effectuer 8 à 10 plongées, puis terminer par un bain de 3 min.
- 5- Mettre de l'alcool 95% v/v dans un bac de coloration, et effectuer un bain de 3 min.
- 6- Mettre de l'alcool 80% v/v dans un bac de coloration, et effectuer un bain de 3 min.
- 7- Rincer les lames à l'eau purifiée.

H. Coloration et observation microscopique des coupes

- 1- Déposer 5 gouttes d'hématoxyline sur les coupes à l'aide d'une pipette, laisser à exposition pendant 4 min puis rincer à l'eau purifiée.
- 2- Déposer 5 gouttes d'alcool chlorhydrique sur les coupes à l'aide d'une pipette, laisser à exposition pendant 5 secondes puis rincer à l'eau purifiée.
- 3- Déposer 5 gouttes de solution de Scott sur les coupes à l'aide d'une pipette, laisser à exposition pendant 30 secondes puis rincer à l'eau purifiée. Réaliser deux fois le rinçage.
- 4- Déposer 5 gouttes de bleu alcian, préalablement dilué au demi, sur les coupes à l'aide d'une pipette, laisser à exposition pendant 2 min puis rincer à l'eau purifiée.
- 5- Déposer 5 gouttes d'éosine sur les coupes à l'aide d'une pipette, laisser à exposition pendant 2 min puis rincer à l'eau purifiée.
- 6- Déshydrater les coupes par bains successifs d'alcool à 50% v/v, 70% v/v, 80% v/v, 95% v/v et 100% v/v.
- 7- **SOUS HOTTE** : déposer du xylène afin de recouvrir les coupes, et retirer le xylène en disposant les lames verticalement, par capillarité avec un papier en dessous.
- 8- **SOUS HOTTE** : déposer du milieu de montage (Poly-Mount) afin de recouvrir les coupes, puis déposer la lamelle couvre-objet délicatement, en évitant la présence de bulle d'air.
- 9- Laisser sécher les lames ainsi préparées, sous hotte active, pendant au moins 12 à 24 h.
- 10- Procéder à l'observation microscopique. Cf. *Mode Opératoire Normalisé (EA 3452 M2_P2_I01 MON Bio_Cell Utilisation microscope fluo v20181114.pdf)*.

Purification of azo adduct and 2,3-naphthotriazole adduct by HPLC coupled with UV/Vis detection

1. Principle

The Griess method is based on diazotation between nitrite ion (NO_2^-) and sulfanilamide. The resulting diazonium salt is then coupled to *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine (NED), forming an azo adduct which strongly absorbs at $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$ (Figure 1).

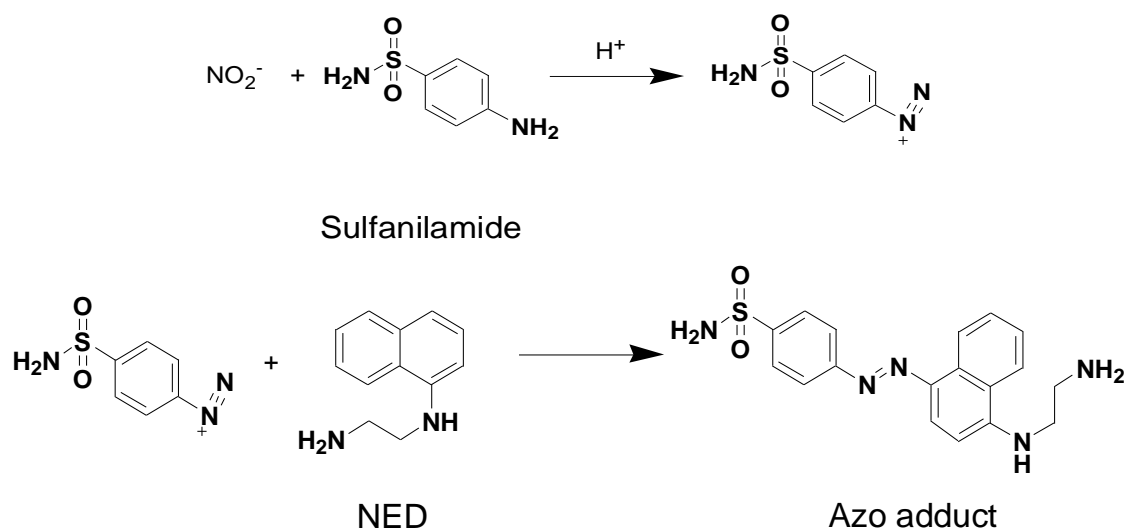


Figure 1. Scheme of the Griess reaction.

Principle of 2,3-diaminonaphthalene (DAN) assay is shown in protocol entitled “Nitrite, nitrate ions and *S*-nitrosothiols measurement using 2,3-diaminonaphthalene assay by spectrofluorometry”.

Stable nitrogen isotope (^{15}N) labeled azo adduct and 2,3-naphthotriazole (NAT) adduct are not available in the market. When ^{15}N labeled nitrite ion reacts with Griess or DAN reagents, ^{15}N labeled azo adduct or NAT adduct is produced. High performance liquid chromatography (HPLC) is used to separate produced adducts from excess of derivatization reagents, Next, purified adducts are collected for further research, such as optimizing method sensitivity using mass spectrometry.

Reference:

M. Marzinzig, A.K. Nussler, J. Stadler, E. Marzinzig, W. Barthlen, N.C. Nussler, H.G. Beger, S.M. Morris Jr., U.B. Brückner, Improved Methods to Measure End Products of Nitric Oxide in Biological Fluids: Nitrite, Nitrate, and *S*-Nitrosothiols, *Nitric Oxide*. 1 (1997) 177–189. doi:10.1006/niox.1997.0116.

2. Reagents

All solutions are prepared with fresh cold ultrapure water (> 18.2 MΩ.cm) and stored at 4°C in the dark for maximum one month unless otherwise specified.

2.1. 10⁻² M sodium nitrite

Weigh 35.0 mg of sodium nitrite (Na¹⁵NO₂) (Mw = 70 g/mol; ref Cambridge Isotope Laboratories 68378-96-1, purity: 98 %) in a 50 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with ultrapure water. Mix the solution gently for one time. Prepare daily.

2.2. 1.75 M acetate buffer pH 2.5

Mix 50 mL of glacial acetic acid solution (Mw = 60.05 g/mol) with 400 mL of ultrapure water, adjust the pH to 2.50 ± 0.05 with 12 M NaOH (Mw = 40.0 g/mol), and fill up to 500 mL with ultrapure water.

2.3. Sulfanilamide (Griess reagent)

Weigh and transfer 0.6 g of sulfanilamide (Mw = 172.2 g/mol) in a 100-mL volumetric flask, dissolve in 40 mL of 1 M HCl (Mw = 36.46 g/mol) and adjust the volume with ultrapure water.

2.4. N-1-(naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED)

Weigh and transfer 0.45 g of NED (Mw = 259.2 g/mol) in a 100-mL volumetric flask, add 30 mL of 1 M HCl, and adjust the volume with ultrapure water.

2.5. 1.24 mM pure NAT

Weigh 21 mg NAT (Mw = 169.2 g/mol; ref Chemodex 269-12-5; purity: 98.2 %) in a 100 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with 0.1 M HCl solution containing 10 % methanol. Divide into aliquots of 2 mL and store at -80°C for 1 year.

2.6. 0.6 M HCl

Transfer 300 mL of 1.0 M HCl (Commercial solution; Mw = 36.46 g/mol) in a 500.0 mL volumetric flask and complete with ultrapure water.

2.7. 3.16 mM DAN

Weigh 5 mg of DAN (Mw = 158 g/mol; ref Sigma D-2757) in a 10 mL volumetric

flask, dissolve and adjust the volume with 0.6 M HCl.

2.8. 1.2 M NaOH

Dilute NaOH solution with ultrapure water by mixing 0.12 mL of 10 M NaOH solution and 0.88 mL ultrapure water.

2.9. Mobile phase CH₃CN-H₂O (25/75, V/V) + 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA)

Mix 250 mL acetonitrile and 750 mL ultrapure water and 1 mL TFA, filter with 0.45- μ m HV membrane (Durapore®).

2.10. Mobile phase CH₃CN-CH₃COONH₄ (10⁻² M, pH = 7.2) (28/72, V/V)

Dilute 0.57 mL of acetic acid (volumetric mass = 1.05 g/mL; Mw = 60.05 g/mol; ref Sigma [64-19-7](#)) with 1 L of ultrapure water, and adjust the pH to 7.2 with 10 times diluted ammonia solution (ca. 25% NH₃; volumetric mass = 0.91 g/mL; Mw = 17.03 g/mol; ref Sigma [1336-21-6](#)); mix 280 mL acetonitrile and 720 mL ammonium acetate solution and filter with 0.45- μ m HV membrane (Durapore®).

3. Methods

3.1. Operating conditions for collecting purified azo adduct

100 μ L of 10⁻² M NaNO₂ solution is transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube, 900 μ L of acetic acid and 200 μ L of sulfanilamide are added. The mixture is vortexed for 5 s and kept at 20-25 °C for 3 min in dark. Next, 50 μ L of NED is added. The mixture is vortexed again for 5 s and kept at 20-25 °C for 5 min in dark, before injecting into the HPLC-UV/Vis system and the appropriate volume (around 0.5 mL) of mobile phase fraction containing azo adduct is collected. The resulting solution is stable at 4 °C for a maximum period of 24 h and -80 °C for a maximum period of one month.

The operating conditions are as follows:

- Injector with loop size: 100 μ L
- Column: CC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5 C18 AB (Macherey Nagel, Germany) + precolumn (LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m) 4 x 4 mm)
- Mobile phase: CH₃CN-H₂O (25/75, V/V) + 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA)
- Flow rate: 1.2 mL.min⁻¹; column temperature: 40 °C; resulting back pressure: 135-137 bars

- Spectrophotometric detection: fixed wavelength at 220 nm (UV/VIS-155, GILSON, Middleton, USA) + software: Azur®, Datalys (running time: 20 min; peak range: 10.5 – 12.5 min)
- Rinsing conditions: use CH₃CN-H₂O (50/50, V/V) at a flow rate of 0.8 mL.min⁻¹ and at 40°C for 10 min.

Retention time of the azo adduct is within 12 min. Typical chromatograms are shown in Figure 2.

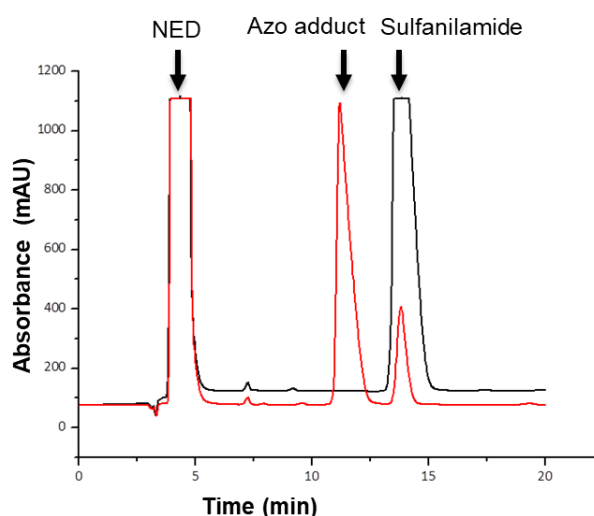


Figure 2. Chromatograms corresponding to azo adduct resulting from derivatization of 10⁻² M NO₂⁻ in red or blank (ultrapure water) in black by HPLC-UV/Vis at λ = 220 nm.

3.2. Operating conditions for collecting purified NAT

300 μL of 5 mM NaNO₂ solution (obtained by mixing 500 μL of the 10⁻² M NaNO₂ and 500 μL of ultrapure water) is transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube, and 600 μL of 3.16 mM DAN is added (excess: 26.4 %, pH = 0.4). The mixture is vortexed for 5 s and incubated in an oven at 37°C for 10 min and in dark. Next, 310 μL of 1.2 M NaOH are added. The mixture is stored at -80°C (for maximum 3 months) before injecting into the HPLC-UV/Vis system and the appropriate volume (around 0.5 mL) of mobile phase fraction containing NAT is collected. The operating conditions are as follows:

- Injector with loop size: 100 μL
- Column: CC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5 C18 AB (Macherey Nagel, Germany) + precolumn (LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm) 4 x 4 mm)

- Mobile phase: CH₃CN–CH₃COONH₄ (10⁻² M, pH = 7.2) (28/72, V/V)
- Flow rate: 0.8 mL.min⁻¹; column temperature: 40°C; resulting back pressure: 100 bars.
- Spectrophotometric detection: fixed wavelength at 330 nm (UV/VIS-155, GILSON, Middleton, USA) + software: Azur®, Datalys (running time: 15 min; peak range: 11 – 13 min)
- Rinsing conditions: use CH₃CN–H₂O (50/50, V/V) at a flow rate of 0.8 mL.min⁻¹ and at 40 °C for 10 min.

