

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى أسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

THESE de DOCTORAT de 3^{ème} cycle

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Valorisation de substances naturelles et innovation thérapeutique

Option : Sciences Biologiques

Intitulée

**Rôle des marqueurs biologiques dans le contrôle de
l'homéostasie intestinale en période néonatale :
Impact d'un traitement au citrate de caféine**

Présentée par : M^{lle} BOUABSA Foufa

Le 03/12/2022

Devant le jury :

Président	CHOUTAH Ourida	Professeur	Université M. S. de Mascara
Examineur	DEBIB Aicha	Maître de conférences A	Université M. A. de Tipaza
Examineur	HAMMOUDI Abdelhamid	Professeur	Université I. K. de Tيارت
Examineur	BACHIR RAHO Ghalem	Professeur	Université M. S. de Mascara
Examineur	BENDAHA Mohammed el Amine	Maître de conférences A	Université M. S. de Mascara
Directrice de Thèse	TIR TOUIL Aicha	Professeur	Université M. S. de Mascara

Remerciements

Avant tout je remercie Dieu à qui je dois obéissance et reconnaissance.

Tout au long de mon parcours de mon doctorat, j'ai reçu beaucoup de soutien et d'aide.

*Je tiens d'abord à remercier ma superviseure, madame la **professeure Tîr touil-Meddah A.**, dont l'expertise a été inestimable dans la formulation des questions de recherche et de la méthodologie. Vos commentaires perspicaces m'ont poussé à affiner ma pensée et à porter mon travail à un niveau supérieur. Merci pour vos conseils, pour la grande compétence et l'humanisme qui vous caractérisent. Vous avez tout mon respect.*

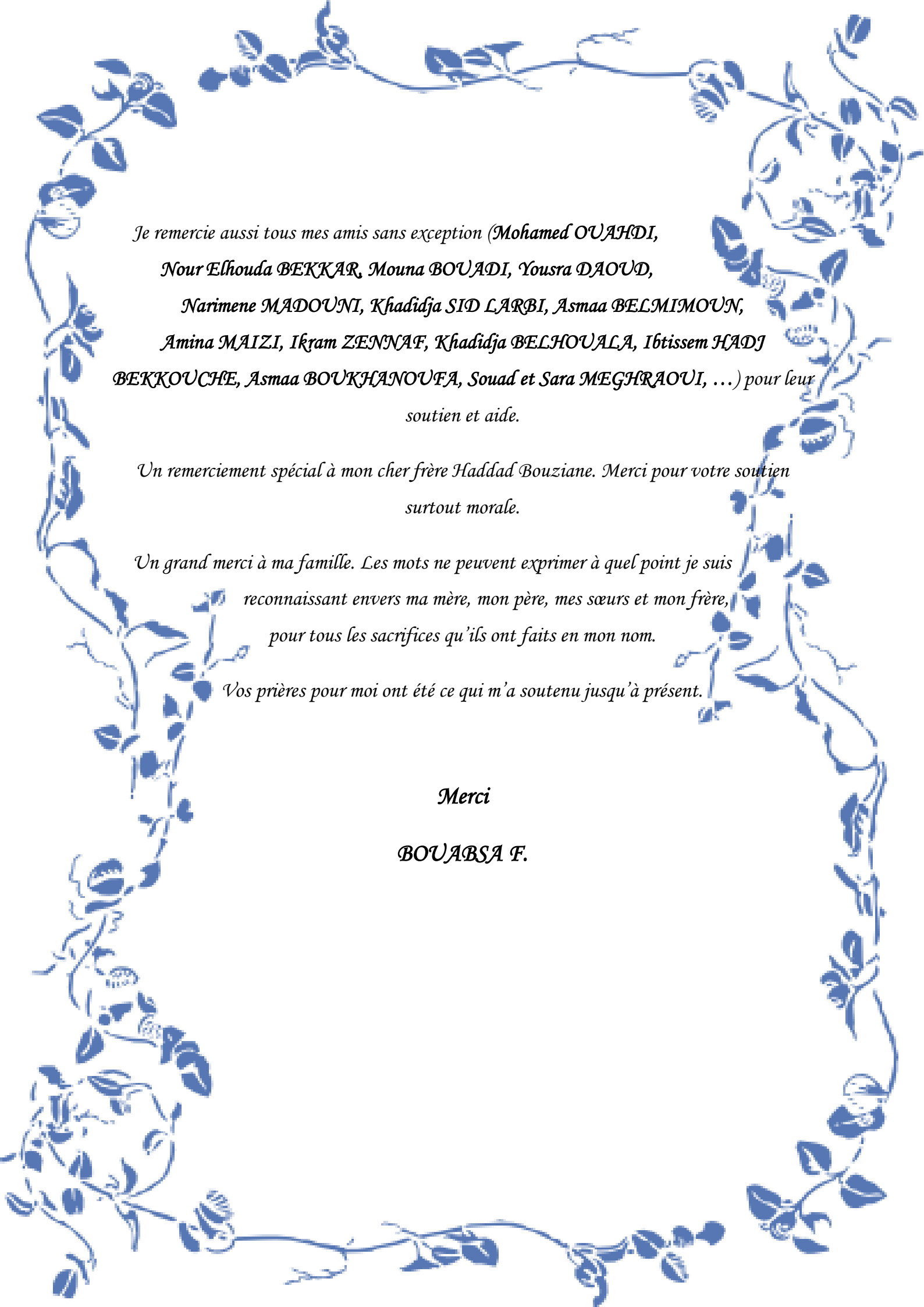
*J'aimerais également remercier les membres de Jury, soit Madame la présidente **Pr. CHOUITAH Ourida**, et les examinateurs, **Dr. DEBIB Aicha (MCA)**, **Pr. HAMMOUDI Abdelhamid**, **Pr. BACHIR RAHO Ghalem**, et **Dr. BENDAHA Mohammed el Amine (MCA)**.*

C'est un honneur et un immense plaisir de présenter ce travail devant vous, merci d'avoir aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse.

*J'adresse mes vifs remerciements aux Professeurs **Mazhr Salim Alzoubi** de l'université de Yarmouk-Jordanie et **Yasser Bustanji** directeur du centre de recherche Hamdi Mango-Jordanie, de m'avoir accueillis au sein de leurs laboratoires.*

Je remercie cordialement tout le personnel de la station expérimentale et des laboratoires de la faculté SNV de l'université Mustapha Stambouli de Mascara, pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je voudrais aussi remercier tous mes enseignants qui m'ont aidé et encouragé de près ou de loin.

A decorative border of blue roses and green leaves surrounds the text.

*Je remercie aussi tous mes amis sans exception (Mohamed OUAHDI,
Nour Elhouda BEKKAR, Mouna BOUADI, Yousra DAOUD,
Narimene MADOUNI, Khadidja SID LARBI, Asmaa BELMIMOUN,
Amina MAIZI, Ikram ZENNAF, Khadidja BELHOUALA, Ibtissem HADJ
BEKKOUCHE, Asmaa BOUKHANOUEFA, Souad et Sara MEGHRAOUI, ...) pour leur
soutien et aide.*

*Un remerciement spécial à mon cher frère Haddad Bouziane. Merci pour votre soutien
surtout morale.*

*Un grand merci à ma famille. Les mots ne peuvent exprimer à quel point je suis
reconnaissant envers ma mère, mon père, mes sœurs et mon frère,
pour tous les sacrifices qu'ils ont faits en mon nom.*

Vos prières pour moi ont été ce qui m'a soutenu jusqu'à présent.

Merci

BOUABSA F.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents

Mes très chères sœurs : Ikram, Kawthar et Amira.

A mon chère petit frère : Yahya

*A la mémoire de mes grands-parents, je sais qu'ils auraient
été très contents pour moi*

A toute la famille BOUABSA

A toute la famille BENBEKKAR

A tous mes enseignants et enseignantes

A tous mes amis et collègues

Résumé

La caféine est une molécule thérapeutique utilisée en néonatalogie pour traiter l'apnée de la prématurité. Elle exerce de nombreux effets sur différents systèmes corporels. Cependant, peu est connu concernant ces effets sur le développement de la fonction gastro-intestinale du nouveau-né. Dans le présent travail nous avons évalué l'impact d'un traitement au citrate de caféine sur les marqueurs biologiques assurant le contrôle de l'homéostasie intestinale à savoir, la perméabilité gastro-intestinale, l'implantation du microbiote intestinal, la translocation bactérienne et différents paramètres biochimiques chez les rats nouveau-nés.

Les rats ont été divisés en trois séries (S1=15j, S2=30j et S3=60j), chaque série a été divisée en deux groupes. Les groupes traités ont reçu par voie orale une dose standard du citrate de caféine (12 mg/kg par jour) et les groupes contrôles ont reçu un placebo. Les animaux ont été pesés quotidiennement jusqu'au jour du sacrifice. Des échantillons de sang, des ganglions lymphatiques mésentériques (MLN) et des organes (foie, rate, thymus, iléon et colon) ont été prélevés aseptiquement. Ensuite, les différents niveaux de biomarqueurs (D-lactate, Phosphatase alcaline intestinale (PAI), Lactate Déshydrogénase (LDH), Malondialdéhyde (MDA), Catalase (CAT), Superoxyde dismutase (SOD) et Glutathion (GSH)) ont été évalués. Aussi, des analyses microbiologiques ont été réalisées pour évaluer l'implantation du microbiote et la translocation bactérienne.

Les résultats préliminaires ont montré que l'administration de caféine diminuait le niveau de translocation bactérienne au fil du temps. Le traitement a réduit les taux plasmatiques tissulaires de D-lactate ($p < 0,05$). De plus, la caféine a induit une perturbation des concentrations des paramètres biochimiques et des biomarqueurs du stress oxydatif. En effet, les enzymes hépatiques (AST et ALT) ont augmenté de manière significative ($p < 0,05$). Les niveaux de glutathion (GSH) étaient significativement plus élevés dans les groupes traités à la caféine ($75,12 \pm 0,32$; $51,98 \pm 1,12$ U/mg ; $p < 0,05$) par rapport aux groupes témoins ($40,82 \pm 0,25$; $42,91 \pm 0,27$ U/mg ; $p < 0,05$) dans le l'iléon et le côlon, respectivement. La caféine a réduit les taux de la PAL intestinale, par contre elle n'a montré aucun effet sur la LDH dans l'iléon.

L'ensemble de ces résultats montre bien que le traitement au citrate de caféine améliore la perméabilité gastro-intestinale du rat nouveau-né en cette période fragile. La caféine a permis la réduction de la translocation bactérienne et des taux de la D-lactate, et a présenté des effets bénéfiques sur le système antioxydant intestinal.

Mots clés : citrate de caféine, néonatalogie, microbiote intestinal, translocation bactérienne, perméabilité intestinale, marqueurs biologiques.

Abstract

Caffeine is a therapeutic molecule used in neonatology to treat apnea of prematurity. It has many effects on different body systems. However, little is known about these effects on the development of gastrointestinal function of the newborn. In this work we have evaluated the impact of a treatment with caffeine citrate on biological markers ensuring the control of intestinal homeostasis, namely, gastrointestinal permeability, implantation of intestinal microbiota, bacterial translocation and different biochemical parameters in newborn rats.

The pups were divided into three series (S1=15j, S2=30j and S3=60j), each series was divided into two groups. The groups treated received a standard oral dose of caffeine citrate (12 mg/kg daily) and the control groups received placebo. The animals were weighed daily until the day of sacrifice. Blood samples, mesenteric lymph nodes (MLN) and organs (liver, spleen, thymus, ileum and colon) were collected aseptically. Then, the different levels of biomarkers (D-lactate, intestinal alkaline phosphatase (PAL), Lactate dehydrogenase (LDH), Malondialdehyde (MDA), Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD) and Glutathione (GSH)) were evaluated. Microbiological analyses were also conducted to assess microbiota implantation and bacterial translocation.

Preliminary results showed that caffeine administration decreased the level of bacterial translocation over time. The treatment reduced plasma and tissue levels of D-lactate ($p < 0.05$). In addition, caffeine induced a disturbance in biochemical parameters and oxidative stress biomarkers. Liver enzymes (AST and ALT) increased significantly ($p < 0.05$). Levels of glutathione (GSH) were significantly higher in the caffeine-treated groups (75.12 ± 0.32 ; 51.98 ± 1.12 U/mg; $p < 0.05$) compared to controls (40.82 ± 0.25 ; 42.91 ± 0.27 U/mg; $p < 0.05$) in the ileum and colon, respectively. Caffeine reduced the intestinal PAL levels, but showed no effect on LDH in the ileum.

All these results show that treatment with caffeine citrate improves the gastrointestinal permeability of the newborn rat during this fragile period. Caffeine has reduced bacterial translocation and D-lactate levels, and has had beneficial effects on the intestinal antioxidant system.

Keywords : caffeine citrate, neonatology, intestinal microbiota, bacterial translocation, intestinal permeability, biological markers.

ملخص

الكافيين هو جزيء علاجي يستخدم في طب الأطفال حديثي الولادة لعلاج انقطاع النفس قبل الأوان. له العديد من التأثيرات على أنظمة الجسم المختلفة. ومع ذلك، لا يُعرف الكثير عن هذه التأثيرات على تطور وظائف الجهاز الهضمي للمولود الجديد. في هذا العمل، قمنا بتقييم تأثير العلاج باستخدام سيترات الكافيين على المؤشرات البيولوجية التي تضمن التحكم في التوازن المعوي، أي نفاذية الجهاز الهضمي، وزرع الميكروبات المعوية، الانتقال البكتيري، والمؤشرات الكيميائية الحيوية المختلفة في الفئران حديثة الولادة.

تم تقسيم الجرذان حديثي الولادة إلى ثلاث سلاسل (س1=15 يوم، س2=30 يوم و س3=60 يوم)، تم تقسيم كل سلسلة إلى مجموعتين. تلقت المجموعات التي تمت معالجتها جرعة فموية قياسية من سيترات الكافيين (12 ملغم/كجم يوميًا) وتلقت مجموعات نموذجية الدواء الوهمي. تم وزن الحيوانات يوميًا حتى يوم التضحية. تم جمع عينات الدم والعقد الليمفاوية (MLN) والأعضاء (الكبد، الطحال، الغدة التيموسية، المعى الدقيق والقولون) في ظروف معقمة. بعد ذلك، تم تقييم المستويات المختلفة من المؤشرات الحيوية (D-lactate، PAL، LDH، MDA، CAT، SOD و GSH). كما أُجريت تحليلات ميكروبيولوجية لتقييم زراعة بكتيريا الأمعاء وتنقل البكتيريا نحو الأعضاء.

أظهرت النتائج الأولية أن العلاج بالكافيين قلل من مستوى تنقل البكتيريا مع مرور الوقت. خفض العلاج مستويات D-lactate البلازمية وعلى مستوى أنسجة الأمعاء ($p < 0.05$). بالإضافة إلى ذلك، تسبب الكافيين في حدوث اضطراب في المؤشرات الكيميائية الحيوية ومؤشرات مضادات الأكسدة. ارتفعت نسبة إنزيمات الكبد (AST و ALT) بشكل ملحوظ ($p < 0.05$). وكانت مستويات GSH أعلى بكثير في المجموعات المعالجة بالكافيين (0.32 ± 75.12 ؛ 1.12 ± 51.98 U/mg ؛ $p < 0.05$) مقارنة بالمجموعة النموذجية (0.25 ± 40.82 ؛ 0.27 ± 42.91 U/mg ؛ $p < 0.05$) في المعى الدقيق والقولون، على التوالي. تسبب الكافيين في إنقاص مستويات PAL المعوية، لكنه لم يظهر أي تأثير على LDH في المعى الدقيق.

تظهر كل هذه النتائج أن العلاج باستخدام سيترات الكافيين يحسن نفاذية الجهاز الهضمي للجرذ حديث الولادة خلال هذه الفترة الهشة. قلل الكافيين من انتقال البكتيريا ومستويات D-lactate، وكان له آثار مفيدة على الجهاز المعوي المضاد للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: سيترات الكافيين، حديثي الولادة، البكتيريا المعوية، الانتقال البكتيري، نفاذية الأمعاء، المؤشرات البيولوجية.