Retention time of the NAT adduct is within 12 min. Typical chromatograms are shown in Figure 3.

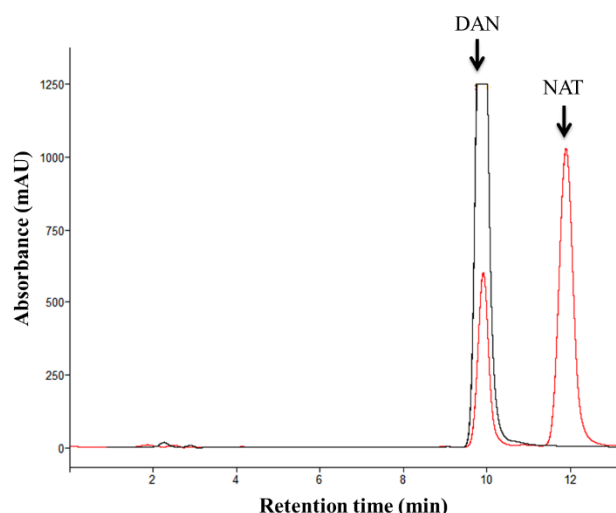


Figure 3. Chromatograms corresponding to NAT adduct resulting from derivatization of 5 mM NO₂⁻ in red or blank (ultrapure water) in black by HPLC-UV/Vis at $\lambda = 330$ nm.

3.3. Quantification of purified azo adduct by a spectrophotometer

The purified azo adduct is 20-fold diluted with ultrapure water (50 μ L sample in 1-mL ultrapure water), followed by detection with a spectrophotometer (UV-1800, SHIMADZU) at wavelength of 540 nm. Nitrite concentration is calculated by the Beer-Lambert law ($A = \epsilon \times l \times c$, $\epsilon = 37700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.4. Operating conditions for purified NAT quantification

The system used for NAT collection can be used for its quantification with the same condition, except that 20 μ L instead of 100 μ L loop is used inside injector, and

detection wavelength of 370 nm instead of 330 nm is settled. 50 μM pure NAT is used as standards (mobile phase is used for pure NAT dilution).

Or purified NAT is diluted for 50-fold in mobile phase, 2 μM nitrite (1.5 μM NAT) in ultrapure water and blank (ultrapure water) is derivatized for standards:

300 μL of each NaNO_2 solution are transferred to a 1.5 mL EP tube and 60 μL of 0.105 mM DAN solution are added. Next, the mixture is vortexed for 5 s, and then incubated in an oven at 37°C for 10 min and in dark. Next, 40 μL of 1 M NaOH are added. The mixture is cooled and stored at 4°C before injecting into the HPLC-FL.

The operating conditions for HPLC are the same as above, except for the following conditions:

- Injector with loop size: 20 μL
- Column: ZORBAX SB-Aq C18 4.6 X 150 mm, 3.5 μm (Agilent) or the one used for NAT collection + precolumn (NUCLEODUR® EC4/3 C-18 HTec, 5 μm)
- Spectrofluorometric detection: $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 415 \text{ nm}$; sensitivity: low (RF-551, SHIMADZU, Japan) + software: Azur® (running time: 12 min; peak range: 8 min - 10 min).

Nitrite, nitrate ions and S-nitrosothiols measurement using 2,3-diaminonaphthalene assay by spectrofluorometry

1. Principle

The 2,3-diaminonaphthalene (DAN) assay relies upon the reaction between the non-fluorescent reagent DAN and nitrite ion in acidic medium to yield 2,3-naphthotriazole (NAT) adduct, which exhibits in alkaline medium fluorescence at 415 nm after excitation at 375 nm (**Erreur ! Source du renvoi introuvable..**). For S-nitrosothiols (RSNOs), mercuric ions are used to cleave the S-NO bond, therefore allowing them to be measured with the DAN assay. Nitrate ions are reduced to nitrite ions by an enzymatic reaction, next they are measured by DAN assay.

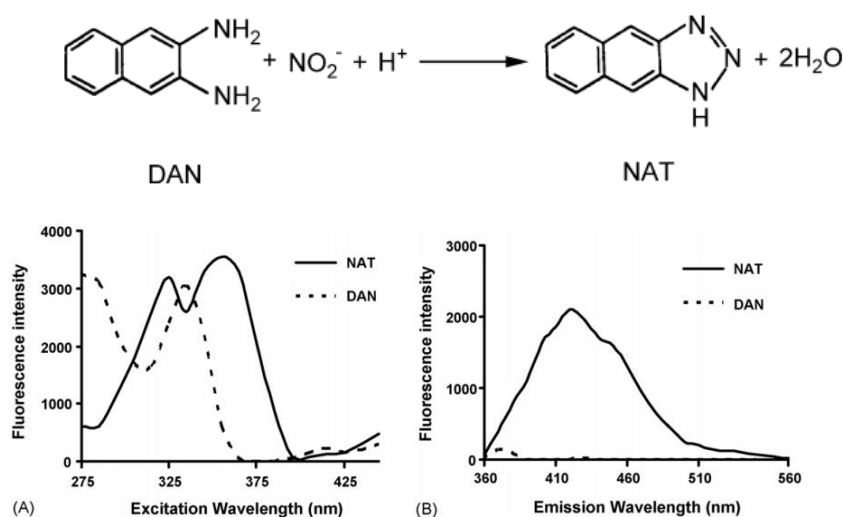


Figure 1. Reaction between nitrite ion and 2,3-diaminonaphthalene (DAN) producing 2,3-naphthotriazole (NAT) and corresponding fluorescence spectra at an excitation wavelength of 375 nm (panel-A) and at an emission wavelength of 415 nm (panel-B) (Jobgen et al., 2007).

Reference:

W.S. Jobgen, S.C. Jobgen, H. Li, C.J. Meininger, G. Wu, Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.* 851 (2007) 71–82. doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.018.

2. Reagents

All solutions are prepared with fresh cold ultrapure water (> 18.2 MΩ.cm) and stored at 4°C in the dark for maximum one month unless otherwise specified.



2.1. Physiological media

Conservation time: one week at 4°C after preparation.

Phosphate Buffer Saline (PBS) solution: weigh 8.00 g NaCl, 0.20 g KCl, 2.32 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 0.20 g KH₂PO₄. Dissolve in 1.0 L of ultrapure water; adjust pH to 7.4 (by using a pH meter) with 10 M NaOH solution.

Krebs solution: weigh 6.90 g NaCl, 0.35 g KCl, 1.80 g glucose, 0.16 g KH₂PO₄, 2.02 g NaHCO₃, 0.14 g MgSO₄, 0.35 g CaCl₂·2 H₂O. Dissolve in 1.0 L of ultrapure water, adjust pH to 7.4 (by using a pH meter) with 1.0 M HCl.

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS): use commercial HBSS (ref Gibco: 14185-045) made of 8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 1.0 g/L glucose, 60.0 mg/L KH₂PO₄, 47.5 mg/L Na₂HPO₄, 140.0 mg/L CaCl₂, 98.0 mg/L MgSO₄ final pH 7.4

2.2. 0.6 M HCl

Transfer 300 mL of 1 M HCl (Mw = 36.46 g/mol; commercial solution) in a 500 mL volumetric flask and adjust the volume with ultrapure water.

2.3. 0.316 mM DAN

Weigh 5 mg of DAN (Mw = 158 g/mol; ref Sigma D-2757) in a 100 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with 0.6 M HCl. Store at 4°C protected from light for 1 month.

2.4. 0.105 mM DAN

Dilute 3-fold of 0.316 mM DAN solution with 0.6 M HCl (500 µL of 0.316 mM DAN + 1000 µL of 0.6 M HCl). Prepare daily.

2.5. 3.17 mM HgCl₂

Weigh 86.0 mg of HgCl₂ (Mw = 271.5 g/mol; ref VWR 25384) in a 100 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with 0.6 M HCl. Store at 4°C protected from light for 1 month.

2.6. 0.105 mM DAN with 1.05 mM HgCl₂

Mix 1 volume of 0.316 mM DAN solution, 1 volume of 3.17 mM mercuric chloride solution and 1 volume of 0.6 M HCl. Prepare daily.

2.7. 2.1 M NaOH

Dilute 6-fold 50% NaOH solution with ultrapure water by mixing 5 mL of 50% NaOH solution (Mw = 40 g/mol; ref Fluka 72064) and 25 mL ultrapure water.

2.8. 10⁻² M sodium nitrite

Weigh 34.5 mg of sodium nitrite (NaNO₂) (Mw = 69 g/mol; ref Merck 6549) in a 50 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with PBS. Mix the solution gently for one time. Prepare daily.

2.9. 10⁻² M sodium nitrate

Weigh 42.5 mg of sodium nitrate (NaNO₃) (Mw = 85 g/mol; ref Sigma S8170) in a 50 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with PBS. Prepare daily.

2.10. S-nitroso glutathione (GSNO)

Solutions are prepared, titrated and stored according to protocol entitled “*Batch synthesis of S-nitroso glutathione*”.

2.11. Nitrate/Nitrite fluorometric assay kit

Assay buffer (Item NO. 780022): Transfer the content of the Assay Buffer vial (from the Nitrate/Nitrite fluorometric assay kit Cayman ref. 780051) to a 100 mL volumetric flask, rinse the vial three times with 1 mL of ultrapure water and fill up to 100 mL with ultrapure water. Store at 4 °C for no more than 2 months.

Nitrate Reductase (Item NO. 780010): Reconstitute the content of the vial (from the kit) with 1.2 mL Assay Buffer. Keep on ice during use. Divide into 70 µL aliquots and store at -20 °C for no more than 2 months. Freezing and thawing should be only operated once.

Enzyme Cofactors (Item NO. 780012): Reconstitute the contents of the vial (from the kit) with 1.2 mL Assay Buffer. Keep on ice during use. Divide into 70 µL aliquots and store at -20 °C for no more than 2 months. Freezing and thawing should be only operated once.

2.12. Lysis buffer

Transfer 2 g Triton X-100 (ref Sigma [9002-93-1](#)) in a 500 mL volumetric flask and adjust the volume with 0.1 M HCl.

3. Methods

3.1. Calibration curves for NO₂⁻ and RSNO determination

NaNO₂/GSNO daughter solution n°1 (10⁻⁴ M): transfer 100 µL of 10⁻² M NaNO₂/GSNO solution in a 10 mL volumetric flask, adjust the volume with PBS. Mix gently for one time.

NaNO₂/GSNO daughter solution n° 2 (2.10⁻⁶ M): transfer 500 µL of the NaNO₂/GSNO daughter solution n°1 in a 25 mL volumetric flask, adjust the volume with sample buffer. Mix gently for one time.

Dilutions for the calibration curve are prepared in 1.5 mL microtubes (mix gently each tube for one time), as follows:

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7
NaNO ₂ /GSNO daughter solution n°2 (2.10 ⁻⁶ M) (µL)	0	50	125	375	500	750	1000
Physiological medium (µL)	1000	950	875	625	500	250	0
[NO ₂ ⁻]/[RSNO] (µM)	-	0.10	0.25	0.75	1.00	1.50	2.00

100 µL of each standard (concentration range: 0.1 – 2 µM) or sample (in triplicate) is transferred into a black 96-well microplate, and 20 µL of 0.105 mM DAN solution is added. The mixture is shaken for 1 min at 500 rpm at 20-25 °C (Heidolph, VIBRAMAX 110, Germany) before incubation at 37 °C (incubator) in the dark for 10 min. Next, 20 µL of 2.1 M NaOH is added. The mixture is shaken for 5 min at 500 rpm at 20-25 °C, followed by analysis with a spectrofluorimeter (FP-8300iRM, JASCO, France) coupled with FMP Micro-well plate reader.

For RSNO or (RSNO + NO₂⁻) measurement, DAN reagent has to be replaced by DAN-HgCl₂ reagent.

3.2. Calibration curve for NO₃⁻ determination

NaNO₃ daughter solution n°1 (2.5.10⁻⁵ M): transfer 50 µL of 10⁻² M NaNO₃ solution in a 20 mL volumetric flask. Adjust the volume with the corresponding

physiological medium.

Dilutions for the calibration curve are prepared in Eppendorf tubes, as follows:

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7
NaNO ₃ daughter solution n°1 (2.5.10 ⁻⁵ M) (μL)	0	30	60	125	250	500	1000
Physiological medium (μL)	1000	970	940	875	750	500	0
[NO ₃ ⁻] (10 ⁻⁶ M)	-	0.75	1.50	3.13	6.25	12.50	25.00

According to the kit protocol: 20 μL of each standard (concentration range: 0.75 – 25 μM), or sample (in triplicate) is transferred into a black 96-well microplate, 60 μL of assay buffer and 10 μL enzyme cofactor mixture together with 10 μL nitrate reductase mixture are added. The mixture is shaken for 1 min at 500 rpm (Heidolph, VIBRAMAX 110, Germany) and incubated for 60 min at 20-25 °C in the dark. Next, 10 μL of kit DAN reagent (Item N0. 780070) is added, and the mixture is shaken for 1 min at 500 rpm at 20-25 °C before incubation at 37 °C (incubator) in the dark for 10 min. Finally, 20 μL of 2.8 M kit NaOH solution (Item N0. 780068) is added, followed by shaking for 5 min at 500 rpm and analysis with the spectrofluorimeter coupled with FMP Micro-well plate reader.

Fluorescence intensity is measured within 10 min.

3.3. Operating conditions for direct spectrofluorometric reader

FP-8300iRM spectrofluorimeter (JASCO, France) parameters are fixed as follows:

- Excitation bandwidth: 5 nm
- Emission bandwidth: 5 nm
- Response time: 0.5 s
- Sensitivity: high
- Excitation wavelength: 375 nm
- Emission wavelength: 415 nm

3.4. Calculations

- Nitrite concentration in samples is calculated with nitrite standard curve

equation.

- (RSNO + nitrite) concentration is calculated with RSNO standard curve equation.
- (Nitrate + nitrite) concentration is calculated with nitrate standard curve equation.
- RSNO concentration is calculated by subtracting nitrite concentration to (RSNO + nitrite) concentration.
- Nitrate concentration is calculated by subtracting nitrite concentration to (nitrate + nitrite) concentration.

Typical calibration curves obtained in a validation process are indicated in Table 1.

Table 1. Resulting calibration curves obtained in the different media without subtracting the blank signal ($r^2 \geq 0.99$, $n \geq 3$)

Medium	Fluorescence intensity (AU) of key points (Mean \pm SD)			Equation of calibration curve (Mean \pm SD)
	Nitrite	Nitrate	GSNO	
PBS	Blank: 433 \pm 69	-	Blank: 378 \pm 53	Nitrite: (1810 \pm 138)x + 465 \pm 73
	0.1 μ M: 635 \pm 55	-	0.1 μ M: 632 \pm 89	Nitrate: -
	2 μ M: 4083 \pm 209	-	2 μ M: 3591 \pm 163	GSNO: (1549 \pm 156)x + 498 \pm 173
Krebs	Blank: 495 \pm 76	-	Blank: 533 \pm 18	Nitrite: (1846 \pm 143)x + 585 \pm 88
	0.1 μ M: 797 \pm 52	-	0.1 μ M: 603 \pm 126	Nitrate: -
	2 μ M: 4373 \pm 307	-	2 μ M: 4677 \pm 300	GSNO: (2262 \pm 34)x - 204 \pm 83
HBSS	Blank: 468 \pm 66	Blank: 1652 \pm 188	Blank: 380 \pm 24	Nitrite: (1527 \pm 96)x + 435 \pm 89
	0.1 μ M: 572 \pm 67	0.75 μ M: 1825 \pm 152	0.1 μ M: 592 \pm 83	Nitrate: (264 \pm 22)x + 1719 \pm 116
	2 μ M: 3518 \pm 230	25 μ M: 8322 \pm 512	2 μ M: 3436 \pm 253	GSNO: (1451 \pm 236)x + 399 \pm 98
Lysis buffer	Blank: 364 \pm 46	-	Blank: 368 \pm 41	Nitrite: (891 \pm 55)x + 510 \pm 87
	0.25 μ M: 668 \pm 99	-	0.25 μ M: 581 \pm 40	Nitrate: -
	2 μ M :2279 \pm 103	-	2 μ M: 1954 \pm 96	GSNO: (787 \pm 49)x + 337 \pm 58

Nitrite, nitrate ions and S-nitrosothiols measurement using 2,3-diaminonaphthalene assay by HPLC coupled with tandem mass spectrometry

1. Principle

The 2,3-diaminonaphthalene (DAN) assay relies upon the reaction between DAN and nitrite ion in acidic medium to yield 2,3-naphthotriazole (NAT) adduct (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). For S-nitrosothiols (RSNO), mercuric ions are used to cleave the S-NO bond, therefore allowing them to be measured with the DAN assay. Nitrate ions are reduced to nitrite ions by an enzymatic reaction, next they are measured by DAN assay.

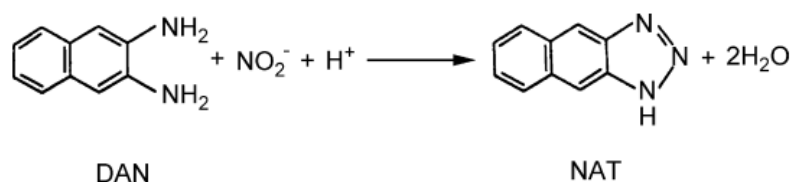


Figure 1. Reaction between nitrite ion and 2,3-diaminonaphthalene (DAN) producing 2,3-naphthotriazole (NAT).

The resulting NAT adduct is measured by a reversed phase HPLC method coupled with tandem mass spectrometry to differentiate the NAT adducts labeled either with ¹⁴N or ¹⁵N, as already reported in Table 1.

Table 1. Literature overview for 2,3-naphthotriazole adduct analysis resulting from derivatization of ^{15}N labeled NO species with 2,3-diaminonaphthalene by using RPLC-MS/MS

Analytes	Columns	Mobile phase components and elution mode	Ion source and mass analyzer (fragmentation modes and transitions)	IS	LOD or LOQ (nM)	Additional informations	Reference
NO_2^- and NO_3^-	C18, 5 μm , 33x2.1 mm	Mixture of methanol (from 49 % to 75 %) and ammonium acetate buffer	ESI; triple quadrupole (CID; m/z: 170 \rightarrow 115)	$^{15}\text{NO}_2^-$	LOQ = 8 / 75 ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$; S/N = 10)	2.2 % interference between unlabeled and labeled adducts due to isotopes	(Chao et al. 2016)
$^{15}\text{NO}_2^-$ and $^{15}\text{NO}_3^-$	C18, 5 μm , 150x2.1 mm	Mixture of methanol (from 5 % to 95 %) and ammonium carbonate buffer	ESI; hybrid of triple quadrupole and linear ion trap (CID; m/z: 171 \rightarrow 115)	No	LLOQ = 1 ($^{15}\text{NO}_2^-$ and $^{15}\text{NO}_3^-$; S/B = 5)	No interferences between isotopes	(Axton et al. 2016)
$^{15}\text{NO}_2^-$	C18, 5 μm , 50x2 mm	Mixture of acetonitrile (from 5 % to 95 %) and formic acid	ESI; triple quadrupole (CID; m/z: 171 \rightarrow 115)	1H-naphth[2,3-d]imidazole	LLOQ = 40 (NO_2^- , S/B = 5) LLOQ = 4 ($^{15}\text{NO}_2^-$, S/B = 5)	-	(Shin and Fung 2011)
$^{15}\text{NO}_2^-$, $^{15}\text{NO}_3^-$ and RS^{15}NOs	C18, 3 μm , 150 x 2.1 mm	Mixture of acetonitrile (from 40 % to 80 %) and ammonium acetate buffer	ESI; ion trap (HCD; m/z: 171 \rightarrow 156)	2-naphthylamine	LOQ = 5 ($^{15}\text{NO}_2^-$ and RS^{15}NOs , S/B = 4) LOQ = 250 ($^{15}\text{NO}_3^-$, S/B = 4)	2 % interference due to isotope ^{13}C	-

$^{15}\text{NO}_2^-$: ^{15}N labeled nitrite ion; $^{15}\text{NO}_3^-$: ^{15}N labeled nitrate ion; RS^{15}NOs : ^{15}N labeled S-nitrosothiols; ESI: electrospray ionization; CID: collision induced dissociation; HCD: high collision induced dissociation; IS: internal standard; LOQ: limit of quantification; LLOQ: lower limit of quantification; S/N: signal over noise ratio; S/B: signal over blank response ratio; RPLC: reverse phase liquid chromatography.

References:

M.-R. Chao, Y.-M. Shih, Y.-W. Hsu, H.-H. Liu, Y.-J. Chang, B.-H. Lin, C.-W. Hu, Urinary nitrite/nitrate ratio measured by isotope-dilution LC–MS/MS as a tool to screen for urinary tract infections, *Free Radic. Biol. Med.* 93 (2016) 77–83. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.025.

E.R. Axton, E.A. Hardardt, J.F. Stevens, Stable isotope-assisted LC–MS/MS monitoring of glyceryl trinitrate bioactivation in a cell culture model of nitrate tolerance, *J. Chromatogr. B.* 1019 (2016) 156–163. doi:10.1016/j.jchromb.2015.12.010.

S. Shin, H.-L. Fung, Evaluation of an LC–MS/MS assay for ¹⁵N-nitrite for cellular studies of l-arginine action, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 1127–1131. doi:10.1016/j.jpba.2011.08.017.

2. Reagents

All solutions are prepared with fresh cold ultrapure water (> 18.2 MΩ.cm) and stored at 4°C in the dark for maximum one month unless otherwise specified.

2.1. Physiological media

Conservation time: one week at 4°C after preparation.

Phosphate Buffer Saline (PBS) solution: weigh 8.00 g NaCl, 0.20 g KCl, 2.32 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 0.20 g KH₂PO₄. Dissolve in 1.0 L of ultrapure water; adjust pH to 7.4 (by using a pH meter) with 10 M NaOH solution. Sterilize and aliquot in 35 mL fractions.

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS): use commercial HBSS (ref Gibco: 14185-045) made of 8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 1.0 g/L glucose, 60.0 mg/L KH₂PO₄, 47.5 mg/L Na₂HPO₄, 140.0 mg/L CaCl₂, 98.0 mg/L MgSO₄ final pH 7.4

2.2. 0.6 M HCl

Transfer 300 mL of 1 M HCl (Mw = 36.46 g/mol; commercial solution) in a 500 mL volumetric flask and adjust the volume with ultrapure water. Aliquot in 2 mL fractions.

2.3. 0.316 mM DAN

Weigh 5 mg of DAN (Mw = 158 g/mol; ref Sigma D-2757) in a 100 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with 0.6 M HCl. Store at 4°C protected from light for 1 month. Aliquot in 1 mL fractions.

2.4. 0.105 mM DAN

Dilute 3-fold of 0.316 mM DAN solution with 0.6 M HCl (500 μ L of 0.316 mM DAN + 1000 μ L of 0.6 M HCl). Prepare daily.

2.5. 3.17 mM HgCl₂

Weigh 86.0 mg of HgCl₂ (Mw = 271.5 g/mol; ref VWR 25384) in a 100 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with 0.6 M HCl. Store at 4°C protected from light for 1 month. Aliquot in 1 mL fractions.

2.6. 0.105 mM DAN with 1.05 mM HgCl₂

Mix 1 volume of 0.316 mM DAN solution, 1 volume of 3.17 mM mercuric chloride solution and 1 volume of 0.6 M HCl. Prepare daily.

2.7. 10⁻⁴ M NaOH

Transfer 1 mL of 1.0 M NaOH titrated solution (commercial solution; ref Sigma S2770) in a 100 mL volumetric flask and adjust the volume with ultrapure water to obtain 10⁻² M NaOH solution. Dilute 100-fold of NaOH solution in ultrapure water by transferring 1 mL of 10⁻² M NaOH in a 100 mL volumetric flask and adjust the volume with ultrapure water.