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Table des matières	I
Liste des tableaux	V
Liste des figures	VI
Liste des abréviations	VIII
Introduction générale	1
Etude bibliographique	
Chapitre 1 : la caféine	
1. Définition de la caféine	4
2. Historique	4
3. Répartition de la caféine dans le monde végétale	5
a. Le caféier	5
b. Le théier	7
c. Le cacaoyer	8
d. Le maté	9
e. Le guarana	10
4. Voie de biosynthèse de la caféine chez les plantes	12
5. Chimie médicinale de la caféine	12
6. Propriétés pharmacocinétiques de la caféine	14
6.1. Absorption	14
6.2. Distribution	15
6.3. Métabolisme	16
6.4. Excrétion	18
6.5. Pharmacocinétique de la caféine chez les nourrissons prématurés	18
7. Formes pharmaceutiques, dosages et administration	20
8. Les effets pharmacologiques de la caféine	20
8.1. Effet de la caféine sur le système nerveux central	21
8.2. Effet de la caféine sur les tissus adipeux	22
8.3. Effet diurétique	22
8.4. Douleur et maux de tête	23
8.5. Effet sur le système respiratoire	23
8.6. Effet sur l'apnée de la prématurité	23
8.7. Effet sur le système cardiovasculaire	23
8.8. Effet de la caféine sur le diabète	24
8.9. Effet de la caféine sur le cancer	25
8.10. Effets indésirables de ma caféine	25
Chapitre 2 : L'homéostasie intestinale	
1. L'homéostasie du tractus digestif	26
2. Barrière épithéliale intestinale	28

2.1. Composants extracellulaires de la barrière	28
2.2. Composants cellulaires de la barrière	28
2.3. Mécanismes contrôlant la perméabilité de l'intestin	29
2.3.1. Le transport paracellulaire	30
2.3.1.1. Les jonctions serrées	30
2.3.2. La voie transcellulaire	31
2.4. Modulation de la perméabilité intestinale	33
3. Le microbiote intestinal	33
3.1. Définition du microbiote (MI)	33
3.2. Le microbiote intestinal du nouveau-né : acquisition et composition	34
3.2.1. La mise en place du microbiote intestinal à la naissance	34
3.2.2. Composition du microbiote intestinal et son évolution	35
3.2.3. Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal	36
3.2.3.1. Age gestationnel	36
3.2.3.2. Mode de délivrance	37
3.2.3.3. Mode d'allaitement	37
3.2.3.4. Influence de l'antibiothérapie	38
3.3. Rôle du microbiote intestinal	39
3.3.1. Fonction métabolique	39
3.3.2. Effet barrière	42
3.3.2.1. Protection contre les pathogènes	42
3.3.2.2. Maintien de l'intégrité de la barrière intestinale	42
3.3.3. Fonction immunitaire	43
3.4. Contribution du microbiote à l'homéostasie intestinale	43
3.5. La translocation bactérienne (TB)	44
3.5.1. Microbiologie des Translocations Bactériennes (TB)	45
4. Le système immunitaire intestinal	46
5. Les marqueurs biologiques de la fonctionnalité gastro-intestinale	48
5.1. Biomarqueurs de la fonction de la barrière intestinale	48
5.2. Biomarqueurs du microbiote gastro-intestinal	50
5.3. Biomarqueurs du statut immunitaire intestinal	51

Chapitre 3 : le stress oxydatif

1. Définition du stress oxydatif	53
2. L'origine du stress oxydant	53
3. Les radicaux libres et les espèces actives de l'oxygène (ERO)	54
3.1. Effets biologiques des ERO	55
3.1.1. Action bénéfique	55
3.1.2. Actions délétères	56
4. Stress oxydatif intestinal	57
5. Système de défense antioxydant dans l'intestin	58
5.1. Les antioxydants endogènes enzymatiques	59
5.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	60
5.1.2. Catalase (CAT)	61
5.1.3. Les glutathion peroxydases (GPxs)	61
5.2. Les antioxydants endogènes non-enzymatiques	61
5.2.1. Glutathion (GSH)	62

5.2.2. Thioridoxine peroxydases (Trx)	62
6. La mise en évidence du stress oxydatif	63
Etude expérimentale	
<i>Matériels et méthodes</i>	
1. Objectifs de la thèse	66
2. Matériels	67
2.1. Produit utilisé : Citrate de caféine	67
3. Les animaux	67
3.1. Conditions d'élevage	68
3.2. Accouplement	68
4. Protocole expérimentale	69
4.1. Mise bas et randomisation des groupes	69
4.2. Traitement des animaux par gavage	70
4.3. Evolution pondérale et suivi des animaux	71
4.4. Sacrifice et prélèvement du sang et différents organes	72
5. Analyses microbiologiques	75
5.1. Traitement des échantillons intestinaux (iléon et colon)	75
5.1.1. Préparation des homogénats des fragments intestinaux	75
5.1.2. Isolement et identification du micorbiote intestinal et évaluation de la translocation bactérienne (TB)	75
5.2. Dénombrement des populations bactériennes	76
6. Analyses biochimiques	80
6.1. Test de motilité gastro-intestinal avec du lait BaSO ₄ (BSM)	80
6.2. Dosages de différents paramètres biochimiques sériques	80
6.3. Phosphatase alcaline intestinale (PAL)	81
6.4. Dosage de la Lactate déshydrogénase tissulaire (LDH)	81
6.5. Dosage des protéines totales au niveau tissulaire	82
6.6. Dosages des sucres totaux au niveau tissulaire	83
7. Etude du statu oxydatif intestinal	83
7.1. Préparation des homogénats	83
7.2. Mesure de la teneur en malondialdéhyde (MDA)	84
7.3. Mesure de l'activité de la catalase (CAT)	85
7.4. Mesure de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)	86
7.5. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)	87
8. Mesure des niveaux de Nitrite (NO)	87
9. Mesure de la perméabilité intestinale	89
9.1. Mesure de la D-lactate	89
9.2. Mesure de l'expression génétique des protéines des jonctions serrées avec PCR quantitative en temps réel	89
9.2.1. Extraction de l'ARN totale	89
9.2.2. La PCR en temps réel (qRT-PCR)	90
10. Analyse statistique	91
<i>Résultats et discussions</i>	
1. Variation dans le poids corporel et des organes des ratons après l'administration de la caféine	93
1.1. Poids corporel (PC)	93

1.2. Poids des organes	94
2. Résultats des analyses microbiologiques	96
2.1. Évaluation de l'effet de la caféine sur le microbiote intestinal dans l'iléon et le côlon	96
2.2. Action de la caféine sur la translocation bactérienne	100
3. Résultats des analyses biochimiques	102
3.1. Test de motilité gastro-intestinal avec du lait BaSO ₄ (BSM)	102
3.2. Effet de la caféine sur les paramètres biochimiques sériques	103
3.2.1. Effet de la caféine sur la fonction lipidique	103
3.2.2. Effet de la caféine sur les paramètres plasmatiques de la fonction hépatique	105
3.2.3. Effet sur les concentrations plasmatiques de la fonction rénale	108
3.3. Effet de la caféine sur la phosphatase alcaline intestinale	110
3.4. Effet de la caféine sur la Lactate déshydrogénase tissulaire (LDH)	111
3.5. Effet de la caféine sur les protéines totales et les sucres totaux	112
4. Effet de la caféine sur le statut oxydatif intestinal	115
4.1. Effet de la caféine sur la teneur en malondialdéhyde (MDA)	116
4.2. Effet de la caféine sur les activités des enzymes Catalase et Superoxyde dismutase	117
4.3. Effet de la caféine sur les taux de glutathion réduit tissulaire	118
5. Effet de la caféine sur les niveaux de Nitrite (NO)	121
6. Effet de la caféine sur la perméabilité intestinale	123
6.1. Effet de la caféine sur le taux de la D-lactate	123
6.2. Résultats de la mesure de l'expression des protéines des jonctions serrées ..	125
Conclusion et perspectives	128
Références bibliographiques	13à
Annexes	
Publication scientifique	

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	<i>Paramètres pharmacocinétiques comparés de la caféine et de la théophylline chez le nouveau-né traité pour apnée (Jacqz-Aigrain É., 2002).</i>	19
02	<i>Biomarqueurs gastro-intestinaux de la fonction de la barrière intestinale (Celi et al., 2019).</i>	49
02	<i>Biomarqueurs gastro-intestinaux de la fonction de la barrière intestinale (Suite) (Celi et al., 2019).</i>	50
03	<i>Biomarqueurs gastro-intestinaux du microbiote (Celi et al., 2019).</i>	51
04	<i>Biomarqueurs gastro-intestinaux du statut immunitaire (Celi et al., 2019).</i>	52
05	<i>Valeurs de référence des marqueurs sanguins du stress oxydant établies par le CHU de Liège, Belgique (Haleng et al., 2007).</i>	64
05	<i>Valeurs de référence des marqueurs sanguins du stress oxydant établies par le CHU de Liège, Belgique (Suite) (Haleng et al., 2007).</i>	65
06	<i>Les séquences oligonucléotides.</i>	90
07	<i>Effet de la caféine sur le poids du tube digestif et les organes chez les rats nouveaux-nés.</i>	94
08	<i>Translocation bactérienne vers les MLN, le foie, la rate et le thymus des groupes traités et les groupes témoins.</i>	100
09	<i>Effet de la caféine sur la motilité gastro-intestinale avec le modèle BSM chez les rats.</i>	102
10	<i>Effets de la caféine sur les niveaux des paramètres biochimiques sériques de la fonction lipidique.</i>	104
11	<i>Effets de la caféine sur les niveaux des paramètres biochimiques sériques de la fonction hépatique.</i>	105
12	<i>Effets de la caféine sur les concentrations de l'urée et la créatinine.</i>	108
13	<i>Effet de la caféine sur la teneur en MDA dans les homogénats d'iléon et de colon (CT : groupe témoin ; CF : groupe traité à la caféine).</i>	116
14	<i>Effet de la caféine sur les activités des enzymes CAT et SOD dans l'iléon (CT : groupe témoin ; CF : groupe traité à la caféine).</i>	118
15	<i>Effet de la caféine sur les activités des enzymes CAT et SOD dans le colon (CT : groupe témoin ; CF : groupe traité à la caféine).</i>	118
16	<i>Effet de la caféine sur l'activité du GSH dans l'iléon et le colon (CT : groupe témoin ; CF : groupe traité à la caféine).</i>	119

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Structure chimique et désignation de la caféine. Nom commun : Caféine ; nom UICPA : 1,3,7-Triméthylpurine-2,6-dione ; numéro de registre CAS : 58-08-2 (Roberts A., 2021).	04
02	Première synthèse de caféine selon Fischer (Fischer E., 1895 ; Fischer E., 1897).	05
03	Illustration du Caféier (Franz Eugen Köhler, 1883-1914)	06
04	Le théier (<i>Camellia sinensis</i>) (Franz Eugen Köhler, 1897).	07
05	T. cacao : a. Plante mature, b. cabosse, c. Coupe transversale de la cabosse mûre, montrant des fèves couvertes de mucilage (Bhattacharjee R., 2007).	09
06	Le Maté (<i>Ilex paraguariensis</i> St-Hill., Aquifoliaceae) (Alkharidis F., 1987).	10
07	Le Guarana (<i>Paullinia cupana</i>) (Paula, 2018).	11
08	La voie de biosynthèse de la caféine chez les plantes (Faudone G. et al., 2021).	12
09	Structures chimiques de la caféine (1), des xanthines naturelles connexes 2 4, des purines 5 et 6 et de l'acide urique (7) (Faudone G. et al., 2021).	13
10	Principales voies et enzymes impliquées dans la dégradation de la caféine (Nelhig A. 2018).	17
11	Les effets de la caféine sur différents systèmes corporels (Van Dam et al., 2020).	21
12	La structure de la caféine (a) et l'adénosine (b) (Allain P. 2000-2008).	21
13	Action de la caféine dans le processus lipolytique.	22
14	Relation entre la perméabilité intestinale, le microbiote intestinal et l'immunologie de la muqueuse (Bischoff et al., 2014).	26
15	Principales lignes de défense intestinale (Artis, 2008).	27
16	Cellules épithéliales (CEI) différenciées de l'intestin grêle (Crosnier et al., 2006).	29
17	Effecteurs physiques et chimiques de la barrière intestinale.	30
18	Structure et composition protéique des complexes apicaux de jonctions. A : complexe apical de jonction, B : grossissement de la jonction serrées, C : l'organisation protéique des complexes de jonctions serrées (Ahrne S. et al., 2011 et Niessen, 2007).	31
19	Le transport paracellulaire (A) et le transport transcellulaire (B) en physiologie.	32
20	Distribution du microbiote intestinal le long du tractus digestif chez l'adulte (Brock et Pearson, 2009).	34
21	Acquisition des populations bactériennes intestinales chez l'enfant (Lécuyer, 2012).	35
22	Facteurs influençant le développement du microbiote intestinal chez l'Homme (Lécuyer, 2012).	36
23	Illustration des principales fonctions du microbiote vis-à-vis de l'hôte.	39
24	Interactions nutritionnelles (cross-feeding) au cours de la dégradation et de la fermentation des polysaccharides par le microbiote intestinal humain (Bernalier-Donadille, 2010).	40
25	Métabolisme des protéines par le microbiote intestinal humain (Bernalier-Donadille, 2010).	41

26	<i>Interactions microflores et système immunitaire et orientations de la réponse immune (Goulet, 2009).</i>	43
27	<i>Mécanismes et composants impliqués dans le processus de Translocation Bactérienne (TB) (Wiest et Rath, 2003).</i>	45
28	<i>Organisation du système immunitaire intestinale (Abreu, 2010).</i>	47
29	<i>La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier A., 2006).</i>	54
30	<i>Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier A., 2003).</i>	55
31	<i>Réseau de défense in vivo contre le stress oxydatif. Divers antioxydants avec des fonctions différentes jouent leur rôle dans le réseau de défense, les antioxydants des radicaux libres étant l'un des acteurs (Niki, 2010).</i>	59
32	<i>Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng et al., 2007).</i>	60
33	<i>Le citrate de caféine.</i>	67
34	<i>Randomisation des groupes et début du traitement.</i>	69
35	<i>Mise bas des ratons (A) et randomisation des groupes (B).</i>	70
36	<i>Administration du Citrate de Caféine aux ratons par gavage.</i>	71
37	<i>Peser quotidienne des ratons.</i>	71
38	<i>Laparotomie (B) d'un raton âgé de 15 jours après l'anesthésie par le chloroforme (A) et prélèvement aseptique du sang et de différents organes (C).</i>	73
39	<i>Schéma récapitulatif du protocole expérimental.</i>	74
40	<i>Schéma représentatif de l'analyse microbiologique pour étudier la flore intestinale chez les ratons témoins et traités avec de la caféine.</i>	77
41	<i>Schéma représentatif des étapes de l'identification des bactéries isolées.</i>	78
42	<i>Schéma représentatif de l'analyse microbiologique pour détecter la translocation bactérienne chez les ratons témoins et traités avec de la caféine.</i>	79
43	<i>Action catalytique de l'enzyme LDH transformant le pyruvate en lactate.</i>	81
44	<i>Principe de dosage du malondialdéhyde.</i>	84
45	<i>Principe de dosage du glutathion.</i>	87
46	<i>Schéma représentatif du prélèvement des échantillons et réalisation de différentes analyses Biochimiques.</i>	88
47	<i>Le système PCR en temps réel Line-Gene 9600 (Bioer Technology, Bingjiang, Chine).</i>	91
48	<i>Schéma représentatif de l'analyse de l'expression génétique des protéines des jonctions serrées (Claudine-1 et ZO-1) avec la PCR quantitative en temps réel dans l'iléon et le colon des ratons témoins et traités avec de la caféine.</i>	92
49	<i>Variation de poids corporel (PC) (g) chez les ratons. GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine. * p < 0.05 GC vs GT (S3 : 60 jours).</i>	93
50	<i>Effet de l'administration de la caféine sur l'implantation du microbiote intestinal dans l'iléon (A) et le colon (B). GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine ; BAT : bactéries aérobies totales ; BANT : bactéries anaérobies totales ; ETR : Entérobactéries ; LAB : Lactobacillus. 15j, 30j, 60j : jours de traitement. UFC/g : unité formant colonie par gramme de tissu.</i>	97
51	<i>Effets de la caféine sur les la phosphatase alcaline intestinale (dans l'iléon). *p < 0.05 GC vs GT (S1 et S2).</i>	110
52	<i>Effets de la caféine sur l'activité du lactate déshydrogénase (dans l'iléon).</i>	111

53	<i>Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des protéines.</i>	112
54	<i>Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des sucres totaux.</i>	112
55	<i>Effets de la caféine sur les niveaux des protéines totales (A) et les sucres totaux (B) au niveau tissulaire (iléon). * $p < 0.05$ GC vs GT (S1).</i>	114
56	<i>Variations dans le taux de l'oxyde de nitrite dans l'iléon (A) et le colon (B) chez les rats témoins et traités. GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine.</i>	121
57	<i>Taux de la D-lactate dans les homogénats de l'iléon et le côlon (A), et le sérum (B) des rats (moyenne \pm SD) (GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine). * $p < 0.05$ GC vs GT (Iléon : S1 ; Colon : S1 et S2 ; Sérum : S1, S2 et S3).</i>	124
58	<i>Niveaux de protéines des jonctions serrées la zonula occludens-1 (ZO-1) et la claudine-1 dans l'iléon (A) et le colon (B) chez les rats témoins (GC) et traités à la caféine. Les taux de protéines ont été normalisés à la β-actine.</i>	126