2.8. 10⁻² M sodium nitrite

Weigh 35.0 mg of sodium nitrite (Na¹⁵NO₂) (Mw = 70 g/mol; ref Cambridge Isotope Laboratories 68378-96-1, purity: 98 %) in a 50 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with PBS. Mix the solution gently for one time. Prepare daily.

2.9. 10⁻² M sodium nitrate

Weigh 43 mg of sodium nitrate (Na¹⁵NO₃) (Mw = 86 g/mol; ref Sigma 364606, purity: 98 %) in a 50 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with PBS. Prepare daily.

2.10. S-nitroso glutathione (GS¹⁵NO)

Solutions are prepared, titrated and stored according to protocol entitled “*Batch synthesis of S-nitroso glutathione*”, except that Na¹⁵NO₂ instead of Na¹⁴NO₂ is used.

2.11. Nitrate/Nitrite fluorometric assay kit

Assay buffer (Item NO. 780022): Transfer the content of the Assay Buffer vial (from the Nitrate/Nitrite fluorometric assay kit Cayman ref. 780051) to a 100 mL volumetric flask, rinse the vial three times with 1 mL of ultrapure water and fill up to 100 mL with ultrapure water. Store at 4 °C for no more than 2 months.

Nitrate Reductase (Item NO. 780010): Reconstitute the content of the vial (from the kit) with 1.2 mL Assay Buffer. Keep on ice during use. Divide into 70 µL aliquots and store at -20 °C for no more than 2 months. Freezing and thawing should be only operated once.

Enzyme Cofactors (Item NO. 780012): Reconstitute the contents of the vial (from the kit) with 1.2 mL Assay Buffer. Keep on ice during use. Divide into 70 µL aliquots and store at -20 °C for no more than 2 months. Freezing and thawing should be only operated once.

2.12. 10⁻² M CH₃COOH

Dilute 0.285 mL of glacial acetic acid solution (volumetric mass = 1.05 g/mL; Mw = 60.05 g/mol) with 500 mL with ultrapure water, and filter with 0.45-µm HV membrane (Durapore®).

2.13. Rinsing mobile phase

Mix 500 mL acetonitrile and 500 mL of ultrapure water, filter with 0.45-µm HV membrane (Durapore®).

2.14. 0.02 mM 2-naphthylamine (internal standard, IS)

Weigh 7 mg of 2-naphthylamine (Mw = 143 g/mol, ref Sigma 91598) in a 10 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with rinsing mobile phase to obtain 5 mM 2-naphthylamine solution. Dilute 250-fold 2-naphthylamine solution by transferring 0.04 mL of 5 mM 2-naphthylamine solution in a 10 mL volumetric flask and adjust the volume with rinsing mobile phase. Prepare daily.

2.15. 1.24 mM pure NAT

Weigh 21 mg NAT (Mw = 169.2 g/mol; ref Chemodex 269-12-5; purity: 98.2 %) in a 100 mL volumetric flask, dissolve in 10 mL of methanol, and adjust the volume

with 0.1 M HCl solution. Divide into aliquots of 2 mL and store at -80°C for 1 year.

3. Methods

3.1. Calibration curve for pure NAT determination

The pure NAT daughter solution ($2 \cdot 10^{-6}$ M): defreeze 1.24 mM NAT solution, sonicate for 1 min, transfer 2 mL to a 200 mL volumetric flask, add 2.96 mL of $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (25/75, V/V), and adjust the volume with ultrapure water to obtain 0.012 mM NAT. Next, transfer 1.65 mL of 0.012 mM NAT to a 10 mL volumetric flask and adjust the volume with ultrapure water.

The dilutions for the calibration curve are prepared in 1.5 mL microtubes, as follows:

Tube n°	1	2	3	4	5
Pure NAT daughter solution ($2 \cdot 10^{-6}$ M) [μL]	50	500 μL of n° 1	200 μL of n° 2	500 μL of n° 3	500 μL of n° 4
Ultrapure water [μL]	950	500	800	500	500
[NAT] (nM)	100	50	10	5	2.5

3.2. Calibration curves and quality controls for $^{15}\text{NO}_2^-$ and RS^{15}NO determination

$\text{Na}^{15}\text{NO}_2/\text{GS}^{15}\text{NO}$ daughter solution n°1 (10^{-4} M): transfer 100 μL of 10^{-2} M $\text{Na}^{15}\text{NO}_2/\text{GS}^{15}\text{NO}$ solution in a 10 mL volumetric flask, adjust the volume with PBS. Mix gently for one time.

$\text{Na}^{15}\text{NO}_2/\text{GS}^{15}\text{NO}$ daughter solution n° 2 ($2 \cdot 10^{-6}$ M): transfer 500 μL of the $\text{Na}^{15}\text{NO}_2/\text{GS}^{15}\text{NO}$ daughter solution n°1 in a 25 mL volumetric flask, adjust the volume with sample buffer. Mix gently for one time.

200 nM $\text{Na}^{15}\text{NO}_2/\text{GS}^{15}\text{NO}$ is prepared by mixing 0.1 mL of $2 \cdot 10^{-6}$ M $\text{Na}^{15}\text{NO}_2/\text{GS}^{15}\text{NO}$ and 0.9 mL of HBSS.

100 nM $\text{Na}^{15}\text{NO}_2/\text{GS}^{15}\text{NO}$ is prepared by mixing 0.6 mL of 200 nM $\text{Na}^{15}\text{NO}_2/\text{GS}^{15}\text{NO}$ and 0.6 mL of HBSS.

Lower $\text{Na}^{15}\text{NO}_2/\text{GS}^{15}\text{NO}$ concentrations are prepared as follows:

Tube n°	1	2	3	4	5	6
Na ¹⁵ NO ₂ /GS ¹⁵ NO solution (100 nM) (μL)	0	50	100	200	500	320
HBSS (μL)	1000	950	900	800	500	0
[¹⁵ NO ₂]/[GS ¹⁵ NO] (nM)	-	5	10	20	50	100

180 nM Na¹⁵NO₂/GS¹⁵NO as the quality control is prepared by mixing 0.9 mL of 200 nM Na¹⁵NO₂/GS¹⁵NO and 0.1 mL of HBSS.

50 nM Na¹⁵NO₂/GS¹⁵NO as the quality control is prepared by mixing 0.5 mL of 100 nM Na¹⁵NO₂/GS¹⁵NO and 0.5 mL of HBSS.

15 nM Na¹⁵NO₂/GS¹⁵NO as the quality control is prepared by mixing 0.15 mL of 100 nM Na¹⁵NO₂/GS¹⁵NO and 0.85 mL of HBSS.

300 μL of each standard (concentration range: 5 – 200 nM), quality controls, or sample are transferred into a 1.5 mL microtube, and 60 μL of 0.105 mM DAN solution are added. The mixture is shaken for 0.1 min by vortex at 20-25 °C before incubation at 37 °C in the dark for 10 min. Next, 36 μL of 1 M and 4 μL of 10⁻⁴ M NaOH are added. The mixture is shaken for 0.1 min by vortex at 20-25 °C, followed by freezing at -80 °C. 10 μL of 0.02 mM IS are added before analysis with HPLC-MS/MS.

For RS¹⁵NO or (RS¹⁵NO + ¹⁵NO₂⁻) measurement, DAN reagent has to be replaced by DAN-HgCl₂ reagent.

3.3. Calibration curve for ¹⁵NO₃⁻ determination

Na¹⁵NO₃ daughter solution n°1 (10⁻⁴ M): transfer 100 μL of 10⁻² M Na¹⁵NO₃ solution in a 10 mL volumetric flask. Adjust the volume with PBS.

5000 nM Na¹⁵NO₃ is prepared by transferring 0.5 mL of 10⁻⁴ M Na¹⁵NO₃ in a 10 mL volumetric flask. Adjust the volume with HBSS;

2500 nM Na¹⁵NO₃ is prepared by mixing 0.6 mL of 5000 nM Na¹⁵NO₃ and 0.6 mL of HBSS.

Lower Na¹⁵NO₃ concentrations are prepared as follows:

Tube n°	1	2	3	4	5
Na ¹⁵ NO ₃ solution (2500 nM) (μL)	0	100	200	500	400
HBSS (μL)	1000	900	800	500	0
[¹⁵ NO ₃] (nM)	-	250	500	1250	2500

4000 nM Na¹⁵NO₃ as the quality control is prepared by mixing 0.8 mL of 5000 nM Na¹⁵NO₃ and 0.2 mL of HBSS.

2500 nM Na¹⁵NO₃ as the quality control is prepared by mixing 0.5 mL of 5000 nM Na¹⁵NO₃ and 0.5 mL of HBSS.

300 nM Na¹⁵NO₃ as the quality control is prepared by mixing 0.6 mL of 500 nM Na¹⁵NO₃ and 0.4 mL of HBSS.

According to the kit protocol: 40 μL of each standard (concentration range: 250 – 5000 nM), quality controls, or sample are transferred into a 1.5 mL microtube, 120 μL of assay buffer and 20 μL enzyme cofactor mixture together with 20 μL nitrate reductase mixture are added. The mixture is shaken for 0.1 min by vortex and incubated for 60 min at 20-25 °C in the dark. Next, 40 μL of 0.105 mM DAN solution is added. The mixture is shaken for 0.1 min by vortex at 20-25 °C before incubation at 37 °C in the dark for 10 min. Then, 24 μL of 1 M and 3 μL of 10⁻⁴ M NaOH are added. The mixture is shaken for 0.1 min by vortex at 20-25 °C, followed by freezing at -80 °C. 7 μL of 0.02 mM IS are added before analysis with HPLC-MS/MS.

3.4. Operating conditions for HPLC-MS/MS

All reversed phase columns used for the present method have to exhibit a number of theoretical plates per meter equal to at least 15,000 for the anthracene peak.

The operating conditions for HPLC (DIONEX, Ultimate 3000) are as follows:

- Column: C18 3 μm, 12 nm, 2.1 X 150 mm (Thermo Scientific).
- Gradient mobile phase: start at 40% B for 10 min (equilibrating the column) + 2 min; change linearly to 80% B over 3.5 min; hold at 80% B for 2.5 min (mobile phase A: 10⁻² M acetic acid; mobile phase B: CH₃CN)



- Flow rate: 0.2 mL.min⁻¹; column temperature: 25 °C; resulting back pressure: 105 bars for 40% B, 65 bars for 80 % B.
- Loop size: 20 µL
- Software: Chromeleon (running time: 7 min; peak range: 5.3 min – 5.5 min)
- Rinsing conditions: use CH₃CN-H₂O (50/50, V/V) at a flow rate of 0.2 mL.min⁻¹ and at 25 °C for 10 min.

The operating conditions for MS/MS (LTQ Velos Pro, Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) are as follows:

- Ion source: ESI (source voltage: 5.00 kV; source current: 3.5 µA; source temperature: 280 °C; sheath / aux / sweep gas (N₂) flow rate: 10.00 / 5.00 / 0.05 arb; capillary temperature: 250 °C)
- Analyzer: dual-pressure linear ion trap (monitor transition: m/z 171 → 156 for ¹⁵N-NAT, m/z 170 → 156 for ¹⁴N-NAT)
- Software: Thermo Tune Plus, (MRM; Act type: HCD; collision energy: 50 %; Act Q: 0.25; Act time: 10 ms)
- A valve between HPLC and MS is used to throw sample for the first 3 min into waste and transfer sample for the next 4.5 min into detector.

3.5. Calculations

- Nitrite concentration is calculated with nitrite standard curve equation.
- (RSNO + nitrite) concentration is calculated with RSNO standard curve equation.
- (Nitrate + nitrite) concentration is calculated with nitrate standard curve equation.
- RSNO concentration is calculated by subtracting nitrite concentration to (RSNO + nitrite) concentration.
- Nitrate concentration is calculated by subtracting nitrite concentration to (nitrate + nitrite) concentration.

The signal value obtained in the blank is subtracted to all signal values obtained for standards.

Typical validation data are shown in Table 2. They are checked daily by comparing with quality control.

Table 2. Inter-day and intra-day variability of quality control samples for ^{15}N -nitrite S-nitrosoglutathione (GS^{15}NO) and ^{15}N -nitrate analysis with IS. Accuracy was determined as the deviation (%) of calculated concentrations from the nominal concentrations. Precision was determined as the relative standard deviation (RSD) of the 6 measurements.

NO species	Concentration (nM)	Intra-day		Inter-day	
		Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)
^{15}N -nitrite	15	105.2±6.4	6.1	104.7±7.0	6.7
	50	99.0±6.8	6.9	94.7±2.8	3.0
	180	98.6±5.3	5.4	102.7±7.3	7.1
GS^{15}NO	15	98.1±13.1	13.4	93.3±11.8	12.6
	50	99.1±10.9	11.0	96.0±7.4	7.7
	180	100.0±12.7	12.7	101.5±11.4	11.3
	300	105.2±6.4	6.1	104.7±7.0	6.8
^{15}N -nitrate	2500	99.0±6.8	6.9	94.7±2.8	8.7
	4000	98.6±5.3	5.4	102.7±7.3	8.1

Quantification of S-nitrosothiols in the rat intestine with 2,3-diaminonaphthalene assay by HPLC coupled with fluorescence detection

1. Principle

The present analytical method is aimed at being applied to experiments on rat intestine isolated. S-nitrosothiols (RSNOs) were measured by the 2,3-diaminonaphthalene/mercuric ions (DAN/Hg²⁺) assay; the derivatization step was directly operated on smashed tissue as previously described (Celio Damacena-Angelis et al., 2017) (Shin and Fung, 2011b), and resulting naphthotriazole (NAT) adduct extracted with acetonitrile was analyzed by reversed phase HPLC coupled with spectrofluorimetric detection (LC/FL). The method should be further applied to other tissues and organs by using HPLC coupled with mass spectrometry (LC/MS) after GSNO labeling with ¹⁵N.

References:

S. Shin, H.-L. Fung, Evaluation of an LC–MS/MS assay for ¹⁵N-nitrite for cellular studies of l-arginine action, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 1127–1131. doi:10.1016/j.jpba.2011.08.017.

C. Damacena-Angelis, G.H. Oliveira-Paula, L.C. Pinheiro, E.J. Crevelin, R.L. Portella, L.A.B. Moraes, J.E. Tanus-Santos, Nitrate decreases xanthine oxidoreductase-mediated nitrite reductase activity and attenuates vascular and blood pressure responses to nitrite, *Redox Biol.* 12 (2017) 291–299. doi:10.1016/j.redox.2017.03.003.

2. Reagents

All solutions are prepared with fresh cold ultrapure water (> 18.2 MΩ.cm) and stored at 4°C in the dark for maximum one month unless otherwise specified.

2.1. Physiological media

Conservation time: one week at 4°C after preparation.

Phosphate Buffer Saline (PBS) solution: weigh 8.00 g NaCl, 0.20 g KCl, 2.32 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 0.20 g KH₂PO₄. Dissolve in 1.0 L of ultrapure water; adjust pH to 7.4 (by using a pH meter) with 10 M NaOH solution.

0.1 M Tris buffer (pH = 7.4): weigh 1.576 g of Trizma-HCl (Mw = 158 g/mol, ref Sigma T040) and dissolve in 100 mL of ultrapure water; adjust the pH to 7.40 ± 0.05 with 10 M NaOH solution.

2.2. 0.6 M HCl

Transfer 300 mL of 1 M HCl (Mw = 36.46 g/mol; Commercial solution) in a 500 mL volumetric flask and complete with ultrapure water.

2.3. 0.316 mM DAN

Weigh 5 mg of DAN (Mw = 158 g/mol; ref Sigma D-2757) in a 100 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with 0.6 M HCl. Store at 4°C protected from light for 1 month.

2.4. 0.105 mM DAN

Dilute 3-fold of 0.316 mM DAN solution with 0.6 M HCl (500 µL of 0.316 mM DAN + 1000 µL of 0.6 M HCl). Prepare daily.

2.5. 3.17 mM HgCl₂

Weigh 86.0 mg of HgCl₂ (Mw = 271.5 g/mol; ref VWR 25384) in a 100 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with 0.6 M HCl. Store at 4°C protected from light for 1 month.

2.6. 0.105 mM DAN with 1.05 mM HgCl₂

Mix 1 volume of 0.316 mM DAN solution, 1 volume of 3.17 mM mercuric chloride solution and 1 volume of 0.6 M HCl. Prepare daily.

2.7. 10 M NaOH

Weigh 10 g of NaOH (Mw = 40 g/mol, ref Prolabo- 28252.293) and dissolve in 25 mL of ultrapure water, use ice to cool the mixture.

2.8. 10⁻² M sodium nitrite

Weigh 34.5 mg of sodium nitrite (NaNO₂) (Mw = 69 g/mol; ref Merck 6549) in a 50 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with PBS. Mix the solution gently for one time. Prepare daily.

2.9. S-nitrosoglutathione (GSNO)

Solutions are prepared, titrated and stored according to protocol entitled "*Batch synthesis of S-nitrosoglutathione*".

2.10. 1.24 mM pure NAT

Weigh 21 mg NAT (Mw = 169.2 g/mol; ref Chemodex 269-12-5; purity: 98.2 %) in a 100 mL volumetric flask, dissolve and adjust the volume with 0.1 M HCl solution containing 10 % methanol. Divide into aliquots of 2 mL and store at -80°C for 1 year.

2.11. Mobile phase CH₃CN–CH₃COONH₄ (10⁻² M, pH = 7.2) (28/72, V/V)

Dilute 0.57 mL of glacial acetic acid solution (volumetric mass = 1.05 g/mL; Mw = 60.05 g/mol; ref Sigma [64-19-7](#)) with 1 L of ultrapure water, and adjust the pH to 7.2 with 10 times diluted ammonia solution (ca. 25% NH₃; volumetric mass = 0.91 g/mL; Mw = 17.03 g/mol; ref Sigma [1336-21-6](#)); mix 280 mL acetonitrile and 720 mL ammonium acetate solution and filter with 0.45-µm HV membrane (Durapore®).

3. Methods

3.1. Calibration curves for NO₂⁻ and GSNO determination

50 µM NaNO₂ or GSNO solutions are prepared by transferring 50 µL of 10⁻² M NaNO₂ or GSNO in a 10 mL volumetric flask. Adjust the volume with Tris buffer. Further dilutions for the calibration curve are prepared in 1.5 mL microtubes (mix gently each tube for one time), as follows:

Tube n°	1	2	3	4	5	6
NaNO ₂ /GSNO solution (50 µM) (µL)	0	125	250	500	750	1000
Tris buffer (µL)	1000	875	750	500	250	0
[NO ₂ ⁻]/[GSNO] (µM)	-	6.25	12.5	25	37.5	50

Remove Wistar rat intestine (length: around 2 cm, weight: 100 ± 5 mg) after sacrifice (anesthetized with sodium pentobarbitone (60 mg.kg⁻¹, intraperitoneal injection, Sanofi Santé Nutrition Animale, Libourne, France); administrated with heparin (1000 IU.kg⁻¹ heparin Choay, penis vein and sacrificed by exsanguination)). Rinse quickly with 1 mL cold PBS for 2 times, use tissue paper to dry the intestine each time; freeze the rat intestine with liquid N₂. Smash the intestine in liquid N₂ with a pestle in a mortar, weigh 20 ± 2 mg intestine powder in a 2-mL micro-tube. Spike the powder with 20 µL of NaNO₂ or GSNO standard solutions. Add 600 µL DAN or DAN/Hg²⁺ in 0.6

M HCl, followed by vortex for 30 s. Incubate the mixture in the dark in an incubator (37 °C, Jouan IG150) for 10 min with rotation (80 rpm, MX-RD-E Classic Rotator), add 40 µL of 10 M NaOH, mix by vortex for 10 s, add 600 µL acetonitrile, mix by vortex for 30 s, and centrifuge at 18000 g for 15 min at 4 °C (VWR Hitachi, CT15RE); collect the supernatant and store at 4 °C for a maximum period of 24 h before measurement by HPLC coupled with fluorescence detection (HPLC-FL).

3.2. Quantification of RSNOs after incubation of isolated intestine with GSNO

Rinse the rat isolated intestine (100 ± 5 mg) quickly with 1 mL of cold PBS for 2 times, use tissue paper to dry the intestine each time; incubate intestine with 5 mL of 100 µM GSNO in a 15-mL EP tube at 37°C for 60 min with rotation (35 rpm, CAT Roller RM5-40, Germany), rinse intestine quickly with 5 mL of cold PBS for 3 times. Then freeze intestine and quantify NaNO₂/RSNOs as described above.

For RSNO or (RSNO + nitrite) measurement, DAN reagent has to be replaced by DAN-HgCl₂ reagent.

3.3. Operating conditions for HPLC-FL

All reversed phase columns used for the present method have to exhibit a number of theoretical plates per meter equal to at least 15,000 for the anthracene peak.

The operating conditions are as follows:

- Column: ZORBAX SB-Aq C18 4.6 X 150 mm, 3.5 µm (Agilent) + precolumn (NUCLEODUR® EC4/3 C-18 Htec, 5 µm)
- Mobile phase: CH₃CN–CH₃COONH₄ (10⁻² M, pH = 7.2) (28/72, V/V)
- Flow rate: 0.8 mL.min⁻¹; column temperature: 40°C; resulting back pressure: 95-105 bars.
- Auto-sampler with cooling device for 4 °C (loop size: 20 µL)
- Spectrofluorometric detection: $\lambda_{exc} = 375$ nm and $\lambda_{em} = 415$ nm; sensitivity: low (RF-10A XL, SHIMADZU, Japan) + software: LC Solution, (running time: 15 min; peak range: 9 – 11 min)
- Rinsing conditions: use CH₃CN–H₂O (50/50, V/V) at a flow rate of 0.8 mL.min⁻¹ and at 40 °C for 10 min.

3.4. Calculations

- Nitrite concentration is calculated with nitrite standard curve equation.
- (RSNO + nitrite) concentration is calculated with RSNO standard curve equation.
- RSNO concentration is calculated by subtracting nitrite concentration to (RSNO + nitrite) concentration.

Retention times of the DAN excess and NAT adduct are within 8 and 10 min, respectively. Typical chromatograms are shown in Figure 1.

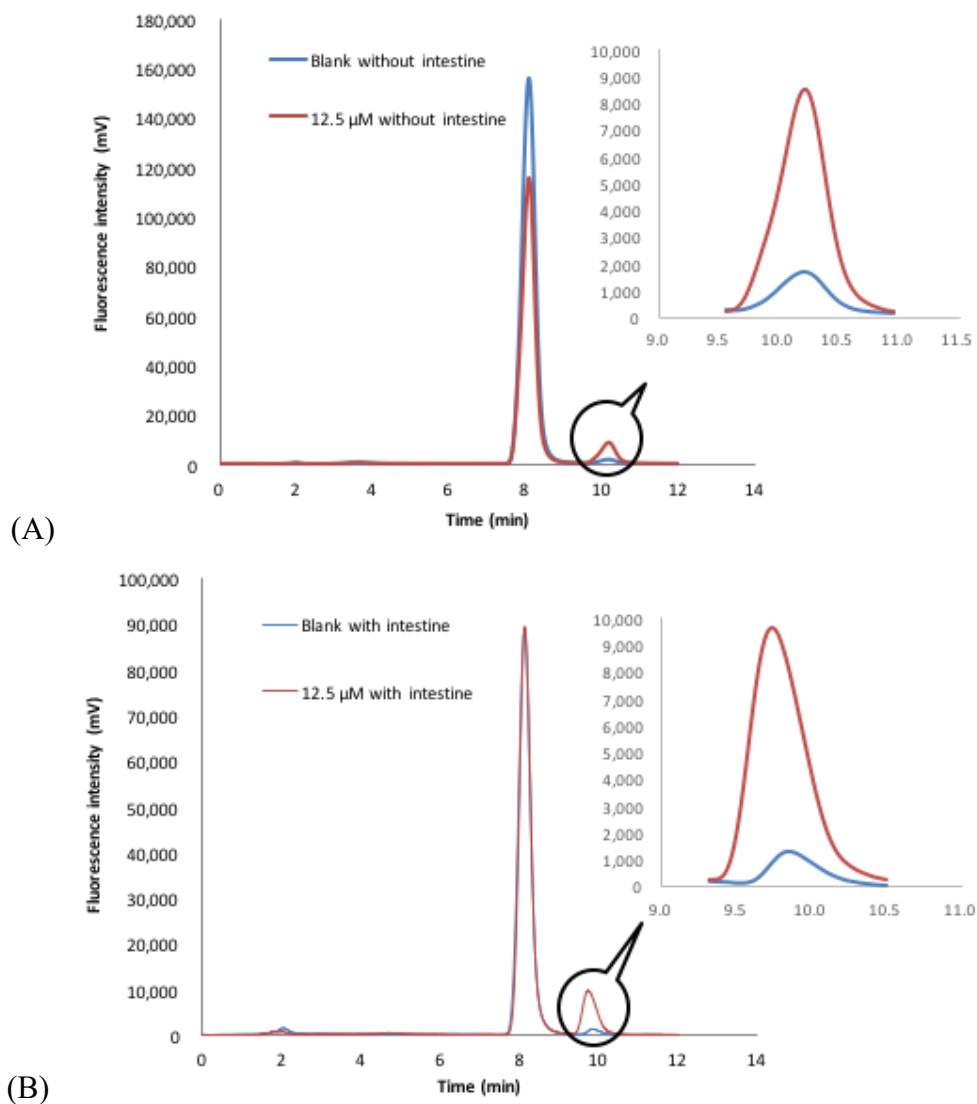


Figure 23. Chromatograms of NAT resulting from derivatization of 12.5 μM GSNO in the (A) absence and (B) presence of rat intestine by HPLC-spectrofluorimetry at $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 415 \text{ nm}$.