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$: oxygène singulet	MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
ADME : absorption, distribution, métabolisme et excrétion	MLN : Mesenteric Lymph Nodes (ganglions lymphatiques mésentériques)
ADN : acide désoxyribonucléique	NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ALAT : Alanine Amino Transférase	NO : oxyde nitrique
ARN : acide ribonucléique	NO $^{\bullet}$: oxyde nitrique ou monoxyde d'azote
ASAT : Aspartate Amino Transférase	O $_2$: oxygène
CAT : catalase	O $_2^{\bullet-}$: anion superoxide
CEI : cellule épithéliales intestinales	OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique
cGMP : The cyclic guanosine monophosphate	OH $^{\bullet}$: radical hydroxyle
CYP1A2, CYP2E1, CYP2D6-Met : cytochrome P450 suivi du nombre correspondant à chaque isoforme spécifique	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
EROs : substances réactifs dérivés de l'oxygène	ONOOH : peroxydinitrite
GALT : tissu lymphoïde associé à l'intestin	PAI : phosphatase alcaline intestinale
GPx : glutathion peroxydase	PAL : phosphatase alcaline
GSH : glutathion	PCR : Polymerase Chain Reaction
H $_2$ O : eau	q-PCR : la PCR quantitative ou qPCR ou PCR en temps réel
H $_2$ O $_2$: peroxyde d'hydrogène	RCH : rectocolite hémorragique
IgA : immunoglobuline A	RNS : reactive nitrogen species
JS : jonctions serrées	ROS : reactive oxygen species
LDH : Lactate déshydrogénase	ROS : radicaux libres oxygénés
LDH : lactate déshydrogénase	SA : semaine d'aménorrhée
LDL : lipoprotéines de basse densité	SGOT : sérum glutamate-oxaloacétate transaminase
LOO $^{\bullet}$: radical peroxyde	SGPT : sérum glutamate-pyruvate transaminase
MC : maladie de Crohn	
MDA : malondialdéhyde	

SII : syndrome de l'intestin irritable

SOD : superoxyde dismutase

TB : translocation bactérienne

TBA : acide thiobarbiturique

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

TCA : Trichloracétique

TD : tractus digestif

TLR : les récepteurs toll-like

UFC : unité formant colonies

ZO : zonula occludens

Introduction générale

L'apnée de la prématurité (AOP) est une complication fréquente du développement chez les nourrissons prématurés, qui peut avoir des causes différentes (Alhersh *et al.*, 2020). Il est habituellement lié à l'immaturation du système nerveux central et à l'obstruction des voies respiratoires (Mishra *et al.*, 2008). Parmi les autres causes spécifiques de l'apnée néonatale, mentionnons les lésions tissulaires dans le cerveau du nourrisson, les maladies respiratoires, les infections, le ravitaillement gastro-intestinal, les problèmes cardiaques et les troubles métaboliques. Une AOP prolongée expose le nourrisson à l'hypoxie et, potentiellement, à l'hypotension (Liu *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2020 ; Bruschetti *et al.*, 2021).

La théophylline, l'aminophylline et la caféine sont trois formes de méthylxanthine qui ont été utilisées pour prévenir ou traiter l'apnée chez les nourrissons prématurés. Parmi ces préparations, seule la caféine présente un écart suffisant entre les niveaux thérapeutiques et toxiques (Bruschetti *et al.*, 2021).

La caféine a soulevé de nombreuses préoccupations en matière de santé au cours de la dernière décennie. C'est un stimulant du système nerveux central, favorise la sécrétion hormonale et modifie les paramètres biochimiques et physiologiques (Johnston *et al.*, 2003 ; Wu, 2014 ; Caravan *et al.*, 2016).

La caféine peut traverser toutes les membranes biologiques en raison de ses caractéristiques hydrophobes. Toutefois, l'absorption de cette molécule pourrait être influencée par les propriétés chimiques et physiques, le pH et la voie d'administration (Bonati et Garattini, 1988 ; Xu *et al.*, 2010 ; Abreu *et al.*, 2011). En outre, la caféine représente un antagoniste des récepteurs de la méthylxanthine et de l'adénosine, c'est un puissant stimulant de l'activité respiratoire centrale et un traitement efficace de l'apnée de la prématurité (AOP), et peut affecter tous les tissus exprimant les récepteurs de l'adénosine (Abu-Shaweesh et Martin, 2017).

La santé intestinale désigne un certain nombre de fonctions physiologiques, microbiologiques et physiques qui fonctionnent ensemble pour maintenir l'homéostasie intestinale (Backhed *et al.*, 2005 ; Kairie *et al.*, 2013 ; Polansky *et al.*, 2016 ; Kogut, 2019).

La fonction la plus fondamentale de l'intestin est la digestion et l'absorption efficaces des nutriments alimentaires (Dibner et Richards, 2005 ; Kairie *et al.*, 2013). En tant qu'organe ayant la plus grande surface avec une interaction constante avec l'environnement, l'intestin fournit une fonction efficace de barrière (double épithéliale) qui réduit l'exposition aux

toxines environnementales et aux microbes pathogènes potentiels (Turner, 2009). Un autre élément fonctionnel crucial de l'intestin est un système immunitaire efficace (Wigley, 2013 ; Smith *et al.*, 2014).

L'intestin fournit également une plate-forme pour la croissance d'un microbiote diversifié qui fournit non seulement une deuxième barrière contre la colonisation par les pathogènes, mais qui régule également le développement immunitaire et la maturation, et fournit des métabolites pour la nutrition de l'hôte (Gaggia *et al.*, 2010; Sergeant *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2015).

L'administration de la caféine exerce de nombreux effets sur de nombreux systèmes corporels, y compris les suivants : cardiovasculaire, système nerveux central, métabolique, système rénal et respiratoire. Ces systèmes affectent à leur tour des fonctions spécifiques qui perturbent l'homéostasie de notre corps. Cependant, on en sait peu sur l'effet de la caféine sur le développement de la fonction gastro-intestinale du nouveau-né.

Cette étude fait alors partie d'un projet, dont le but est d'explorer les effets et les mécanismes d'action de la caféine sur différents systèmes biologiques.

L'effet de la caféine sur la fonction gastro-intestinale du nouveau-né en particulier sur l'implantation du microbiote intestinal a été évalué par notre équipe (Moumen *et al.*, 2012), par ailleurs son impact sur les différents marqueurs biologiques régulant l'homéostasie gastro-intestinale reste obscure et a fait l'objectif de cette thèse.

Et donc l'objectif principal de cette étude est de répondre à la question suivante : Est-ce que l'administration de la caféine modifie-t-elle à long terme le développement des marqueurs biologiques qui contrôlent l'homéostasie intestinale dans cette période fragile ?

Ce travail de thèse s'organise en deux parties :

La première partie concerne l'étude bibliographique qui comporte trois chapitres :

- Le premier chapitre présente une description de la caféine, ses multiples sources, son utilisation et ses effets sur différentes fonctions physiologiques.
- Le deuxième chapitre décrit les différentes composantes de l'homéostasie intestinale y compris la barrière gastro-intestinale et les marqueurs biologiques qui la contrôlent, la

caractérisation du microbiote intestinal, portant l'accent sur sa nature, sa composition et les divers facteurs qui l'influencent et enfin le système immunitaire intestinal.

- Le troisième chapitre entame le stress oxydant, dans lequel on a entamé d'une façon générale la définition du stress oxydatif et ces origines, et par la suite nous avons parlé du stress oxydatif intestinal ainsi que le système de défense contre ce stress.

La deuxième partie c'est la partie expérimentale qui est subdivisée en deux parties :

- La partie matériels et méthodes présente les méthodes de diagnostic qui ont été développées pour quantifier et caractériser le microbiote intestinal et les dosages biochimiques de différents marqueurs biologiques.
- Et les résultats qui sont présentés, interprétés et discutés à la lumière des données existantes de la littérature.

Ce travail est clôturé par une conclusion sur l'impact du traitement au citrate de caféine sur l'homéostasie intestinale des nouveau-nés en cette période fragile, afin d'aider le pédiatre de la bonne prise en charge des nourrissons en particulier les prématurés souffrant d'apnées respiratoires.

Enfin, des perspectives sont présentées à la fin du manuscrit pour mieux explorer et étudier plus profondément les effets de cette substance sur l'homéostasie intestinale.

Etude Bibliographique

Chapitre 1 :

La Caféine

1. Définition de la caféine

La caféine est un produit chimique aromatique qui appartient à la classe des molécules purines. En conséquence, sa structure moléculaire est composée d'un anneau bicyclique hétéroatomique plat, qui lui donne des qualités hydrophobes et une faible solubilité dans l'eau, mais cela peut être amélioré en faisant bouillir la solution (Tavagnacco *et al.*, 2021).

L'alcaloïde purin 1,3,7-triméthylxanthine, plus communément connu sous le nom de caféine, aussi connu sous le nom de théine ou de guaranine), est la substance psychostimulante la plus consommée au monde (Nehlig, 2018). Il a divers effets thérapeutiques favorables, dont certains ne sont pas encore entièrement compris au niveau moléculaire, et fonctionne comme un stimulant central via plusieurs mécanismes bien caractérisés. La caféine est présente dans les grains de café, les feuilles de thé, les baies de guarana, les fèves de cacao et les fèves de kola, car elle est naturellement présente dans les graines, les noix et les feuilles de nombreuses plantes (Faudone *et al.*, 2021) (Figure 01).

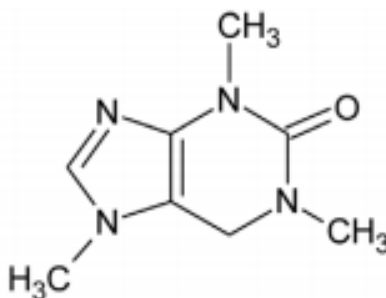


Figure 01 : Structure chimique et désignation de la caféine. Nom commun : Caféine ; nom UICPA : 1,3,7-Triméthylpurine-2,6-dione ; numéro de registre CAS : 58-08-2 (Roberts, 2021).

2. Historique

La consommation de caféine sous forme de thé remonte potentiellement à 3000 avant JC en Chine, alors que des preuves de l'utilisation de fèves de cacao dans les cultures mayas anciennes dès environ 600 avant JC ont été trouvées (Evans, 1992 ; Preedy et Zibadi, 2013). La consommation de café remonte au 15^e siècle dans le sud de l'Arabie et en Afrique du Nord, d'où elle est venue en Europe (Weinberg et Bealer, 2004).

En 1819, la caféine a d'abord été isolée à partir des grains de Mika et appelée « kaffebase » par les deux chimistes allemands Friedlieb Ferdinand Runge et Von Giese, tandis que le nom de caféine a d'abord été utilisé par Pierre-Joseph Pelletier (Runge, 1821 ; Weinberg et Bealer, 2004). La caféine a ensuite été extraite du thé sous le nom de théine au plus tard en 1827 par Oudry, avant d'être reconnue comme étant la même molécule (Mulder, 1838 ; Jobst, 1838). La différence entre elles réside dans le fait que le thé contient une grande quantité de tanins ; un élément ralentissant la diffusion de la caféine (Touaain, 1994). Cette dernière en 1843 fut ensuite extraite du maté et en 1865 des noix de cola (James, 1991 ; Watson, 2003).

Hermann Emil Fischer a été le premier à synthétiser la caféine en 1895 (Figure 02) et à en élucider la structure moléculaire qui faisait partie de son travail a reçu le prix Nobel en 1902 (Fischer, 1895 ; Fischer, 1897).

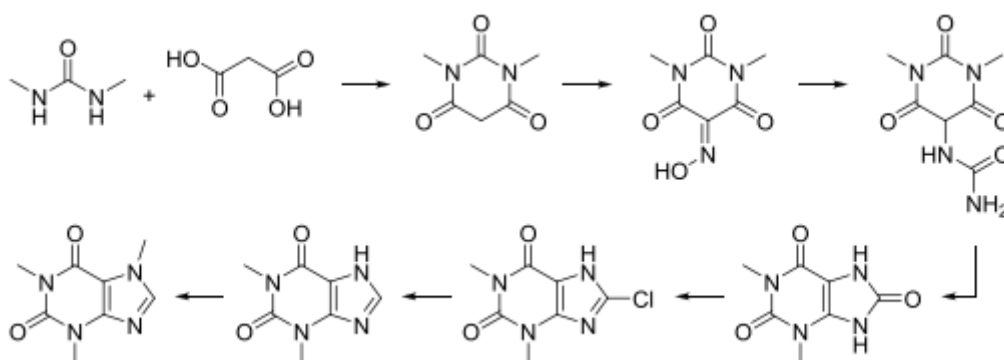


Figure 02 : Première synthèse de caféine selon Fischer (Fischer, 1895 ; Fischer, 1897).

3. Répartition de la caféine dans le monde végétal

Le composé se retrouve dans les feuilles, les semences et les fruits des plantes taxinomiquement très variées, comme : le Caféier (*Coffea arabica*, *Coffea canefora*, etc.) une Rubiacée, le Maté (*Ilex paraguariensis*) une Ilicacée, le Guarana (*Paullinia cupana*) une Sapindacée, le Théier (*Camellia sinensis*), une Théacée, ou encore le Kolatier (*Cola nitida*) et le Cacaoyer (*Theobroma cacao*) deux Sterculiacées. En corollaire, les « drogues » - au sens de la pharmacognosie - contenant de la caféine sont nombreuses : baies du Caféier, fèves du Cacaoyer, feuilles du Théier, etc.

a. Le Caféier

Coffea arabica L. et *Coffea canephora* Pierre, Rubiaceae

Le *Coffea arabica* est l'espèce la plus ancienne et la plus connue. C'est un arbuste qui atteint 7 à 8 m de hauteur, a feuilles persistantes, ovales, de 12 cm de longueur sur 5 cm de largeur. Les fleurs blanches, à odeur de Jasmin, sont group  es en verticilles à l'aisselle des feuilles (Girre, 2001).

Une deuxième espèce qui est le *Coffea canephora*, variété *robusta*, est un arbre pouvant atteindre 10 m de hauteur, dont les feuilles, ovales, mesurent 30 cm de longueur sur 10 cm de largeur. Les fleurs, blanches, sont réunies en inflorescences (glomérules) (Girre, 2001) (Figure 03).

Chez ces deux espèces, les fruits sont des drupes (fruits charnus contenant une graine enferm  e dans un noyau dur), ovoïdes, vertes, puis rouges à maturité, d'environ 2 cm de longueur sur 1,5 cm de largeur. Le « grain » de Café est l'albumen (tissu entourant la plantule), jaune verdâtre, de la graine contenue dans ce fruit. On l'appelle « Café vert ». Le Café vert a très peu d'odeur ; c'est la torréfaction qui lui donne son arome bien connu (Girre, 2001).



Figure 03 : Illustration du Caféier (Köhler, 1883-1914)

Le Caféier a été utile pour extraire la caféine, en connaître la structure chimique, et étudier son activité pharmacologique. Actuellement, la caféine, ainsi que la théophylline et la théobromine, sont obtenues par synthèse (Girre, 2001).

b. Le Théier

Camellia sinensis (L.) O. Kuntze, Theaceae

Le Théier est un arbre originaire de Chine et de l'Inde. Dans les plantations, il est taillé de façon à ne pas dépasser 1,50 m de hauteur. Il est très ramifié. Les feuilles sont persistantes, alternes, entières, ovales (10 x 4 cm), et leurs bords sont découpés en forme de griffes recourbées. Les feuilles jeunes sont pubescentes, et les feuilles âgées glabres et coriaces. Le Thé vert provient des feuilles rapidement desséchées, tandis que le Thé noir est dû à une fermentation qui précède la dessiccation des feuilles. Les fleurs, solitaires ou groupées par deux ou trois à l'aisselle des feuilles, sont blanc-crème et possèdent de très nombreuses étamines. Les fruits sont des capsules ovoïdes (Girre, 1997) (Figure 04).