Typical validation data are shown in Table 1

Table 1. Validation data for GSNO quantification in the rat intestine

NO species	Linearity (6.25 – 50 μ M, n \geq 3)		Concentration (μ M)	Accuracy (%)	Precision (%) (n \geq 3)	
	Slope (a) ; intercept (b) ; determination coefficient (R^2)				Intra-day	Inter-day
GSNO			6.25	113.3	0.7	10.2
	a : 15308 \pm 1160		12.5	97.0	8.2	11.9
	b : -51365 \pm 56834		25	98.6	6.4	5.7
	R^2 : 0.996 \pm 0.005		37.5	104.0	4.6	4.3
			50	100.3	4.5	5.6
nitrite			6.25	99.9	2.9	11.3
	a : 16572 \pm 218		12.5	100.2	0.4	2.0
	b : -40458 \pm 29394		25	112.9	3.8	7.9
	R^2 : 0.995 \pm 0.005		37.5	101.8	2.1	7.9
			50	98.4	6.5	4.7

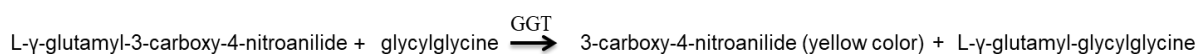
A 50 μ M pure NAT solution has been used to check extraction efficiency of the protocol described above, the recovery is 88 % according to peak area ratio of pure NAT with and without intestine (n = 1).

Recoveries when compared to GSNO standard solutions derivatized in the absence of intestine (injected concentration range: 6.25-50 μ M): ca. 85%

Measurement of γ -glutamyltransferase activity by spectrophotocolorimetry

1. Principle

γ -Glutamyltransferase (GGT, EC 2.3.2.2) is a membrane-bound protein that catalyzes the transfer of γ -glutamyl moieties to acceptor molecules such as amino acids or peptides. As GGT can catalyze the transfer of a γ -glutamyl group from the colorless substrate of L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide, to the acceptor of glycylglycine with production of the colored product of 3-carboxy-4-nitroanilide, the enzyme activity is related to the absorbance measured at 405 nm, with molar absorbance (ϵ) equal to 9,500 L.mol⁻¹.cm⁻¹ (Orlowski and Meister, 1963). The reaction is shown below:



Reference:

M. Orlowski, A. Meister, Gamma-Glutamyl-Rho-Nitroanilide - a New Convenient Substrate for Determination and Study of L- and D-Gamma-Glutamyltranspeptidase Activities, *Biochim. Biophys. Acta.* 73 (1963) 679–8.

2. Reagents

All solutions are prepared with fresh cold ultrapure water (> 18.2 M Ω .cm) and stored at 4°C in the dark for maximum one month unless otherwise specified.

2.1. Physiological media

Conservation time: one week at 4°C after preparation.

0.1 M Tris buffer (pH = 7.4): weigh 1.576 g of Trizma-HCl (Mw = 158 g/mol, ref Sigma T040), dissolve with 100 mL of ultrapure water; and adjust the pH to 7.40 \pm 0.05 with 10 M NaOH solution.

0.1 M Phosphate buffer (pH = 7.4): Weigh 1.36 g of KH₂PO₄ (Mw = 136.09 g/mol, ref Merck 646A148973) and 0.074 g of EDTANa₂·2H₂O (Mw = 372.24 g/mol), dissolve with 100 mL of ultrapure water, and adjust the pH to 7.40 \pm 0.05 with 10 M NaOH.

2.2. Substrate solution

Weigh 6.6 mg of L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide (Mw = 328.3 g/mol, ref Sigma AC98), 40.6 mg of MgCl₂·6H₂O (Mw = 203.31 g/mol, ref Sigma M9272) and 52.8 mg of glycylglycine (Mw = 132.1, ref Sigma G1002), dissolve with 20 mL of Tris buffer. Protect solution from light. The same solution is prepared without adding the substrate for the blank.

2.3. γ -glutamyltransferase (GGT)

Weigh 1 mg of GGT (26 UI*/mL, bovine kidney), dissolve with 1 mL of phosphate buffer, divide the solution in aliquots of 100 μ L (1.1 UI/mL) and store them at -20°C for maximum five months (determine the GGT concentration by the BCA Protein Assay kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ref Thermo Fisher 23225)).

2.5. 100 mM Serine-borate complex (SBC)

Weigh 0.503 g of sodium borate (Mw = 201.372 g/mol, ref Sigma S4500) and 0.2665 g of serine (Mw = 105.09, ref Sigma G100), dissolve with 25 mL of Tris buffer, adjust the pH to 7.40 \pm 0.05 with 10 M NaOH.

2.6. Solution with substrate and enzyme inhibitor

Prepare 20 mM SBC by mixing 5 mL of 100 mM SBC and 20 mL of 100 mM Tris buffer. Weigh and dissolve 6.6 mg of L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide (Mw = 328.3 g/mol, ref Sigma AC98) with 20 mL of 20 mM SBC solution. Protect solution from light. Prepare daily.

3. Methods

3.1. Measurement of purified GGT activity

Equilibrate the temperature of the incubator at 37°C, transfer 5 mL of solution with substrate to a 1.5 mL microtube, incubate at 37°C in the dark for 5 min. Next, dilute GGT (1.1 UI/mL) 1:10 in Tris buffer and add 25 μ L of GGT diluted solution to the EP tube above. The blank with substrate is prepared in the same way but without adding GGT. Read absorbance at 405 nm at different time shown in Table 1.

Table 1. Measurement of purified GGT activity at different time (n = 3)

Incubation time (min)	0	10	20	30
Group 1 (blank)	Substrate without GGT			
Group 2	Substrate with GGT			

3.2. Measurement of GGT activity in intact rat intestine

Remove Wistar rat intestine (length around 2 cm, weight around 100 mg) after sacrifice (anesthetized with sodium pentobarbitone (60 mg.kg⁻¹, intraperitoneal injection, Sanofi Santé Nutrition Animale, Libourne, France); administrated with heparin (1000 IU.kg⁻¹ heparin Choay, penis vein and sacrificed by exsanguination)). Rinse quickly with 1 mL cold PBS for 2 times, use tissue paper to dry the intestine each time. Next, place the intestine tissue in a 5-mL tube and add 5 mL of solution with/without substrate in the dark. The blank with substrate is prepared in the same manner but without intestine. Incubate all the tubes in the dark at 37°C for 10/20/30 min, transfer 1 mL of the solution at different time shown in the above table to Eppendorf tube, centrifuge at 14,000 rpm for 30 s, collect the supernatant to the plastic cuvette, and read absorbance at 405 nm shown in Table 2.

Table 2. Measurement of intestine GGT activity at different time intervals

Incubation time (min)	0	10	20	30
Group 1 (blank)	Substrate without intestine			
Group 2	Substrate with intestine			
Group 3	Without substrate but with intestine			

For manipulations with SBC (GGT inhibitor): the procedure is the same, except solution with substrate is replaced with solution with substrate and enzyme inhibitor.

3.3. Calculation

Calculate the concentration of produced 3-carboxy-4-nitroanilide by using the Beer-Lambert law ($A = \epsilon \times l \times c$, $\epsilon = 9,500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Take into consideration of the optical way ($l = 1 \text{ cm}$ in plastic cuvette and 0.15 cm on microplate) and the possible dilution factor. Next, define the enzymatic activity = $N_{3\text{-carboxy-4-nitroanilide}}/\text{incubation time}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

Specific enzyme activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteins) is calculated by dividing enzyme activity by the quantity of proteins (proteins are measured by the BCA Protein Assay kit).

- Purified GGT activity: $0.008 \mu\text{mol}/\text{min}$
- Specific purified GGT activity: $3.2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteins
- Intestine GGT activity: $0.015 \mu\text{mol}/\text{min}$
- Specific intestine GGT activity: $0.006 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteins

Permeability studies of S-nitrosothiols in rat isolated intestine using Ussing chamber

1. Principle

The Ussing chamber was invented by the Danish [zoologist](#) and physiologist [Hans Henriksen Ussing](#) in 1946. The basic design of a classical Ussing chamber is illustrated in Figure 1. The membrane (cells, tissues or synthetic one) is situated vertically in the middle of the model, and separates it into two compartments (equal volume): a donor compartment (also referred to the apical, mucosal or luminal-side membrane) and an acceptor compartment (also referred to the basolateral, serosal, nutrient, or blood-side membrane). The Ussing chamber is an apparatus for measuring the transport of ions, nutrients or drugs across various epithelial cells, tissues or synthetic membrane. Thus, it is useful to explore drug absorption process and barrier functions of living tissues. It is widely used in the pharmaceutical industry as an *ex vivo* model to predict the absorption of orally administered drugs (Billat et al., 2017). We presently use it for studying the permeability of S-nitrosothiols (RSNOs) by quantifying RSNOs and their metabolites (nitrite and nitrate ions).

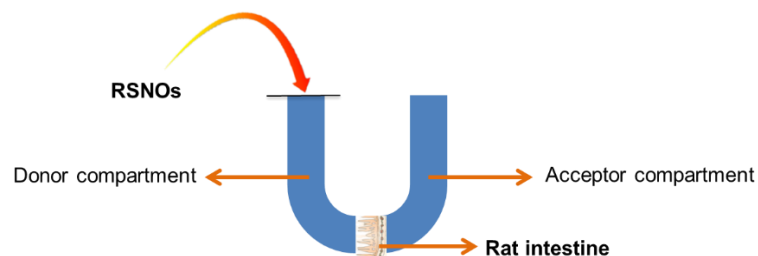


Figure 1. Scheme of Ussing chamber for studying drug permeability, e.g. S-nitrosothiols (RSNOs)

References:

Billat, P.-A., Roger, E., Faure, S., Lagarce, F., 2017. Models for drug absorption from the small intestine: where are we and where are we going? *Drug Discovery Today* 22, 761–775. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.007>

E. Neirinckx, C. Vervae, J. Michiels, S. de Smet, W. van den Broeck, J.P. Remon, P. de Backer, S. Croubels, Feasibility of the Ussing chamber technique for the determination of in vitro jejunal permeability of passively absorbed compounds in different animal species, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 34 (2011) 290–297. doi:10.1111/j.1365-2885.2010.01218.x.

2. Reagents

All solutions are prepared with fresh cold ultrapure water (> 18.2 MΩ.cm) and stored at 4°C in the dark for maximum one month unless otherwise specified.

2.1. Physiological medium

Conservation time: to prepare daily.

Krebs solution: weigh 6.90 g NaCl, 0.35 g KCl, 1.80 g glucose, 0.16 g KH₂PO₄, 2.02 g NaHCO₃, 0.14 g MgSO₄, 0.35 g CaCl₂·2 H₂O. Dissolve in 1.0 L of ultrapure water. Equilibrate at 37 °C in a water bath for 30 min with an O₂/CO₂ (95 %/5 %) mixture bubbling before to adjust pH to 7.4 (by using a pH meter) with 1.0 M HCl. Solution should be kept at 37°C during the experiment, with continuous bubbling.