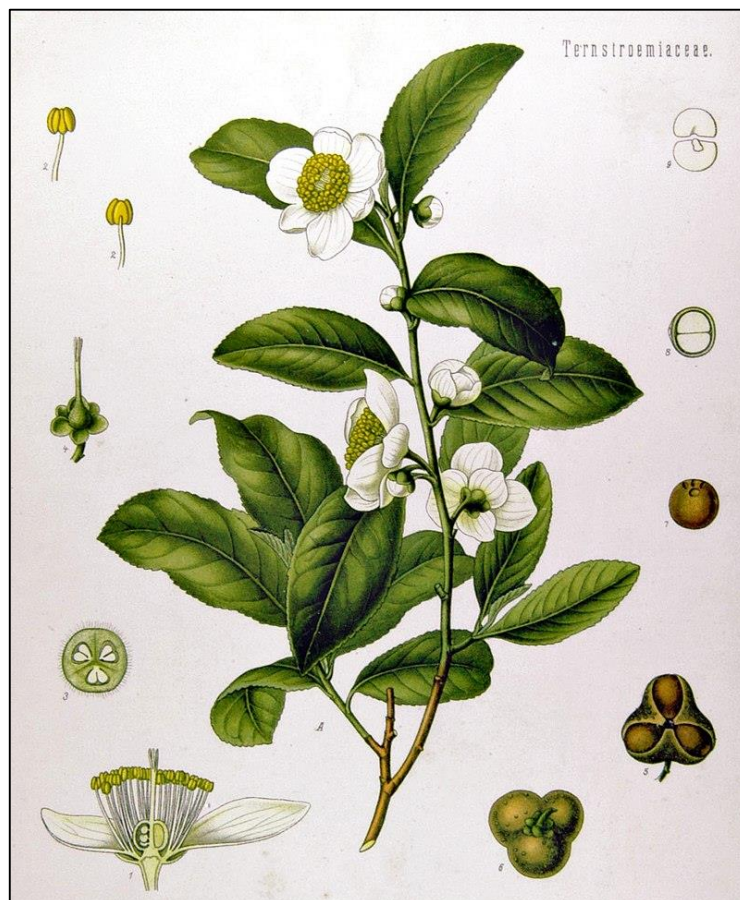


Figure 04 : Le théier (*Camellia sinensis*) (Köhler, 1897).

Ce sont les feuilles qui ont un intérêt thérapeutique. Elles ont servi l'extraction des xanthines, qui sont la caféine et la théophylline maintenant produites par synthèse (Girre, 1997 ; Girre, 2000).

Les feuilles du Thé vert ont des propriétés stimulatrices cérébrales et cardio-respiratoires. Elles facilitent le travail intellectuel et musculaire, accélèrent la respiration, renforcent et régularisent les battements cardiaques. Elles sont également diurétiques (flavonoïdes et bases puriques), veinotoniques et vasculoprotectrices (propriétés vitaminiques P dues aux catéchols et aux dérivés flavoniques) (Girre, 1997 ; Girre, 2000).

L'action antiathéromateuse, vasculoprotectrice, du Thé vert a été bien étudiée. Expérimentalement, il a été démontré, chez les rats, que les tanins catéchiques des feuilles de Thé vert diminuent le cholestérol total, mais également les LDL (lipoprotéines de basse densité) et les VLDL (lipoprotéines de très basse densité). Ces catéchols ont donc une activité antiathéromateuse. Il en est de même, évidemment, des tanins catéchiques des autres plantes. Des tests *in vitro* et des expérimentations *in vivo*, chez le lapin, ont montré qu'un principe actif aminé des feuilles de Thé vert possédait une forte activité antiagrégante des plaquettes sanguines. Cette action pourrait être bénéfique dans le traitement des troubles vasculaires. D'autre part, des études effectuées sur des microsomes hépatiques ont montré que des extraits de feuilles de Thé vert renfermant le (-)-épicatechol et certains de ses esters galliques inhibent l'action mutagène de l'aflatoxine B1 et des activités enzymatiques cytochrome P450 dépendantes. Ces extraits pourraient être considérés comme anticarcinogènes (Girre, 1997 ; Girre, 2000).

c. Le Cacaoyer

Theobroma cacao L., *Sterculiaceae*

Le Cacaoyer est un arbre qui peut atteindre une dizaine de mètres de hauteur. Les feuilles, ovales, aiguës à l'extrémité, sont de grande taille. Les fleurs, petites, blanches ou rouges, naissent directement sur le tronc ou les grosses branches. Le fruit ou « cabosse », mesure 15 à 20 cm de longueur sur 10 à 20 cm de largeur. Il est coriace et de couleur jaune ou rougeâtre à maturité. Les graines mesurent 2 à 3 cm de longueur sur 1 à 2 cm de largeur. Elles sont recouvertes d'un tégument qui, comme la graine, est coloré en rouge-brun après la fermentation et la dessiccation qui permettent d'obtenir le Cacao (Bruneton, 1999) (Figure 05).

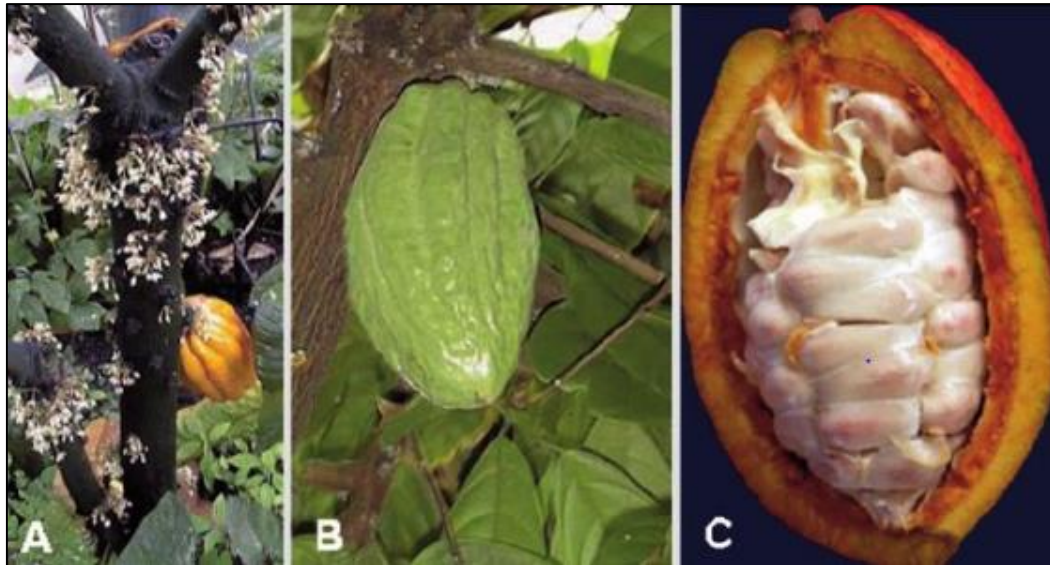


Figure 05 : *T. cacao* : a. Plante mature, b. cabosse, c. Coupe transversale de la cabosse mûre, montrant des fèves couvertes de mucilage (Bhattacharjee R., 2007).

Outre l'utilisation alimentaire du Cacao, qui permet d'obtenir le chocolat, l'intérêt médicinale du Cacaoyer a résidé dans les lipides de la graine qui donnent le « beurre de Cacao », excipient médicamenteux parfois encore utilisé, et dans les graines du Cacaoyer (notamment de leurs téguments) qui produisent de la théobromine. Cette molécule (comme ses sœurs chimiques, la caféine et la théophylline) est désormais obtenue par synthèse. La théobromine est très utilisée comme diurétique (Bruneton, 1999).

d. Le Maté

Ilex paraguariensis St-Hill., Aquifoliaceae

Le Maté (Herbe de Saint-Barthélemy, Thé des Jésuites, Thé du Paraguay) est un arbre de 4 à 10 m de hauteur, a écorce blanchâtre, originaire de Brésil, d'Argentine et du Paraguay. Les feuilles, persistantes, coriaces, sont ovales et dentées. Les fleurs, blanches, sont groupées en cymes. Les fruits sont des baies violettes (Girre, 1997).

Ce sont les feuilles qui ont un intérêt thérapeutique et qui sont utilisées dans quelques spécialités pharmaceutiques. Par la présence de caféine, ces feuilles ont une action stimulatrice nerveuse et musculaire. Elles sont également diurétiques (Girre, 1997) (Figure 06).



Figure 06 : Le Maté (*Ilex paraguariensis* St-Hill., *Aquifoliaceae*) (Alikaridis, 1987).

e. Le Guarana

Paullinia cupana H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, *Sapindaceae*

La plante permettant de préparer le Guarana est une liane, ligneuse, à feuilles composées de 5 folioles ovales. Les fleurs, verdâtres, sont en grappes. Les fruits sont des capsules rouges renfermant une seule graine. Dans la région d'origine (Amazonie), le nom de guarana est donné à une pâte préparée par trituration de la graine avec de l'eau, après une légère torréfaction et une fermentation. Dans cette région du Brésil, la pâte obtenue sert à préparer des boissons rafraichissantes et toniques. Les graines riches en caféine, entrent dans la composition de nombreuses spécialités pharmaceutiques pour leur effet neurostimulant (Girre, 1997) (Figure 07).

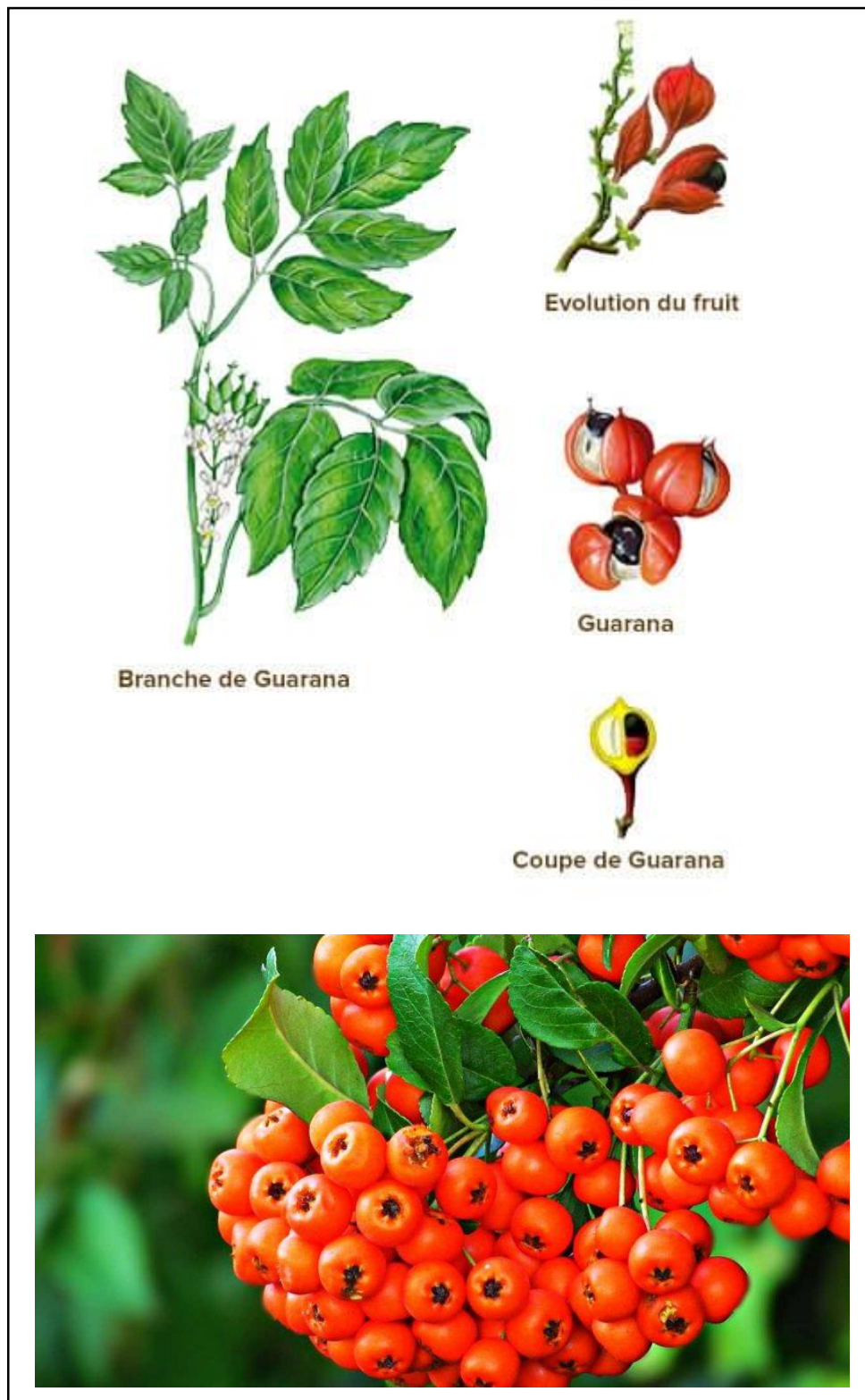


Figure 07 : Le Guarana (*Paullinia cupana*) (Paula, 2018).

4. Voie de biosynthèse de la caféine chez les plantes

Malgré le fait qu'il existe de nombreuses voies potentielles vers la caféine dans les plantes, une seule voie de biosynthèse de la caféine commune a été découverte, qui est catalysée par des enzymes qui sont différemment spécialisés dans diverses espèces (Figure 08) (Huang *et al.*, 2016).

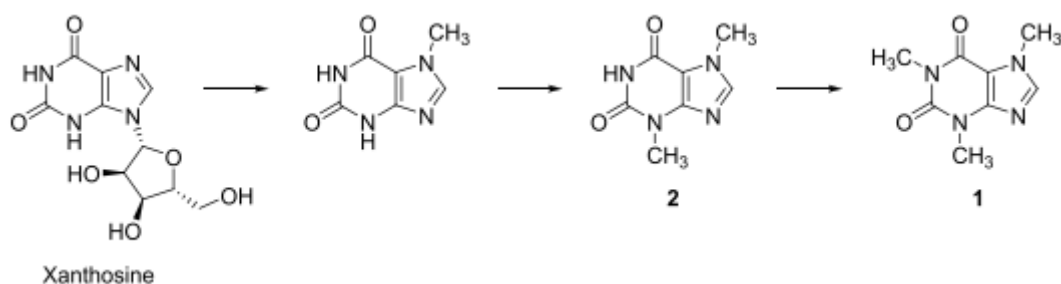


Figure 08 : La voie de biosynthèse de la caféine chez les plantes (Faudone *et al.*, 2021).

La biosynthèse de la caféine provient à partir de xanthosine, qui est convertie en 7-méthylxanthine par méthylation enzymatique et déamination. Après cela, une autre étape de méthylation donne la théobromine (2), qui est ensuite convertie en caféine par méthylation enzymatique (1) (Huang R. *et al.*, 2016).

La caféine se trouve naturellement dans une variété d'espèces végétales, où elle agit comme un mécanisme de défense pour tuer les insectes qui se nourrissent de la plante en inhibant les phosphodiésterases d'insectes, entraînant l'accumulation intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (Nathanson J.A., 1984 ; Frischknecht, P.M. *et al.*, 1986 ; Huang *et al.*, 2016).

5. Chimie médicinale de la caféine

Sur le plan structurel, la caféine est étroitement liée aux autres xanthines naturelles que sont la théobromine (2), la théophylline (3) et la paraxanthine (4), ainsi qu'à de nombreuses molécules endogènes (purine) très importantes, comme l'adénine (5) et la guanine (6) et l'acide urique, métabolite purine (7) (Figure 09).

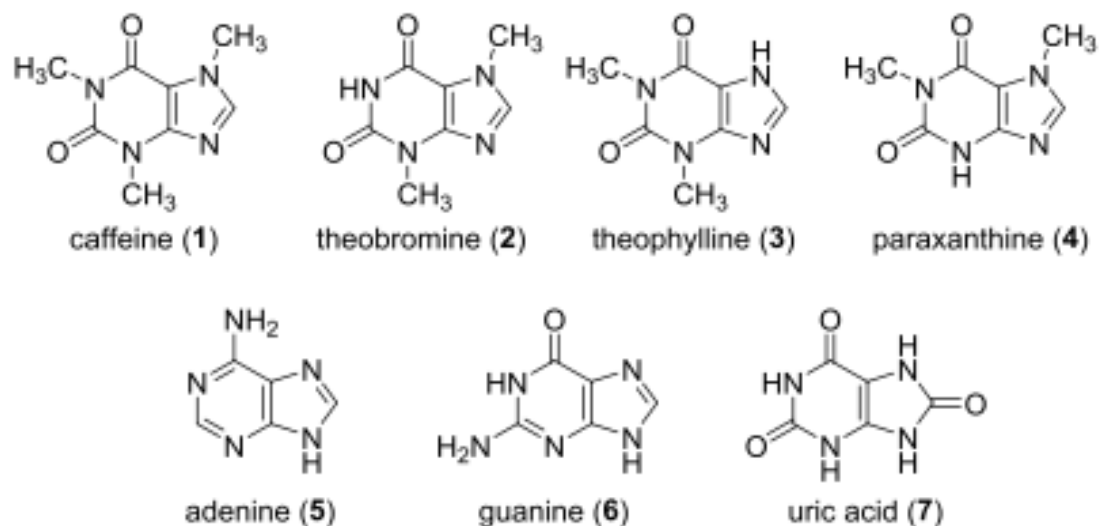


Figure 09 : Structures chimiques de la caféine (1), des xanthines naturelles connexes 2, 4, des purines 5 et 6 et de l'acide urique (7) (Faudone *et al.*, 2021).

Le produit naturel la caféine (1) est une molécule qui ressemble beaucoup à un médicament (Figure 09). Il est conforme à la règle de cinq (Lipinski *et al.*, 1997), il est modérément lipophile (log expérimental P -0,01, d'autres sources log P -0,07) (Wilkinson *et al.*, 2006 ; Davies-Strickleton *et al.*, 2020), et peut passer des membranes / barrières biologiques. La caféine (1) est bien soluble dans l'eau (21,7 g/L) et sa solubilité dépend de la température (66 g/L dans l'eau bouillante). Tous les atomes du squelette à deux anneaux sont hybridés, ce qui fait de la xanthine un échafaudage plat (Figure 09).

La caféine a également plusieurs rôles en tant que drogue. Il se trouve (sous forme de citrate de caféine) sur la liste de l'OMS des médicaments essentiels (Letelier, 2020) pour son action stimulante respiratoire à utiliser chez les nouveau-nés (Comer *et al.*, 2001 ; Da Silva, 2011).

En outre, la caféine en tant que bronchodilatateur faible a été évaluée pour le traitement de l'asthme, et une amélioration modeste de la fonction respiratoire chez les patients asthmatiques a été observée pour l'administration orale de caféine dans un certain nombre de petits essais cliniques (Welsh *et al.*, 2010 ; Alfaro *et al.*, 2018).

En tant qu'adjuvant analgésique, la caféine a une importance pharmacologique considérable dans de multiples coformulations avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens

(AINS) pour le traitement de la douleur. Cette utilisation de la caféine en combinaison avec principalement l'ibuprofène ou le paracétamol réalise une petite mais statistiquement significative amélioration dans le soulagement de la douleur (Derry *et al.*, 2017 ; Lipton *et al.*, 2017). On a émis l'hypothèse que cet effet est dû à des changements liés à la caféine dans la biodisponibilité ou la pharmacocinétique des AINS, mais les preuves actuelles indiquent que l'activité adjuvante analgésique est principalement médiée par l'antagonisme des récepteurs de l'adénosine (A_2A) (Horrigan *et al.*, 2006 ; Shapiro, 2008 ; Silva *et al.*, 2018 ; Cellai *et al.*, 2018 ; Weiser et Weigmann, 2019).

En outre, plusieurs effets très attrayants de la caféine ont été observés, par exemple, dans la prévention des maladies neurodégénératives (Eskelinen *et al.*, 2009 ; Qi et Li, 2014) et l'immunothérapie du cancer (Fong *et al.*, 2020 ; Jacobson *et al.*, 2020), dont beaucoup semblent être principalement médiés par des effets sur la signalisation adénosynergique.

6. Propriétés pharmacocinétiques de la caféine

Par définition, la pharmacocinétique est l'étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion (ADME) d'une substance (Ce que le corps fait à une substance chimique). L'analyse pharmacocinétique est essentielle à l'évaluation de l'innocuité parce que c'est le sang, ou plus précisément le tissu cible, les niveaux d'une substance qui déterminent en fin de compte ses effets biologiques potentiels, et les niveaux sanguins ou tissulaires d'une substance peuvent être comparés entre les espèces (Roberts, 2021).

Le métabolisme de la caféine et la pharmacocinétique ont été largement étudié dans le passé et révisé récemment (Arnaud, 2011).

6.1. Absorption

L'absorption et la biodisponibilité de la caféine sont relativement comparables chez toutes les espèces, soit les humains, les chiens, les lapins et les souris (Walton *et al.*, 2001). Chez les animaux et les humains, la caféine est rapidement et complètement absorbée dans le tractus gastro-intestinal. Chez les humains, 99 % de la caféine ingérée est absorbée en 45 minutes (Blanchard et Sawers, 1983), 20 % au niveau de l'estomac et la plus grande partie dans l'intestin grêle (Chvasta et Cooke, 1971). Chez les hommes adultes en bonne santé qui absorbent 5 mg/kg de caféine, la concentration plasmatique maximale de caféine (10 mg/ml) est atteinte en 30 minutes (Blanchard et Sawers, 1983).

La concentration plasmatique de caféine diminue plus rapidement que celle de la paraxanthine, son principal métabolite. Les concentrations de paraxanthine deviennent encore plus élevées que celles de la caféine environ 8 à 10 heures après l'ingestion de caféine, et cela se produit chez toutes les espèces (Bonati *et al.*, 1982; Arnaud, 1993). Cela est essentiel étant donné que la paraxanthine est aussi puissante que la caféine pour le blocage des récepteurs de l'adénosine (Fredholm *et al.*, 1999) et que, par conséquent, les études sur les effets biologiques de l'ingestion de caféine devraient tenir compte de la présence de métabolites, au moins de la paraxanthine avec de la caféine.

Chez l'humain, la pharmacocinétique de la caféine est indépendante de la voie d'administration, ce qui implique un effet de premier passage hépatique limité. La caféine percutanée est effectivement absorbée chez les nourrissons prématurés souffrant d'apnée (Morisot *et al.*, 1990). L'inhalation du sublimé d'un comprimé de 100 mg de caféine montre une absorption efficace et rapide, avec une biodisponibilité approximative de 60 % chez les fumeurs expérimentés. La pharmacocinétique de la caféine après inhalation et administration intraveineuse est assez semblable (Zandvliet *et al.*, 2005).

6.2. Distribution

Une fois absorbée dans la circulation systémique, une fraction de caféine (estimée à 10 à 30 %) se lie à l'albumine plasmatique et le reste se distribue dans tout le corps sans qu'il y ait de preuve de séquestration tissulaire du produit chimique d'origine ou de l'un quelconque de ses métabolites (Bonati *et al.*, 1982, 1984). Rien n'indique que des barrières physiologiques limitent la distribution de la caféine, car il a été signalé qu'elle traverse facilement les barrières hémato-encéphalique et placentaire et qu'elle a également été trouvée dans des liquides corporels comme le liquide amniotique et le lait maternel humain (Nawrot *et al.*, 2003). Ce profil de distribution est conforme à son importante lipophilie et solubilité dans l'eau, comme l'indique son LogPow de 0,07 (PISSC, 1998).

Le volume moyen de distribution de la caféine chez les humains et d'autres espèces a été estimé à environ 0,8 L/kg de poids corporel, une valeur qui concorde également avec la distribution au-delà du compartiment plasmatique en l'absence de séquestration des tissus (Bonati *et al.*, 1984).

6.3. Métabolisme

La caféine est principalement métabolisée dans le foie où elle subit des déméthylations successives et une oxydation en C8 (Figure 10). Le CYP1A2 se trouve uniquement dans le foie. Elle représente 15 % de tout le cytochrome P450 présent dans le foie humain et plus de 90 % du métabolisme de la caféine (Arnaud, 2011). Le CYP1A2 catalyse les 1, 3 et 7 déméthylations de la caféine, la 7 déméthylation de la paraxanthine et les 1 et 3 déméthylations de la théophylline. Le CYP1A2 est pratiquement responsable de la plupart des réactions biochimiques concernant la caféine et ses métabolites. La biotransformation de la caféine par CYP1A2 représente une valeur moyenne de 84 % pour la paraxanthine, de 12 % pour la théophylline et de 4 % pour la théobromine. D'autre part, le CYP2E1 est principalement responsable de la formation de théophylline et de théobromine (Gu *et al.*, 1992). Le CYP2D6-Met catalyse également la déméthylation de la caféine et la 8-hydroxylation, tandis que le CYP2E1 joue un rôle plus mineur dans ces voies. Le CYP3A4 agit principalement comme médiateur de la 8-hydroxylation et peut être impliqué dans la synthèse *in vivo* du 1,3,7-TMU (triméthylurée). Ainsi, au moins quatre isoformes CYP contribuent au métabolisme de la caféine à une concentration de 3 mmol/ml de caféine. En dessous d'un niveau de 0,1 mmol/ml, CYP1A2 et CYP1A1 sont les deux isoenzymes du cytochrome P450 principalement impliqués (Ha *et al.*, 1996).

La N-acétyltransférase-2 (NAT2) participe également au métabolisme de la caféine et catalyse la conversion de la paraxanthine en 5-acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracile. Une fois le génotype pris en compte, l'activité d'acétylation n'est pas influencée par le sexe, la race, l'âge, l'éducation, l'activité physique, le poids et la consommation de café, d'alcool, de viande rouge et transformée, de légumes crucifères, de tabac, d'œstrogènes (Le Marchand *et al.*, 1996).

Enfin, la xanthine oxydase (XO) catalyse la conversion de 1-méthylxantine (1MX) en 1-méthylurique acide (1MU). Les rapports utilisés pour mesurer l'activité de la xanthine oxydase suivent une distribution normale (Vistisen *et al.*, 1992). Dans la population japonaise, une faible activité de xanthine oxydase est observée chez 11 % des sujets présentant une concentration urinaire moyenne d'acide urique inférieure de 53 % à celle de la population générale (Saruwatari *et al.*, 2002).

L'activité largement variable de CYP1A2 entre les sujets influence la disposition de la caféine (Landi *et al.*, 1999) et pourrait refléter des différences liées au sexe, à la race, aux polymorphismes génétiques, à la maladie et à l'exposition à divers inducteurs métaboliques (Rasmussen *et al.*, 2002).

Il existe deux variations interethniques, l'une liée au polymorphisme d'acétylation et l'autre reflétant une différence dans l'excrétion de paraxanthine. Les deux peuvent être liés à des différences ethniques dans les fonctions rénales (Kalow, 1986).

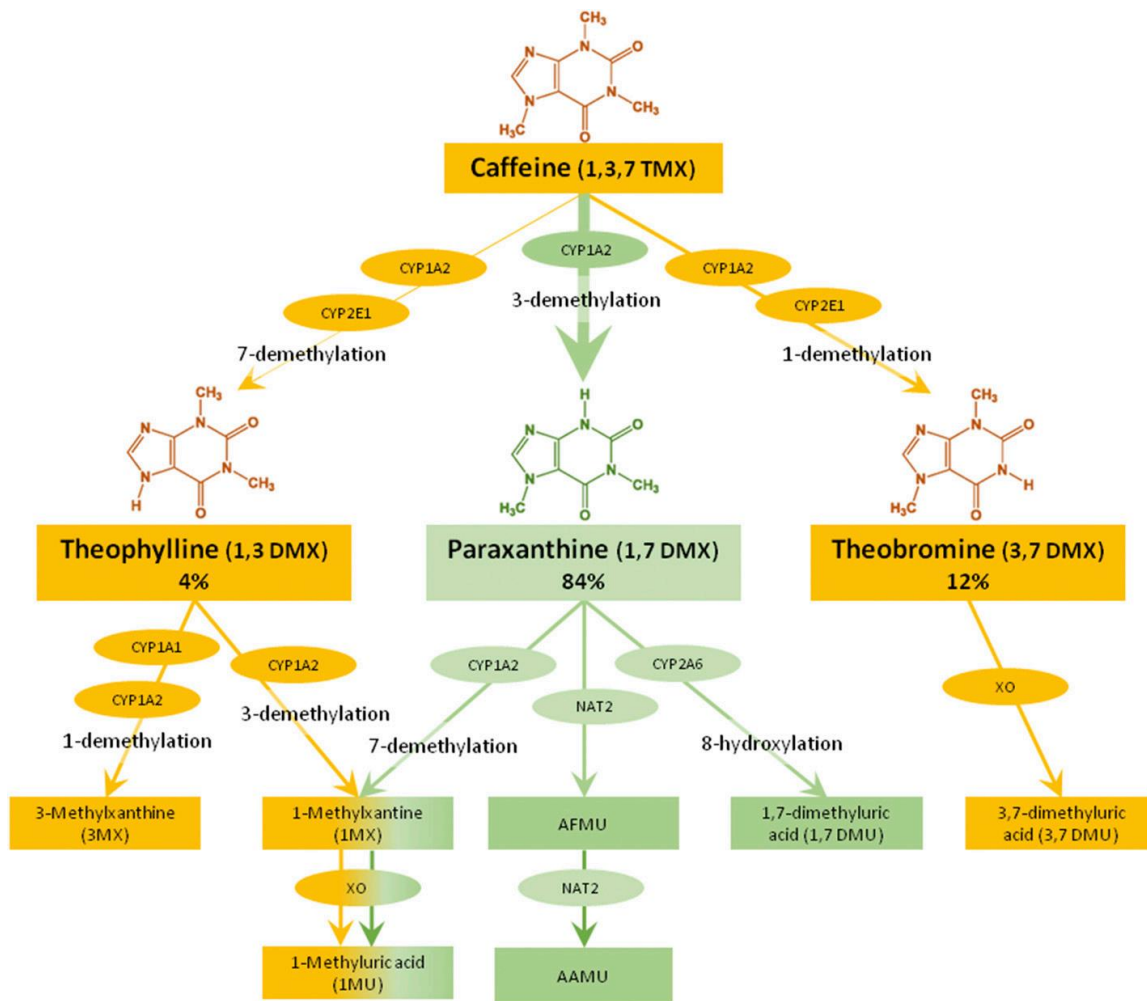


Figure 10 : Principales voies et enzymes impliquées dans la dégradation de la caféine (Nehlig A., 2018).

Sur la figure 10, La couleur orange a été utilisée, en commençant par la première étape de la dégradation de la caféine, pour les voies métaboliques concernant la théophylline et la théobromine, tandis que la couleur verte a été utilisée pour la paraxanthine, qui est le principal métabolite de la caféine et a des effets biologiques puissants. Les chiffres indiquent les pourcentages de métabolites obtenus après le métabolisme de la caféine. AAMU, 5-

acétylamino-6-amino-3-méthyluracil ; AFMU, 5-acétylamino-6-formylamino-3-méthyluracil ; CYP, cytochrome P450 suivi du nombre correspondant à chaque isoforme spécifique ; NAT2, N-acétyltransférase-2 ; XO, xanthine oxydase (Nehlig A., 2018).

6.4. Excrétion

Chez les humains et les animaux, l'excrétion rénale prédomine. Chez les humains, environ 70 % d'une dose orale de 7,5 mg/kg de caféine est récupérée dans l'urine (Tang-Liu *et al.*, 1983), 0,5 % à 2 % étant excrétée sans être métabolisée dans l'urine. La faible excrétion urinaire de caféine s'explique par une réabsorption de la caféine à 98 % du tubule rénal une fois filtrée par les glomérules. Cela indique que le facteur limitant dans la clairance plasmatique de la caféine est le métabolisme (Arnaud, 1993). Il n'existe aucune information sur la réabsorption du tubule rénal des diméthylxanthines, en particulier du principal métabolite, la paraxanthine (Nehlig, 2018).

Les concentrations de caféine dans l'urine et dans le plasma sont en bonne corrélation (Birkett et Miners, 1991). Dans les selles, 2 à 7 % de la dose de caféine est excrétée en 48 heures. On a constaté qu'une grande partie de cette excrétion était principalement constituée de métabolites de caféine sécrétés après le cycle hépato-intestinal et le métabolisme (Arnaud, 1976). Les composés trouvés dans les matières fécales humaines après l'ingestion de caféine étaient la 1,7 diméthylxanthine (44 %), l'acide 1-diméthyllurique (38 %), l'acide 1,3-diméthyllurique (14 %), l'acide 1,3,7-triméthyllurique (6 %) et la caféine (2 %) (Callahan *et al.*, 1982). Des effets favorables de la consommation de café sur la composition du microbiote intestinal ont été signalés (Jaquet *et al.*, 2009), mais les effets de la caféine à eux seuls sont inconnus.

6.5. Pharmacocinétique de la caféine chez les nourrissons prématurés

La plupart des études sur le métabolisme de la caféine chez les nouveau-nés prématurés ont été menées entre les années 1970 et 1990 par l'Aranda et ses collègues (Aranda *et al.*, 1979 ; Aranda *et al.*, 2010). En utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), ces auteurs ont pu démontrer une corrélation stricte entre la dose administrée de médicament et le niveau plasmatique (Turmen *et al.*, 1981), ainsi qu'entre le niveau plasmatique et le niveau de liquide céphalorachidien (Turmen *et al.*, 1979). La voie d'administration de la caféine n'affecte pas sa pharmacocinétique, car il y a une biodisponibilité presque complète après son administration orale ou *i.v.* Le citrate de caféine par voie orale est rapidement et complètement

absorbé par le tractus gastro-intestinal, car il n'y a pratiquement pas de métabolisme de premier passage, la concentration plasmatique maximale étant souvent atteinte en <1 h (Adel-Hady *et al.*, 2015 ; Moschino *et al.*, 2020) (Tableau 01).