3. Methods

3.1. Preparation of rat intestine

Set the Ussing chamber at 37 °C with an O₂/CO₂ (95 %/5 %) mixture bubbling. Harvest Wistar rat intestine (ileum) after sacrifice (anesthetized with sodium pentobarbitone (60 mg.kg⁻¹, intraperitoneal injection, Sanofi Santé Nutrition Animale, Libourne, France)). Remove the fat tissue along the mesenteric attachment and open the intestine longitudinally. Rinse segments from the distal portion of the ileum with pre-heated Krebs solution. Mount the intestine (length: around 2 cm, weight: around 100 mg) as a flat sheet on pins of the tissue holding device, followed by fitting the device to the Ussing chamber with the help of screws. Add 2.5 mL of Krebs solution in both donor and acceptor compartments and equilibrate for 10 min. Measure the transepithelial electrical resistance (TEER) value with electrodes (Electrode kit for Ussing chamber, WPI). Discard tissue samples that have a TEER value less than 30 Ω.cm² directly after having placed the intestine.

Replace the Krebs solution in acceptor compartment with 2.5 mL of fresh one and the solution in donor compartment with 2.5 mL of RSNOs solution (e.g. 100 μ M) or Krebs solution. Next, incubate intestine at 37 °C with bubbling for maximum 2 h, harvest 0.25 mL of the medium from acceptor compartment at regular time intervals and replace it with pre-heated buffer. Measure also TEER values at these same times.

3.2. Quantification of nitrite, nitrate ions and RSNOs in both compartments

See protocol entitled “*Nitrite, nitrate ions and S-nitrosothiols measurement using 2,3-diaminonaphthalene assay by spectrofluorometry*” and “*Nitrite, nitrate ions and S-nitrosothiols measurement using 2,3-diaminonaphthalene assay by HPLC coupled with tandem mass spectrometry*”.

3.3. Quantification of nitrite ion and RSNOs in the rat intestine

See protocol entitled “*Quantification of S-nitrosothiols in the rat intestine with 2,3-diaminonaphthalene assay by HPLC coupled with fluorescence detection*”.

3.4. Quantification of proteins in the rat intestine

Quantify intestinal proteins with BCA assay, see procedure 3.2 from protocol entitled “*Western blot for protein disulfide isomerase identification in tissues*”.

3.5. Calculations

Calculate the cumulative amounts of RSNOs permeated through the intestine by the concentrations measured in the acceptor compartment. Calculate the apparent permeability coefficient (P_{app}) values using the following equation:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

dQ/dt ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) refers to the quantity of permeated NO related species (dQ) in the acceptor compartment at the time of quantification (dt), A refers to membrane diffusion area (0.25 cm^2), and C_0 refers to the initial concentration of RSNO in the donor compartment.

Protein extraction from intestine

Principal

Maximal extraction and solubilization of protein from tissue is important to make the whole protein complement available for proteomic analysis. It also helps to maximize reproducibility and to minimize waste. Minimal degradation of the protein amino acid backbone or dephosphorylation is essential to preserve the analytical utility of the extract.

RIPA buffer is the lysis buffer. PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride) is a serine protease inhibitor. Na_3VO_4 (sodium orthovanadate) is a phosphatase inhibitor. As to protease inhibitor cocktail, just as the name suggests, it's used to inhibit protease. So all the components we use here is to obtain maximal extraction and solubilization of protein and minimal degradation of the protein amino acid backbone or dephosphorylation.

Material

RIPA buffer			
NaCl	Sigma	ref S-9888	FW=58,44
Na₂HPO₄	Sigma	ref S-0876	FW=142,0
KH₂PO₄	Merck	ref 646A148973	FW=136,09
NP40	Euromedex	ref UN3500-A	FW=603
DOC	Sigma	ref D 6750	
SDS	Sigma	ref L-4509	FW=288,4
Just before the manipulation			
PMSF	Sigma	ref P 7626	FW=174,2 10µl/ml RIPA
Na₃VO₄	Sigma	ref S 6508	FW=183,9 10µl/ml RIPA
PIC	Roche	ref	10µl/ml RIPA

NaCl: sodium chloride; **Na₂HPO₄**: sodium phosphate anhydrous dibasic; **KH₂PO₄**: potassium dihydrogen phosphate; **NP40**: Nonidet P40; **DOC**: Deoxycholate de sodium; **SDS**: Lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate; **PMSF**: phenylmethanesulfonyl fluoride ; **Na₃VO₄**: sodium orthovanadate
PIC: Cocktail antiprotease

Stock Solutions

RIPA buffer	NaCl	8 g/l
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,24 g/l
	NP40	1 %
	DOC	0,5 %
	SDS	0,1 %

in ultrapure water (conserve the aliquots in -20°C)

PMSF 10 mg/ml d'éthanol (sensible a la lumière)
conserve the aliquots in -20°C

Na₃VO₄ à 100mM 18,39 mg/ml of ultrapure H₂O
Adjust pH to 9
Boil the solution till colorless
Cool to room temperature
Adjust pH to 9

Boil the solution till colorless
Cool to room temperature
Repeat the above steps till pH to 9 after boiling and cooling
Adjust volume with water
conserve the aliquots in -20°C

PIC 10µL/mL de RIPA
conserve the aliquots in -20°C

Tools and apparatus

Liquid nitrogen
Eppendorf tube 1.5 mL (the quantity number depends on your sample)
Mortar-pestle
Centrifuge machine (Heraeus instruments)

Protocol

1. Mash the tissue with mortar-pestle in liquid nitrogen.
2. Weight the mass of the tissue.
3. Calculate the volume of lysis buffer needed to extract the protein from tissue (1mg tissue/ 4µL buffer)
4. Defreeze all the components of lysis buffer: RIPA, PMSF, Na₃VO₄ and cocktail anti-protease in a flowing water bath
5. Prepare the lysis buffer:
PMSF 10µL/mL RIPA
Na₃VO₄ 10µL/mL RIPA
Protease inhibitor cocktail 10µL/mL RIPA
6. Add the corresponding volume of lysis buffer into the tissue.
7. Incubate 10 min on the ice.
8. Homogenize the mixture by a 1 mL syringe and blue needle. Pull and push the syringe 10 times.
9. Freeze and defreeze the mixture 3 times by liquid nitrogen and 37 °C water bath.
10. Balance the tube and then centrifuge at 12000 rpm for 30 min at 4 °C.
11. Transfer the supernatant and divide into different aliquots. Conserver at -80°C

Western Blot protocol

Principle:

Western blotting uses specific antibodies to identify proteins that have been separated based on size by gel electrophoresis. The immunoassay uses a membrane made of nitrocellulose or PVDF (polyvinylidene fluoride). The gel is placed next to the membrane and application of an electrical current induces the proteins to migrate from the gel to the membrane. The membrane can then be further processed with antibodies specific for the target of interest, and visualized using secondary antibodies and detection reagents.

Solutions preparation:

2.1 Material

Reagent information

Reagents	Company	Reference	MW
Trizma@Base (Tris-HCl)	Sigma	T-6066	121.1
Lauryl sulfate (SDS)	Sigma	L-4509	288.4
Ammonium persulfate (APS)	Sigma	A-3678	228.2
Temed	Carlo Erba	600461	
2-mercaptoethanol	Merck	12006	78.13
Sample buffer laemmli x2	Sigma	S-3401	
Glycine	Sigma	G-7126	75.07
Sodium chloride (NaCl)	Sigma	S-9888	58.44
Ethanol			
Tween 20	Sigma	P-1379	
Isopropanol	Sigma	I-9516	60.10
Immobilon™-P(PVDF)	Millipore	IPVH00010	
Mini Trans-Blot filter paper	Bio-Rad	1703932	
Ponceau S (rouge Ponceau)	Sigma	P-3504	760.6
Albumine Bovine, fractionV	Eruomedex	04-100-810C	
Acetic acid 100%	Prlabo	20-104.323	
ECL™	Amersham Bioscience	RPN2106	
<i>Western blotting detection reagent</i>			
Kodak LX24(revelateur)	Merck Eurolab	5070933	
Kodak AL4(fixteur)	Merck Eurolab	5071071	
Hyperfilm™ MP(film photo graphique)	Amersham Bioscience	RPN1675K	

All Solutions are prepared with ultrapure water (18,2 MΩ•cm).

■ Solutions for gel preparation:

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

18.165 g of Tris/100 mL ultrapure water, adjust pH to 8.8 with HCl (37%), filter through 0.22 μm and conserve at 4 °C

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

6.055 g of Tris/100 mL ultrapure water, adjust pH to 6.8 with HCl (37%), filter through 0.22 μm and conserve at 4 °C

SDS 10%

10 g of SDS/100 mL ultrapure water, agitate gently to dissolve the SDS to avoid bubble, conserve at room temperature.

APS (ammonium persulfate) 10%

1 g APS/100 mL ultrapure water, then aliquot in 400-μL tubes, conserve at -20°C.

■ Solution for sample preparation:

Laemmli 2X sample buffer

2-mercaptoethanol 50 μL + 950 μL Laemmli 2X sample buffer, freshly prepared.

**Migration buffer: for 1 L 10X stock solution**

Reagents	Concentration	Amount
Tris	10 mM	30 g
Glycine	1.92 M	144 g
SDS	1% (m/V)	10 g

Fill the 1 L volumetric flask with ultrapure water. Conserve at 4 °C

1X working solution (extemporaneously prepared): dilute 100 mL of 10X stock solution to 1 L with ultrapure water. Use at room temperature.

pH ≈ 8.3, don't need to adjust pH.

Transfer buffer: for 1 L 10X stock solution

Reagents	Concentration	Amount
Tris	480 mM	58.1 g
Glycine	390 mM	29.3 g
SDS	0.375 % (m/V) (13 mM)	3.75 g

Fill the 1 L volumetric flask with ultrapure water. Conserve at 4 °C

1X working solution (extemporaneously prepared): 100 mL of 10X stock solution + 200 mL ethanol, fill to 1 L with ultrapure water. Conserve at 4 °C and use cold solution.

pH ≈ 9.2, don't need to adjust pH.

Washing buffer: for 1 L 10X stock solution

Reagents	Concentration	Amount
Tris	200 mM	24.2 g
NaCl	1.5 M	87.5 g

Fill the 1 L volumetric flask with ultrapure water. Conserve at 4 °C

Adjust pH to 7.4 with HCl (37%).

1X working solution: 100 mL of 10X stock solution, fill to 1 L with ultrapure water, add 1 mL of Tween 20. Conserve at 4 °C.

Gel preparation:

Different concentration of acrylamide in the separating gel solution can be used for different molecule weight of protein. The less amount of acrylamide is used; the bigger molecule weight of protein can be separated. 10% is mostly usually used concentration.

- Place the gel plate holder on a table. Adjust the position to horizontal.
- Check the leakage of the glass plate with distilled water
- Prepare the gel solution according to the table of gel preparation which is in the last page.

10% APS and TEMED are used for solidifying the solution, so both gels solution can be prepared at the same time. Just pay attention that TEMED is added at the end when you need it.

- Add 10 mL separating gel solution into the plate. Add 500 µL isopropanol to separate the media from air. Wait for 15-30 min till the gel is solidified.

10 mL separating gel solution and 4 mL stacking solution/1 gel

- Remove the isopropanol and rinse with distilled water.
- Overlay the separating gel with stacking gel (4 mL)
- Insert the comb. Ensure that there is not bubble
- Wait till the gel is solidified.

Sample preparation:

- Set the temperature of heating plate to 100 °C and switch on it.
- Calculate the volume of protein extract to ensure 20-30 µg proteins in each well.