Les propriétés pharmacocinétiques de la caféine chez les nouveau-nés, en particulier ceux nés prématurément, sont nettement différentes de celles observées chez les adultes ou les enfants. C'est en grande partie parce que les nouveau-nés ont une capacité limitée de métaboliser la caféine car ils ont des systèmes hépatiques et rénaux immatures (Aldridge *et al.*, 1979 ; Dani *et al.*, 2000 ; Comer *et al.*, 2001).

Chez les adultes, la caféine est principalement métabolisée en paraxanthine (PX), en théophylline (TP) et en théobromine (TB) dans le foie par le cytochrome P450 (CYP) 1A2, et seulement moins de 2 % d'une dose est éliminée dans l'urine (Tang-Liu *et al.*, 1983) (Tableau 01).

Contrairement aux adultes, La caféine est en grande partie excrétée dans l'urine sans changement chez les nouveau-nés prématurés et à terme en raison de l'absence d'expressions hépatiques de CYP1A2 (Aldridge *et al.*, 1979a ; Aranda *et al.*, 1979b). Bien que l'élimination de la caféine soit extrêmement lente chez les nourrissons, la demi-vie d'élimination de la caféine diminue graduellement à mesure que le traitement est prolongé (Aldridge *et al.*, 1979a ; Aranda *et al.*, 1979b ; Taguchi *et al.*, 2020 ; Aranda et Beharry, 2020).

Tableau 01 : Paramètres pharmacocinétiques comparés de la caféine et de la théophylline chez le nouveau-né traité pour apnée (Jacqz-Aigrain, 2002).

<i>Paramètres pharmacocinétiques (valeur moyenne)</i>	Nouveau-né	Adulte
<i>Caféine</i>		
Clairance (mL/Kg/h)	8,9	94
Volume de distribution (L/Kg)	0,9	0,6
Demi-vie d'élimination (h)	100	6
<i>Théophylline</i>		
Clairance (mL/Kg/h)	22	66
Volume de distribution (L/Kg)	0,69	0,5
Demi-vie d'élimination (h)	30	6,7

7. Formes pharmaceutiques, dosage et administration

Ce produit est inclus dans la Pharmacopée de la République populaire de Chine (2015), la Pharmacopée Britannique (2017), la Pharmacopée des Etats Unis (40), la Pharmacopée japonaise (17e éd.), la Pharmacopée européenne (9e éd.), la Pharmacopée indienne (2010) et la Pharmacopée internationale (5e éd.) (Wang *et al.* , 2018).

Les formes posologiques courantes de caféine comprennent les comprimés, la poudre et l'injection. Les formes posologiques principalement utilisées sur le marché comprennent les comprimés de citrate de caféine, les comprimés de caféine d'amidopyrine, la caféine d'amidopyrine, les comprimés d'aspirine d'acétaminophène pour enfants, les comprimés de caféine d'ergotamine, l'injection de benzoate de sodium de caféine, l'agent de brome de café, etc (Wang *et al.*, 2018).

Le schéma posologique recommandé du citrate de caféine pour le traitement à court terme de l'apnée de prématurité chez les nourrissons non traités âgés de 28 à moins de 33 semaines est de 20 mg/kg infusés par voie intraveineuse pendant 30 minutes à l'aide d'une pompe à seringue. Suivi d'une thérapie d'entretien de 5 mg/kg une fois par jour par voie orale ou par perfusion intraveineuse. Les concentrations sériques de caféine devraient être surveillées périodiquement ; la plage thérapeutique est de 8 à 20 mg/L (Comer *et al.*, 2001). La clairance en caféine et la demi-vie changent rapidement au cours de la période postnatale et il peut être nécessaire d'ajuster les schémas posologiques à mesure que les nourrissons vieillissent (Comer *et al.*, 2001).

8. Les effets pharmacologiques de la caféine

L'ingestion de caféine a des effets sur de nombreux systèmes corporels, y compris les suivants : gastro-intestinaux, cardiovasculaires, système nerveux central, métaboliques, rénaux et respiratoires. Ces systèmes affectent à leur tour des fonctions spécifiques qui perturbent l'homéostasie de notre corps.

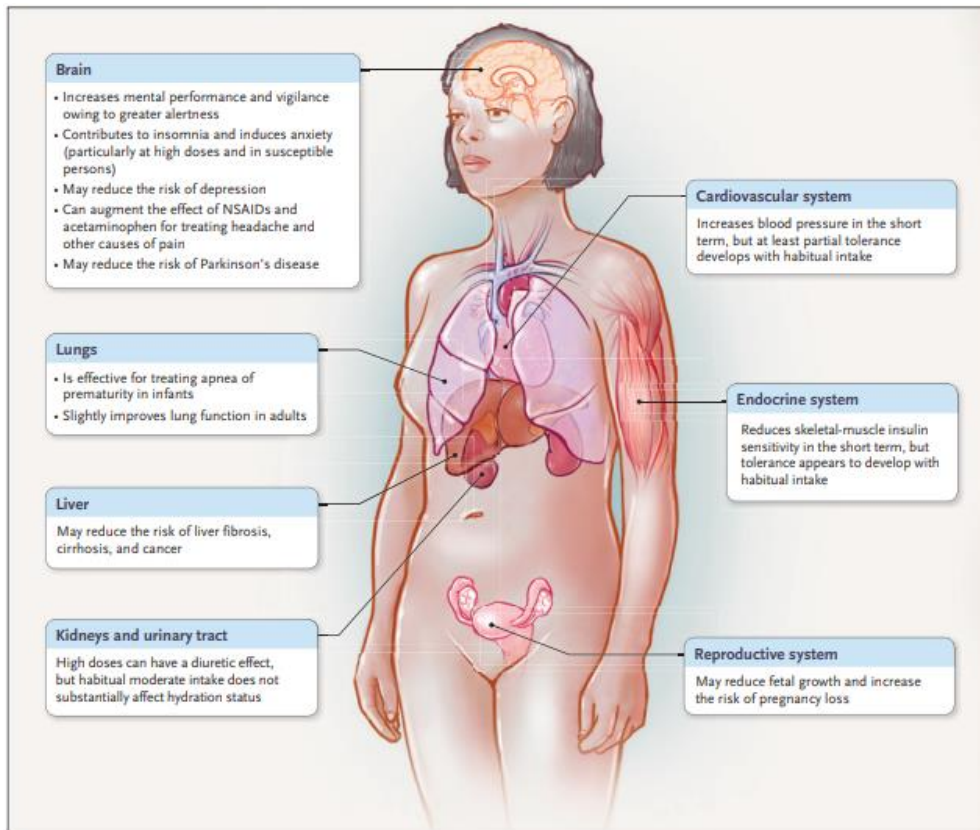


Figure 11 : Les effets de la caféine sur différents systèmes corporels (Van Dam *et al.*, 2020).

8.1. Effet de la caféine sur le système nerveux central

La caféine agit comme un antagoniste des récepteurs de l'adénosine dans le cerveau qui provoque une diminution de la libération des émetteurs (Hinds *et al.*, 1996).

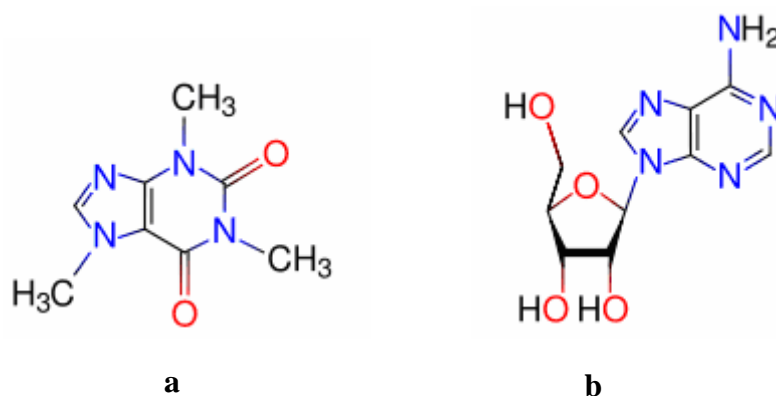


Figure 12 : La structure de la caféine (a) et l'adénosine (b) (Allain, 2000-2008).

Une fois que l'adénosine est fixée sur les récepteurs des cellules nerveuses, elle diminue leurs activités. La molécule de la caféine ; structurellement similaire à l'adénosine (Figure 12), active les cellules. Cependant, elle se fixe aux récepteurs et empêche l'action de l'adénosine.

L'augmentation de l'activité nerveuse qui en résulte déclenche la libération d'adrénaline. Cette dernière est une hormone qui augmente le rythme cardiaque, la contractilité du cœur et la pression artérielle. Elle augmente aussi, l'apport de sang aux muscles, et la libération de glucose par le foie (néoglucogenèse) (Khellou, 2009).

Par ailleurs, les effets de la caféine, contrairement à ceux des alcools ou d'autres stimulants du système nerveux central, sont de courte durée et n'affecte pas d'autres fonctions mentales supérieures (Khellou, 2009).

8.2. Effet de la caféine sur les tissus adipeux

La caféine cible le système métabolique et provoque une augmentation de la lipolyse dans les tissus adipeux.

Cette molécule inhibe la phosphodiesterase, bloquant la dégradation de l'AMPc, qui favorise la dégradation des triglycérides en acides gras estérifiés en activant la triglycéride lipase (lipase hormono-sensible) (Franchi *et al.*, 2003 ; Rayalam *et al.*, 2008) (figure 13).

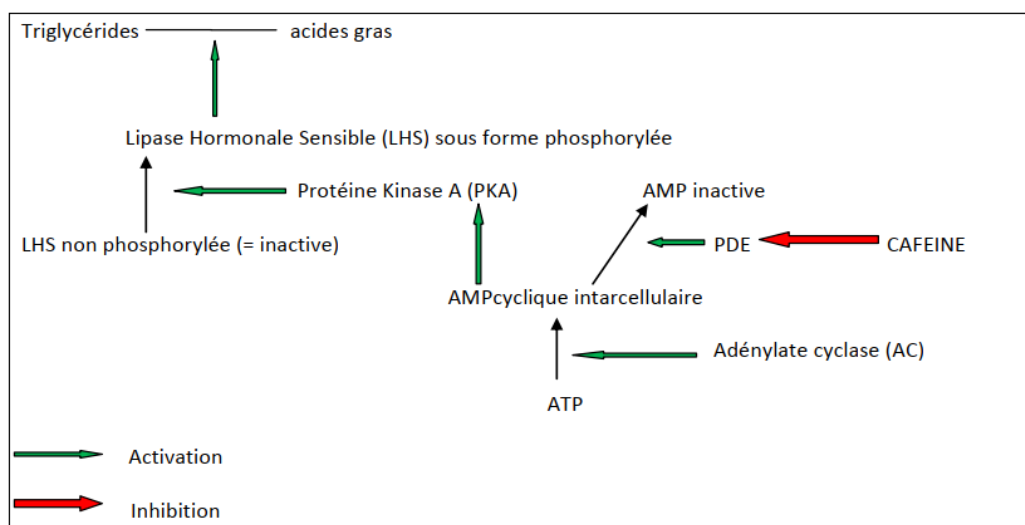


Figure 13 : Action de la caféine dans le processus lipolytique (Dillet, 2010).

8.3. Effet diurétique

La caféine, de par son effet vasodilatateur, favorise la vascularisation des reins et donc le flush des reins. Combiné à une diminution de l'absorption tubulaire, le résultat est une augmentation de la diurèse (Dillet, 2010).

8.4. Douleur et maux de tête

Par ses effets vasodilatateurs, la caféine permet de soulager les maux de tête et de mieux diffuser certaines molécules. Comme adjuvant analgésique, elle se trouve dans de nombreuses formulations en vente libre habituellement en combinaison avec l'acétaminophène, l'acide acétylsalicylique ou l'ibuprofène pour traiter les maux de tête et les douleurs légères. Les adjuvants analgésiques n'ont pas d'effet analgésique en soi, mais ils augmentent l'effet d'autres agents analgésiques (Janda *et al.*, 2012). Il a été suggéré que l'effet adjuvant analgésique de la caféine peut découler de sa capacité à favoriser l'absorption des analgésiques en abaissant rapidement le pH gastrique, affectant ainsi la pharmacocinétique des médicaments coadministrés (Lipton *et al.*, 2017).

8.5. Effet sur le système respiratoire

Sur le plan respiratoire, après une consommation de 250 milligrammes de caféine, on note une augmentation de la fréquence respiratoire de 20% chez les buveurs occasionnels. Cela s'explique par le fait que la caféine augmente la sensibilité au gaz carbonique des centres nerveux de la respiration. De plus, la caféine inhibe l'action des phosphodiésterases sur l'AMP cyclique et le GMP cyclique (Huyghe, 2014).

8.6. Effet sur l'apnée de la prématurité

La caféine et la théophylline sont des médicaments importants pour traiter l'apnée néonatale. La caféine est préférée pour sa demi-vie plus longue et son indice thérapeutique plus élevé. L'antagonisme A1 et A2A est considéré comme le principal mode d'action des xanthines dans cette indication (Eichenwald, 2016). Une revue Cochrane de 2001 portant sur cinq essais cliniques sur un total de 192 nourrissons prématurés a démontré que les nourrissons souffrant d'apnée au cours des 2-7 premiers jours ont bénéficié d'un traitement à la méthylxanthine (Henderson-Smart *et al.*, 2010). Dans une vaste étude portant sur des nourrissons de 2006 dont le poids à la naissance se situe entre 500 et 1250 g, l'utilisation thérapeutique de la caféine (20 mg/kg de dose initiale, 5 mg/kg de dose d'entretien) a réduit le risque de décès ou d'incapacité clinique et a réduit l'incidence de paralysie cérébrale et de retard cognitif (Schmidt *et al.*, 2006).

8.7. Effet sur le système cardiovasculaire

Une analyse parue dans le *American College of Cardiology Foundation* montre une diminution de la mortalité toutes causes confondues, et ce, de manière quasi proportionnelle

jusqu'à quatre à cinq tasses de café par jour. Cette étude nous indique également une relation entre la consommation de caféine et la diminution de l'hypertension (Huyghe, 2014).

Les chercheurs d'Harvard ont suivi 128 000 personnes consommant régulièrement de la caféine. Ils ont pu conclure que boire plus de six tasses de café par jour n'augmentait pas le risque cardiovasculaire (Huyghe, 2014).

Les effets de la caféine sur les maladies cardiovasculaires (MCV) ont été étudiés pendant de nombreuses années avec des résultats contradictoires. Selon l'étude, on a constaté que la consommation de caféine augmentait, n'avait aucun effet ou diminuait le risque de MCV. Il est toutefois difficile de relier, de comparer et d'évaluer ces multiples études, car la quantité de caféine consommée différait et était rapportée de différentes façons, allant de milligrammes précis de caféine à des tasses de café non définies. Un autre problème de plusieurs études est l'absence de contrôle placebo qui a été dans certains cas défini comme café décaféiné, tandis que d'autres études ont comparé les buveurs de café et les buveurs non décaféinés. Les effets cardiovasculaires potentiels signalés pour la caféine doivent donc être évalués avec soin (Faudone *et al.*, 2021).

8.8. Effet de la caféine sur le diabète

Il a été démontré que le métabolisme des glucides n'est pas modifié par la consommation de café sauf chez les sujets obèses ou présentant un diabète de type 2 car la caféine possède une action inhibitrice sur la sécrétion d'insuline (Debry, 1993).

Par ailleurs, Da Silva *et al.* (2017) ont fait rapport sur le mécanisme et les effets biologiques de la caféine sur l'homéostasie du métabolisme du substrat. Les chercheurs ont révélé que le taux sérique d'insuline et de glycémie était élevé avec l'apport de caféine, ce qui suggère qu'il a la capacité de modifier le taux de glucose sanguin chez les hommes diabétiques. Ils signalent également que l'apport à long terme de caféine semble être efficace pour contrôler le taux de glucose et d'adiponectine et donc bénéfique pour le diabète sucré individuel (Da Silva *et al.* 2017).

Zaharieva et Riddell (2013), ont trouvé que la caféine augmente la production hépatique de glucose dans le foie, avec une diminution de l'absorption de glucose dans le muscle squelettique.

8.9. Effet de la caféine sur le cancer

Plusieurs études épidémiologiques et expérimentales ont rapporté que la caféine peut avoir un potentiel comme agent anticancéreux en raison de sa capacité à supprimer la prolifération cellulaire et induire l'apoptose dans plusieurs organes (Bode *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2015 ; Oh *et al.*, 2015), y compris l'œsophage, le sein, le foie et le cerveau. Plusieurs voies d'oncogènes sont impliquées, y compris la phosphatase et l'homologue de la tensine (PTEN), PI3K/Akt, p53 et la cible mammalienne des voies de rapamycine (mTOR). Aussi, Quelques études ont démontré que la caspase-9 et -3 peuvent jouer un rôle important dans l'apoptose des cellules cancéreuses induite par la caféine (Lieu *et al.*, 2017).

Il a été prouvé aussi que la caféine agit comme un médicament antioxydant et anti-inflammatoire en réduisant les facteurs associés à la mort cellulaire et à l'apoptose dans les modèles de lésions pulmonaires induites par l'oxygène (Nagatomo, 2016 ; Endesfelder, 2020).

8.10. Effets indésirables de la caféine

La caféine peut provoquer des palpitations, et elle est contre-indiqué chez les hypertendus. Chez certaines personnes, on peut même observer un phénomène d'accoutumance et un véritable état de besoin, comme c'est le cas pour le Tabac et les plantes « stupéfiantes » (Chanvre Indien, Cocaïer, Pavot à Opium) (Girre, 2001).

Dans l'ostéoporose la caféine favorise l'excrétion de calcium, c'est elle également qui augmente transitoirement la diurèse après consommation de café et qui est responsable en partie de l'acidité gastrique et du reflux gastro-œsophagien (RGO) (Haler, 2013).

A la base du caféisme, elle peut provoquer une dépendance, l'amaigrissement, de l'anxiété, des trouble du sommeil et même favoriser des psychoses (Haler, 2013).

Chapitre 2 :

L'homéostasie intestinale

1. L'homéostasie du tractus digestif

Comme pour chaque organe, la physiologie du TD repose sur un maintien de l'homéostasie mais ici l'équilibre met en jeu un réseau complexe d'interactions entre la population de cellules intestinales et la population microbienne (Thomas *et al.*, 2013) (Figure 14).

Les dysbioses du microbiote, qui peuvent être considérées comme des écarts par rapport à une composition moyenne, sont associées à de nombreuses maladies, comme par exemple, les maladies inflammatoires de l'intestin, certains syndromes métaboliques et le cancer colorectal. Il est également décrit qu'une altération du génome des cellules intestinales ou une modification majeure de la morphologie du TD après intervention chirurgicale peuvent modifier la composition du microbiote. Ainsi, il est aujourd'hui bien établi que le maintien d'une homéostasie entre les composantes intestinales et microbiennes du TD est essentiel pour le maintien d'une bonne santé (Thomas *et al.*, 2013).

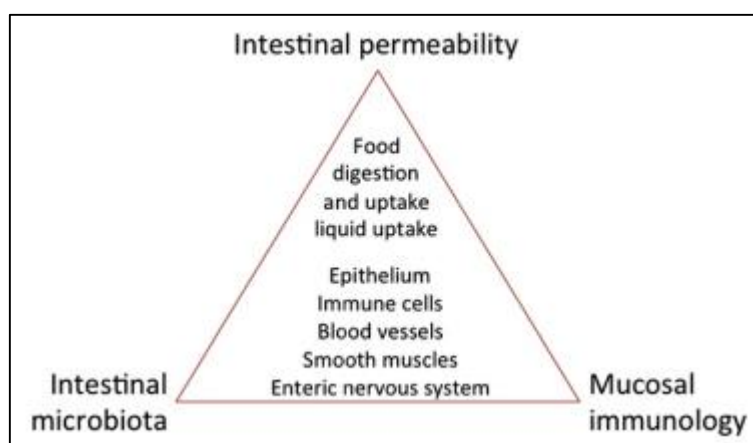


Figure 14 : Relation entre la perméabilité intestinale, le microbiote intestinal et l'immunologie de la muqueuse (Bischoff *et al.*, 2014).

Les acteurs impliqués dans la fonction de défense et d'homéostasie de la barrière intestinale sont (Figure 15) :

- La barrière digestive ou bien la barrière physique représentée par les mouvements péristaltiques intestinaux qui empêche la rétention et la prolifération des bactéries dans l'intestin ainsi que leur absorption à travers la muqueuse intestinale (Artis, 2008).

- La barrière épithéliale représentée par l'épithélium intestinal, avec une superficie de 300 m², compte près de 300 millions d'entérocytes entièrement renouvelés en quatre à six jours. Il assure le passage sélectif des molécules, la sécrétion du mucus et des peptides antimicrobiens tels que les β -défensines. Une des principales fonctions de l'épithélium polarisé est également de séparer les espaces tissulaires et réguler les échanges de matières entre eux. Pour assurer cette fonction, les jonctions serrées, structures protéiques macromoléculaires qui relient les cellules épithéliales les unes aux autres, forment une barrière intercellulaire qui maintient une perméabilité intestinale équilibrée (Artis, 2008).
- Le microbiote intestinal qui contribue à l'absorption des nutriments, inhibe l'invasion des pathogènes, et participe au développement et au fonctionnement optimal du système immunitaire de l'hôte (Artis, 2008).
- La barrière immunologique intestinale qui contient 60 à 70 % de la totalité des cellules lymphoïdes de l'organisme. Il exerce principalement deux fonctions essentielles pour le maintien de l'homéostasie intestinale : une fonction de défense contre les micro-organismes potentiellement dangereux et une fonction de tolérance en empêchant les réponses immunes excessives contre les protéines alimentaires et les composants bactériens du microbiote intestinal (Artis, 2008).

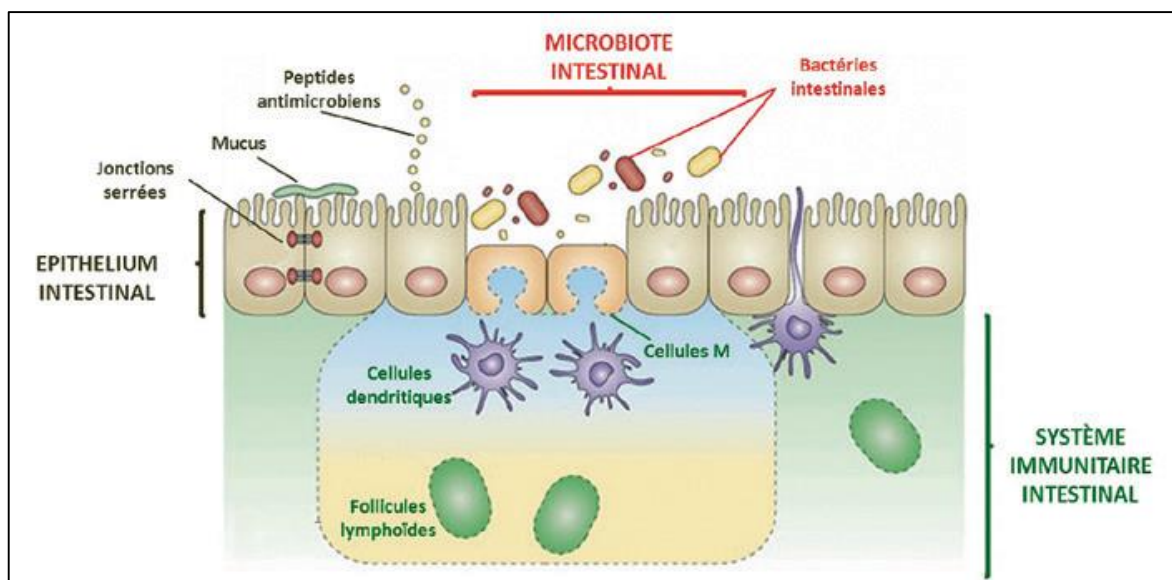


Figure 15 : Principales lignes de défense intestinale (Artis, 2008).

2. La barrière épithéliale intestinale

La barrière intestinale est une entité fonctionnelle complexe qui sépare le milieu interne de l'environnement luminal. Elle est composée de l'épithélium, des cellules immunitaires en *lamina propria* (LP) et des plaques de Peyer comme composants cellulaires, et une couche de mucus comme défense extracellulaire (Harvei, 2016).

La caractéristique en tant que barrière perméable sélective permet l'absorption des nutriments, des électrolytes et de l'eau, tout en maintenant une défense efficace contre les antigènes, les microbes envahissants et les toxines intraluminales (Harvei, 2016).

2.1. Composants extracellulaires de la barrière

La couche visqueuse de mucus qui recouvre la fonction de surface de la muqueuse agit comme une barrière contre le contenu luminal et empêche les grosses molécules (exp. les bactéries) d'entrer en contact direct avec la couche épithéliale. Ses propriétés sont attribuées aux glycoprotéines de la mucine sécrétées par des cellules épithéliales spécialisées, comme les cellules des coupes (Deplancke et Gaskins, 2001).

Le mucus contient également des peptides antimicrobiens sécrétés qui aident à éviter le contact entre les bactéries et la couche épithéliale. Les bactéries commensales résidant dans la couche la plus externe coopèrent avec le mucus en limitant la colonisation des bactéries pathogènes en occupant l'espace. La couche de mucus fonctionne également comme une résidence pour l'immunoglobuline sécrétoire A (IgAs), qui se lie à des substances antigéniques (Neish, 2009).

2.2. Composants cellulaires de la barrière

Les cellules épithéliales intestinales (CEI) forment une barrière biochimique et physique spécialisée qui maintient la séparation entre le microbiote luminal et le système immunitaire muqueux (Bloemendaal *et al*, 2016).

L'épithélium intestinal est constitué d'entérocytes, de cellules caliciformes impliquées dans la production de mucus, de cellules de Paneth spécialisées dans la production de peptides antimicrobiens et de cellules souches qui assurent le renouvellement cellulaire. Sous cette monocouche de cellules se trouve la *lamina propria*, dans laquelle des lymphocytes B, et plus particulièrement des plasmocytes producteurs d'IgA, mais également des lymphocytes T, des

macrophages, et des cellules dendritiques sont retrouvés. Des cellules M (Microfold Cells) impliquées dans l'endocytose et dans la transcytose des antigènes du non-soi sont aussi rencontrées (Abreu, 2010 ; Mabbott *et al*, 2013 ; Bloemendaal *et al*, 2016) (Figure 16).

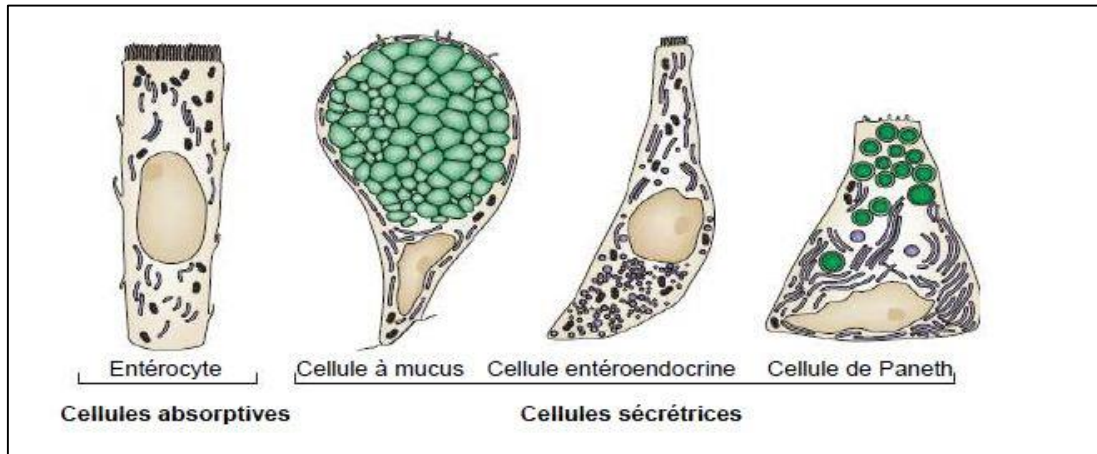


Figure 16 : Cellules épithéliales (CEI) différenciées de l'intestin grêle (Crosnier *et al.*, 2006).

2.3. Mécanismes contrôlant la perméabilité de l'intestin

La fonction de barrière « mécanique » de l'intestin (donc non immunitaire) vis-à-vis des substances potentiellement toxiques ou antigéniques est souvent résumée sous le terme de perméabilité intestinale qui peut donc être définie comme la facilité avec laquelle l'épithélium intestinal permet le passage passif de molécules (Clément *et al.*, 2015 ; Genser *et al.*, 2016).

L'intégrité de cet épithélium est maintenue par trois types de jonctions intercellulaires (d'apical à basal) à savoir : les jonctions serrées (JS), les jonctions adhérentes et les desmosomes (Genser *et al.*, 2016) (Figure 17).

Ainsi, les solutés peuvent emprunter deux voies pour traverser l'épithélium : le passage transcellulaire (à travers la cellule) et le passage paracellulaire (contournement de l'entérocyte) (Figure 17). Par conséquent, les transporteurs sélectifs contrôlent la perméabilité transcellulaire, tandis que les jonctions serrées (JS) contrôlent la voie paracellulaire en maintenant les cellules épithéliales ensemble (Anderson et Van Itallie, 1995).

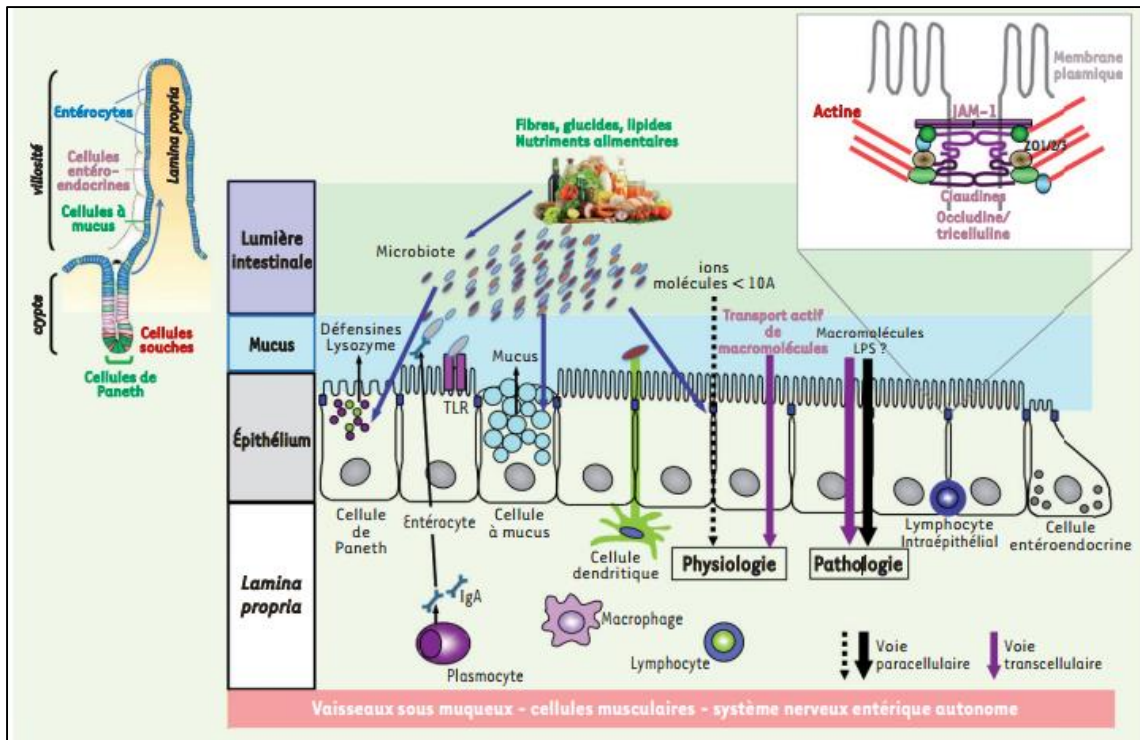


Figure 17 : Effecteurs physiques et chimiques de la barrière intestinale (Genser *et al.*, 2016).

2.3.1. Le transport paracellulaire

Le transport paracellulaire est régulé par les JS qui jouent un rôle majeur dans la cohésion et la polarité épithéliale. Les JS forment de petits pores de 4 à 9 Å de diamètre entre les entérocytes situés à l'apex des villosités, et des pores de diamètre plus large, de 50 à 60 Å, au niveau des cryptes. Les cryptes sont toutefois très peu accessibles au contenu luminal (Clément *et al.*, 2015) (Figure 19 A).

2.3.1.1. Les Jonctions Serrées (JS)

Les jonctions serrées (tight junctions) assurent l'étanchéité des épithéliums entre deux compartiments tissulaires. Elles jouent un rôle fondamental dans le maintien de la fonction de filtre sélectif de l'épithélium (Salim et Soderholm, 2011) (Figure 18).