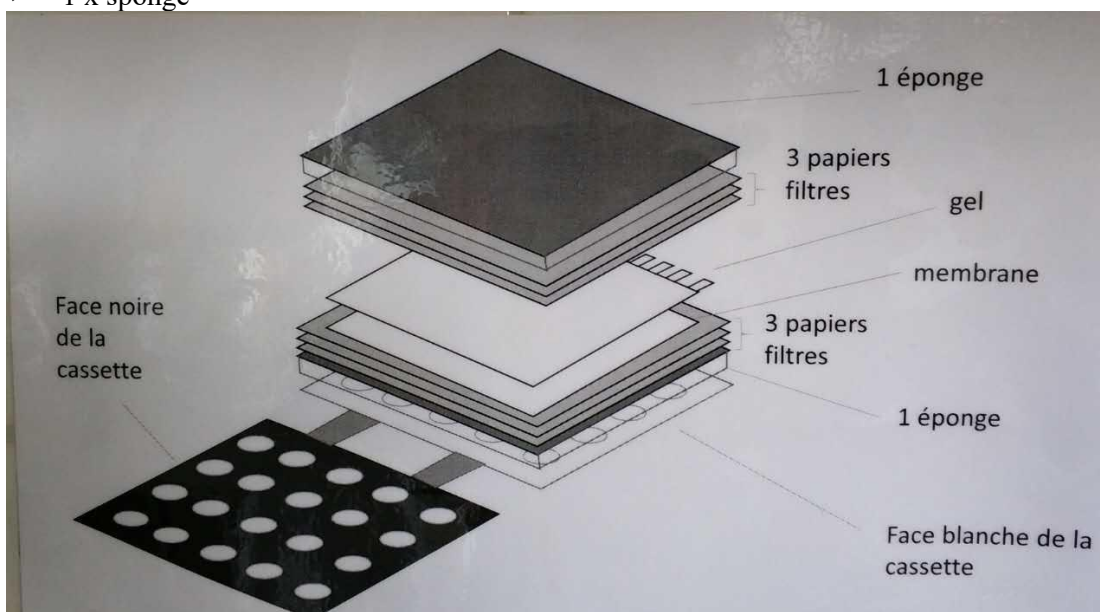
- Add the same volume of Laemmli 2X sample buffer
- Heat the sample with heating plate for 5 min at 100 °C

Electrophoresis

- Place gel inside the electroporator. (*attention: bigger glass plate is face to outside*)
- Pour the migration buffer into the electroporator, firstly inside, then outside. Ensure that the buffer covers the gel completely. Remove the comb carefully
- Add sample and marker carefully to each well (according to the volume calculated before, to get 20-30 µg proteins in each well). Connect to a power supply (*attention: red to red, black to black*)
- Run the stacking gel with low voltage (80V) for 15 min to 20 min till the loading buffer was concentrated in one line. Then turn up to higher voltage (110 V) for separating gel for around 1 h 30 min till the dye front runs off the bottom of the gel.

Transfer:

- Cut 6 filter paper sheets to fit the measurement of gel (6 cm * 8.5 cm minimum) and one membrane of 0.2 µm (nitrocellulose or PVDF) (or 0.45 µm for bigger protein) with the same dimension.
- If PVDF membrane is chosen, it should be immersed in methanol at least 30 sec to activate the positively charged groups on the membrane, in order to enhance reacting with negatively charged protein.
- Wet two sponges, the 6 filter papers and the membrane (5 min maximum) in pre-cold transfer buffer in a plate with transfer buffer, conserve at 4°C
- Take out the glass plate from the electroporator, separate the plate and cut the stacking gel. Cut a corner of the gel to remember the sides.
- Put the gel in transfer buffer (5 min maximum)
- Prepare a transfer sandwich as follow: place the white side down and black side up
- ✓ 1 x sponge
- ✓ 3 x filter papers
- ✓ 1 x membrane
- ✓ 1 x gel
- ✓ 3 x filter papers
- ✓ 1 x sponge



Ensure there is no bubbles between the gel and membrane, exclude the bubbles by finger slowly, squeeze out the extra liquid by a rotor

- Relocate the sandwich to transfer apparatus, which should be placed in ice to avoid del deformation because of heating produce by high electric current. Put a magnetic stirrer inside the apparatus. Add transfer buffer into the apparatus and ensure that the sandwich is covered by the buffer. Place the electrodes on the top of the apparatus.
- Begin the transfer at 350 mA for 45 min.
- After the transfer, take out the sandwich from the apparatus, open it carefully and take out the membrane. Use different color pens (red, blue, green) to mark clearly all the bands: this is to avoid missing during the next steps.
- Verification of transfer (in option): color of the membrane with a solution (rouge Ponceau S) for 5 min on a shaker with speed of 15 rpm, then remove the color with 5-6 distilled water till the membrane back to white color.

Blocking:

- Block the membrane with 25 mL TBST/5 % non-fat milk (or BSA) under agitation at room temperature for 1 hour.

Primary antibody incubation:

- Cut the redundant part of the membrane (*to minimize the dosage of the antibody*)
- Prepare a plastic bag which is bigger than the membrane and write antibody information, dilution times, dilution medium date and experimenter's name on the bag.
- Dilute the first antibody solution in TBST/5 % non-fat milk (or BSA) (normally is 1:1000, but check the recommended dilution from the company and check in the literature which has the same sample and same antibody; the final volume for one membrane is around 5 mL in total)

β-catenin, MA1-2001, PIERCE, 1:800 5% non-fat milk/TBST;

E-cadherin, SC-7870, Santa Cruz, 1:700 5% BSA/TBST;

Occludin, 71-1500, Invitrogen, 1:600 5% non-fat milk/TBST;

Claudin-1, 37-4900, Invitrogen, 1:600 5% non-fat milk/TBST;

IL-1β, ab9722, abcam, 1:1000 5% non-fat milk/TBST;

TNF-α, ab6671, abcam, 1:1000 5% BSA/TBST

- Place the membrane in the plastic bag
- Pour the first antibody solution carefully inside the bag, remove all the bubbles inside the bag and seal it.
- Incubate at 4 °C overnight in a tray, use adhesive tape to fix all the bags, switch on the agitator at a speed 15 rpm.
- Conserve the antibody solution at -20 °C for repeated use (normally 3 times maximum).

Reference proteins:

If the reference protein is conjugated with Horseradish Peroxidase (HRP), it is not necessary to incubate with another second antibody. Then, use the dilution which is recommended by the company and follow the same protocol above.

β-actin, ab197277, abcam, 1:10,000 5% BSA/TBST; room temperature, 1h

Washing:

- Take out the membrane from the plastic bag. Then put it in a small tray.
- Conserve the remaining antibody solution in the plastic bag at -20 °C. It can be reused for 2-3 times.
- Rinse it rapidly with TBST firstly to remove most of the residual liquid. Then rinse the membrane 10 min, 4 times, on a shaker with a speed of 70 rpm at room temperature.

Reference protein:

For reference proteins which is conjugated with HRP, the membranes can go directly revelation ECL step.

Secondary antibody incubation:

- Prepare a plastic bag which is bigger than the membrane and write antibody information, dilution times, dilution medium date and experimenter's name on the bag.
- Dilute the second antibody solution in TBST/5 % non-fat milk (or BSA) (recommend 1:10,000)
- Incubate it on a shaker with a speed of 15 rpm at room temperature for 1 hour

Washing:

Same process with the first antibody washing.

- Take out the membrane from the plastic bag. Then put it in a small tray.
- Rinse it rapidly with TBST firstly to remove most of the residual liquid. Then rinse the membrane 10 min, 4 times, on a shaker with a speed of 70 rpm at room temperature.

Revelation ECL

Principal: Enhanced chemiluminescence (ECL) is a method which provides highly precise detection of proteins from Western blots. In the chemiluminescence reaction horseradish peroxidase (HRP) catalyzes the oxidation of luminol into a reagent which emits light when it decays. Since the oxidation of luminol is catalyzed by horseradish peroxidase, and the HRP is complexed with the protein of interest on the membrane, the amount and location of light that HRP catalyzes the emission of, is directly correlated with the location and amount of protein on the membrane.

- Mix the ECL western blot substrates 500 μ L + 500 μ L
- Dry the membrane with tissue. Place it on a flat plastic membrane
- Cover the membrane with 1 mL ECL solution
- Incubate in dark for 5 min.
- Dry the membrane with tissue, put it on a plastic membrane.
- Expose the membranes by following the instructions of "FUSION" software.
- Put the membrane back into the tray
- Conserve the membranes at -20 °C after exposure in a plastic bag without medium (not necessary to dry it)

Gel preparation (SDS-PAGE Tris/Glycine)

Acrylamide 40%

Acrylamide	Component	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6% (~150 kDa)	MQ water	2.8	5.6	8.6	11.6	14.4	17.4	23.2	29.0
	Acrylamide	0.8	1,5	2.3	3	3.8	4.5	6.0	7.5
	Tris 1.5M	1.3	2,5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.00	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8% (70 kDa -150 kDa)	MQ water	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
	Acrylamide	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
	Tris 1.5M	1.3	2,5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.00	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10% (50 kDa -70 kDa)	MQ water	2.3	4.8	7.1	9.6	11.9	14.4	19.2	24.0
	Acrylamide	1.3	2,5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	Tris 1.5M	1.3	2,5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.00	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12% (35 kDa - 50 kDa)	MQ water	2.1	4.3	6.4	8.6	10.7	12.9	17.2	21.5
	Acrylamide	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5	9.0	12.0	15.0
	Tris 1.5M	1.3	2,5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.00	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15% (~35 kDa)	MQ water	1.7	3.5	5.3	7.1	8.8	10.6	14.2	17.7
	Acrylamide	1.9	3.8	5.6	7.5	9.4	11.3	15.0	18.8
	Tris 1.5M	1.3	2,5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.00	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

Acrylamide	Component	1 mL	4 mL	8 mL	16 mL	24 mL	6 mL	8 mL	10 mL
Stacking	MQ water	0.72	2.92	5.83	11.66	17.49	4.37	5.83	7,29
	Acrylamide	0.13	0.50	1.00	2.00	3.00	0.75	1.00	1.25
	Tris 0.5M	0.13	0.50	1.00	2.00	3.00	0.75	1.00	1.25
	SDS 10%	0.01	0.04	0.08	0.16	0.24	0.06	0.08	0.10
	APS 10%	0.01	0.04	0.08	0.16	0.24	0.06	0.08	0.10
	TEMED	0.00	0.004	0.008	0.016	0.024	0.006	0.008	0.01

S-nitrosoglutathion et perméabilité intestinale : de la mise en place d'un modèle de chambre de Ussing à l'étude de l'impact de ce donneur de monoxyde d'azote sur la barrière intestinale

Résumé : Le monoxyde d'azote (NO) est connu pour ses nombreuses actions afin de maintenir l'homéostasie de la barrière intestinale, régulant la sécrétion de mucus, le stress oxydant, le système immunitaire... Le S-nitrosoglutathion (GSNO), donneur de NO naturellement produit par l'organisme, a montré une action bénéfique sur le renforcement de la barrière intestinale. L'enjeu est aujourd'hui de comprendre les mécanismes inhérents à cette observation. Pour ce faire une étude en Chambre de Ussing a été menée. Une fois le modèle d'étude validé par le suivi de marqueurs de perméabilité, les études histologiques et d'expression des protéines de jonctions cellulaires, le métabolisme du GSNO administré dans la lumière de l'intestin ont été explorés. Également, l'effet du GSNO sur la perméabilité de la barrière intestinale a été étudié. Les résultats permettent aujourd'hui d'envisager le GSNO comme une piste thérapeutique intéressante et prometteuse aux multiples applications possibles : intestinales, cardiovasculaires ou encore cérébrales.

Mots-clefs : monoxyde d'azote, S-nitrosoglutathion, barrière intestinale, chambre de Ussing, métabolisme.

S-nitrosoglutathione and intestinal permeability: from the implementation of a Ussing chamber model to the study of the impact from this nitric oxide donor on the intestinal barrier

Abstract: Nitric oxide is known for its many actions to maintain intestinal barrier homeostasis, regulating mucus secretion, oxidative stress, immune system... S-nitrosoglutathione (GSNO), a nitric oxide donor naturally produced by the organism, has shown a beneficial effect on the intestinal barrier reinforcement. Nowadays, challenge is to understand the mechanisms inherent to this observation. For that, a Ussing chamber study was performed. After the model validation, by following permeability markers, histological studies, and cell junction proteins expression study, the GSNO metabolism administered in the intestinal lumen was explored. Also, GSNO effect on the intestinal barrier permeability was evaluated. Results allow today to consider GSNO as an interesting and promising drug candidate, in the context of intestinal, cardiovascular or cerebral pathologies.

Keywords: nitric oxide, S-nitrosoglutathione, intestine barrier, Ussing chamber, metabolism.