Au plan moléculaire, les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires (occludine, claudines et JAM-A, *Junctional Adhesion Molecule*) auxquelles se fixent les protéines intracellulaires (ZO, *Zonula Occludens*), ces dernières assurant la liaison avec les protéines du cytosquelette (les filaments d'actine) (Salim et Soderholm, 2011) (Figure 18).

Les jonctions serrées, de par leur localisation au niveau du pôle apical de la cellule, représentent l'étape limitante et assurent à elles seules la perméabilité de l'épithélium intestinal (Anderson, 2001).

Les jonctions serrées interdisent donc tout échange moléculaire passif entre le versant luminal et le versant basolatéral. Cette étanchéité est nécessaire au niveau de la paroi du tube digestif au risque de voir les molécules de l'alimentation et les bactéries intestinales pénétrer directement dans l'organisme (Salim et Soderholm, 2011).

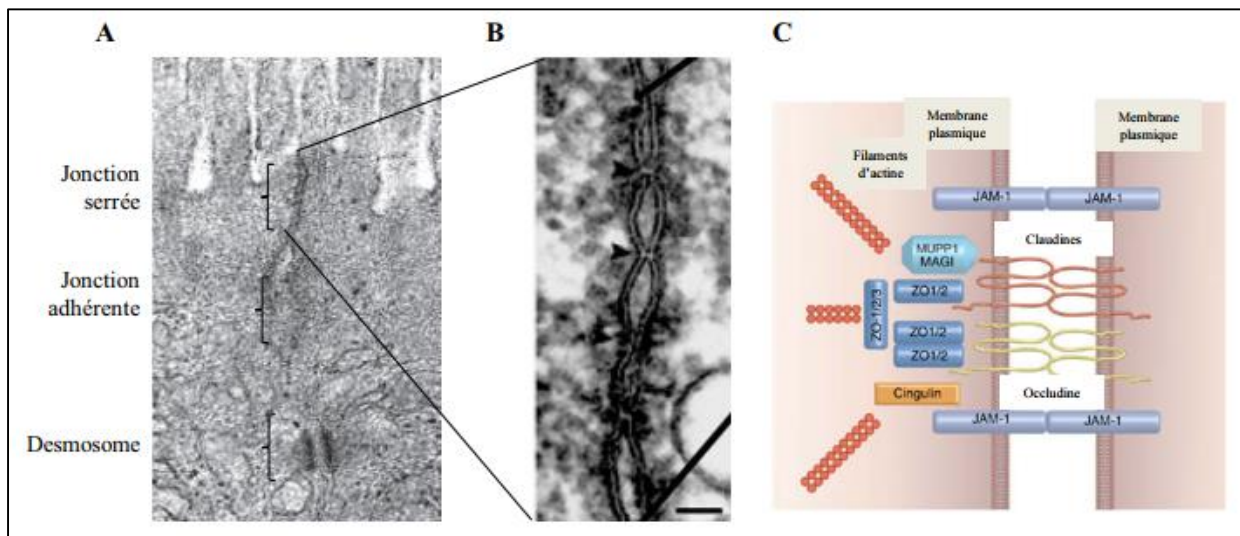


Figure 18 : Structure et composition protéique des complexes apicaux de jonctions. A : complexe apical de jonction, B : grossissement de la jonction serrées, C : l'organisation protéique des complexes de jonctions serrées (Ahrne *et al.*, 2011 et Niessen, 2007).

2.3.2. La voie transcellulaire

La voie transcellulaire permet le transport de molécules de plus grande taille, notamment de nature peptidique, et peut être empruntée à travers plusieurs types cellulaires présents dans l'intestin grêle. Elle est facilitée par : les cellules M (*Microfold cells*), les cellules caliciformes et les entérocytes (Figure 19 B).

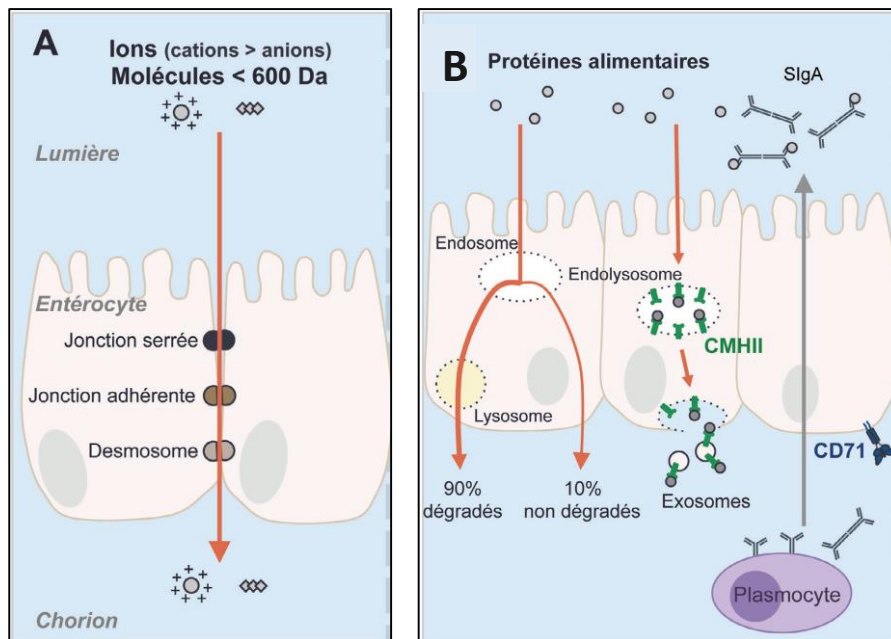


Figure 19 : Le transport paracellulaire (A) et le transport transcellulaire (B) en physiologie (Clément *et al.*, 2015).

Les cellules M, localisées dans l'épithélium recouvrant les organes lymphoïdes muqueux (plaques de Peyer, follicules lymphoïdes isolés), sont dépourvues de microvillosités, et sont connues de longue date pour leur capacité très efficace d'endocytose de macromolécules et de micro-organismes intacts (Ménard *et al.*, 2010). Néanmoins, il est maintenant établi que le passage de protéines ou de peptides peut se faire à distance de ces structures dans l'épithélium des villosités (Kraus *et al.*, 2005).

Récemment, McDole *et al.* (2012) ont identifié un passage d'antigènes associé aux cellules caliciformes ou « goblet cells » (GAP). Encore peu caractérisées, ces GAP permettent le passage rapide de larges protéines, comme l'ovalbumine. Le passage de protéines peut également s'effectuer à travers les entérocytes (Figure 19 B).

Ces cellules participent à la digestion des protéines alimentaires grâce aux enzymes présents au niveau de la bordure en brosse et dans les compartiments endolysosomaux. Les études réalisées avec des protéines marquées dans des biopsies intestinales montées en chambre de Ussing, suggèrent que 90 % des protéines endocytées au pôle apical des entérocytes sont digérées et libérées sous forme d'acides aminés ou de courts peptides (8 à 12 acides aminés) dans le chorion (Matysiak-Budnik *et al.*, 2003).

Une fraction non négligeable (10 %) de protéines alimentaires pourrait ainsi traverser l'épithélium intestinal sous forme intacte (Figure 19 B). En outre, la taille des courts peptides libérés au pôle basal des entérocytes est compatible avec leur chargement dans la poche à peptide des molécules du CMH de classe II et leur présentation au système immunitaire. Les complexes peptide-CMH de classe II peuvent se former dans les compartiments endolysosomiaux des entérocytes et être relargués dans le milieu extracellulaire à la surface de petites vésicules appelées exosomes (Figure 19 B). Les exosomes peuvent alors être captés par les cellules dendritiques et favoriser la présentation des peptides aux LT (Mallegol *et al.*, 2007) (Figure 19 B).

Des études chez la souris ont démontré le passage de peptides immunogènes à travers les cellules épithéliales villosités, suggérant qu'à la suite d'un gavage oral d'ovalbumine, des cellules dendritiques isolées des villosités choriales peuvent activer des LT CD4+ spécifiques de cette protéine (Chirido *et al.*, 2005). Il est maintenant reconnu que, dans des conditions normales, des protéines ou des peptides d'origine alimentaire peuvent traverser l'épithélium intestinal en petites quantités, induisant ainsi la production d'IgA spécifiques et l'activation de CD4+ LT régulateurs. Les IgA (SIgA) sécrétées dans la lumière intestinale peuvent capturer des peptides sous forme de complexes immuns et réduire leur absorption ultérieure (Mantis *et al.*, 2011). La LT régulatrice maintient une tolérance immunitaire active aux protéines alimentaires (Hadis *et al.*, 2011) (Figure 19 B).

2.4. Modulation de la perméabilité intestinale

Une augmentation de la perméabilité paracellulaire, permettant le passage à travers l'épithélium de macromolécules (antigènes alimentaires, fragments bactériens), est donc impliquée dans plusieurs pathologies intestinales (diarrhées infectieuses, SII, MICI comme MC, RCH ...) et potentiellement extraintestinales (allergies, obésité ...). Un contrôle des facteurs régulant la perméabilité intestinale paracellulaire mais également l'inflammation pouvant être associée constitue donc une stratégie préventive et thérapeutique intéressante.

3. Le microbiote intestinal

3.1. Définition du microbiote intestinal (MI)

Le microbiote intestinal (MI), autrefois appelé flore, est l'ensemble des micro-organismes commensaux (bactéries, virus et champignons) qui colonisent un site anatomique.

L'organe le plus colonisé est le tractus GI où le côlon à lui seul contient plus de 70% de tous les microbes du corps humain (Ley *et al.*, 2006). Ainsi, 10^{13} à 10^{14} microorganismes (soit 100 fois le nombre total de cellules du corps humain) cohabitent pacifiquement dans notre tractus gastro-intestinal avec la muqueuse ; l'épithélium intestinal mais aussi le système immunitaire mucorale (Ley *et al.*, 2006 ; Whitman *et al.*, 1998) et constituent une part intégrante de la physiologie de l'hôte (Figure 20).

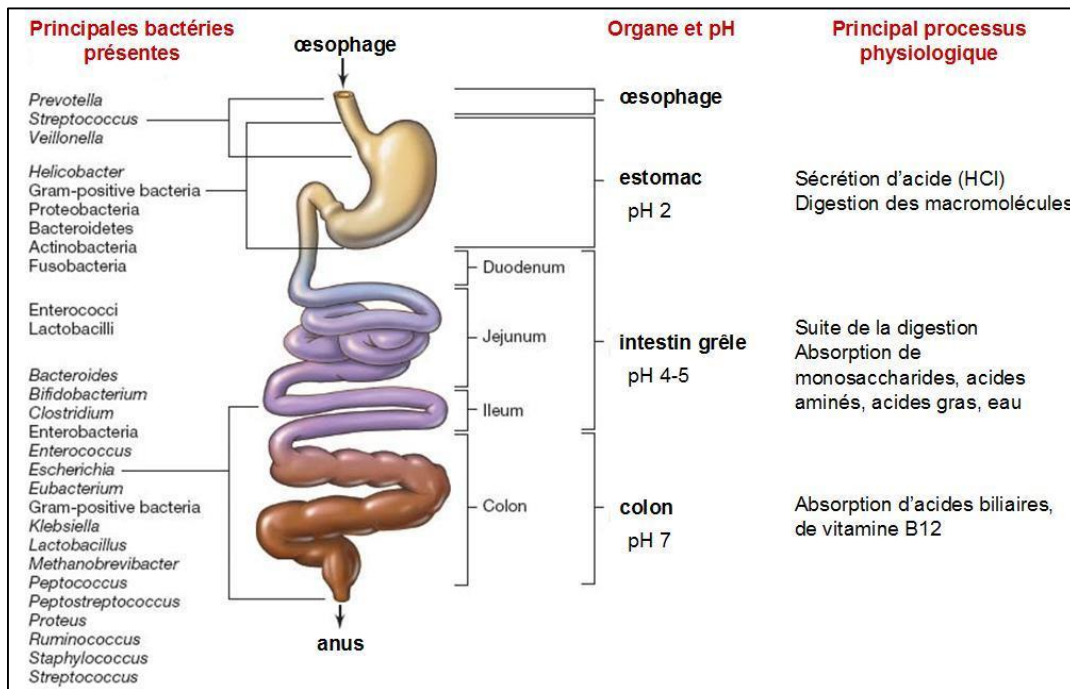


Figure 20 : Distribution du microbiote intestinal le long du tractus digestif chez l'adulte (Brock et Pearson, 2009).

3.2. Le microbiote intestinal du nouveau-né : acquisition et composition

3.2.1. La mise en place du microbiote intestinal à la naissance

Le fœtus des mammifères évolue in utero dans un environnement stérile et la colonisation microbienne débute durant le processus de la naissance. En l'absence des mécanismes immunitaires sophistiqués de l'adulte, le tube digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif où les niveaux de population atteignent rapidement 10^{11} bactéries par gramme de selles (Corthier, 2007) (Figure 21).

3.2.2. Composition du microbiote intestinal et son évolution

Les premières bactéries qui s'installent sont des germes anaérobies facultatifs, notamment des streptocoques, des entérobactéries et des staphylocoques. Peu de germes anaérobies stricts sont trouvés à ce stade. Après 48 heures, le nombre de germes est déjà de l'ordre de 10^4 – 10^6 UFC/ml de contenu intestinal (Langhendries, 2006) (Figure 21).

Dans les jours qui suivent, la concentration des germes anaérobies stricts (bifidobactéries et lactobacilles) augmente jusqu'à avoisiner 10^9 UFC/ml au dixième jour. Par ailleurs, le profil bactérien se diversifie avec augmentation en nombre d'*Escherichia coli*, *Bacteroides spp.* et pour une moindre part de *Clostridiaceae*. Le groupe des staphylocoques diminue parallèlement (Langhendries, 2006) (Figure 21).

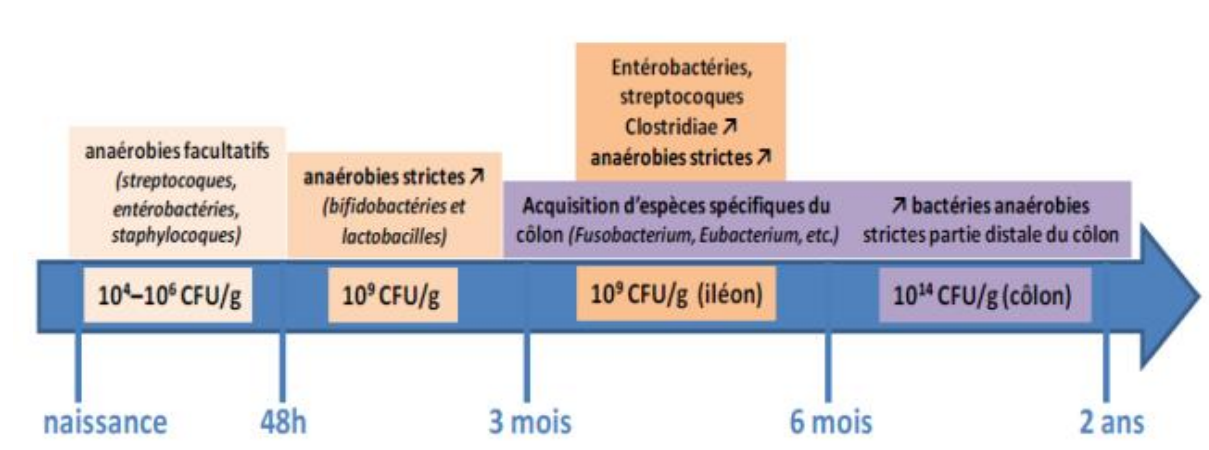


Figure 21 : Acquisition des populations bactériennes intestinales chez l'enfant (Lécuyer, 2012).

La troisième phase démarre avec le début de la diversification alimentaire. Les entérobactéries augmentent en nombre de même que les streptocoques et les *Clostridiaceae*. La flore anaérobie stricte plus diversifiée augmente également durant cette phase, au profit de variétés microbiennes très spécifiques du côlon (*Fusobacterium*, *Eubacterium*, etc.) (Langhendries, 2006) (Figure 21).

À la fin de la première année, la composition de la flore intestinale se rapproche de celle de l'adulte. Cette quatrième phase est marquée par la très grande augmentation de la flore anaérobie stricte dans la partie distale du côlon (Langhendries, 2006).

3.2.3. Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal

De nombreux éléments peuvent influencer l'établissement de MI, parmi lesquels l'âge gestationnel de naissance, le mode d'accouchement, l'environnement, le régime alimentaire ainsi que l'antibiothérapie administrée à la mère en *per partum* et/ou à l'enfant après la naissance (Clemente *et al.*, 2012) (Figure 22).

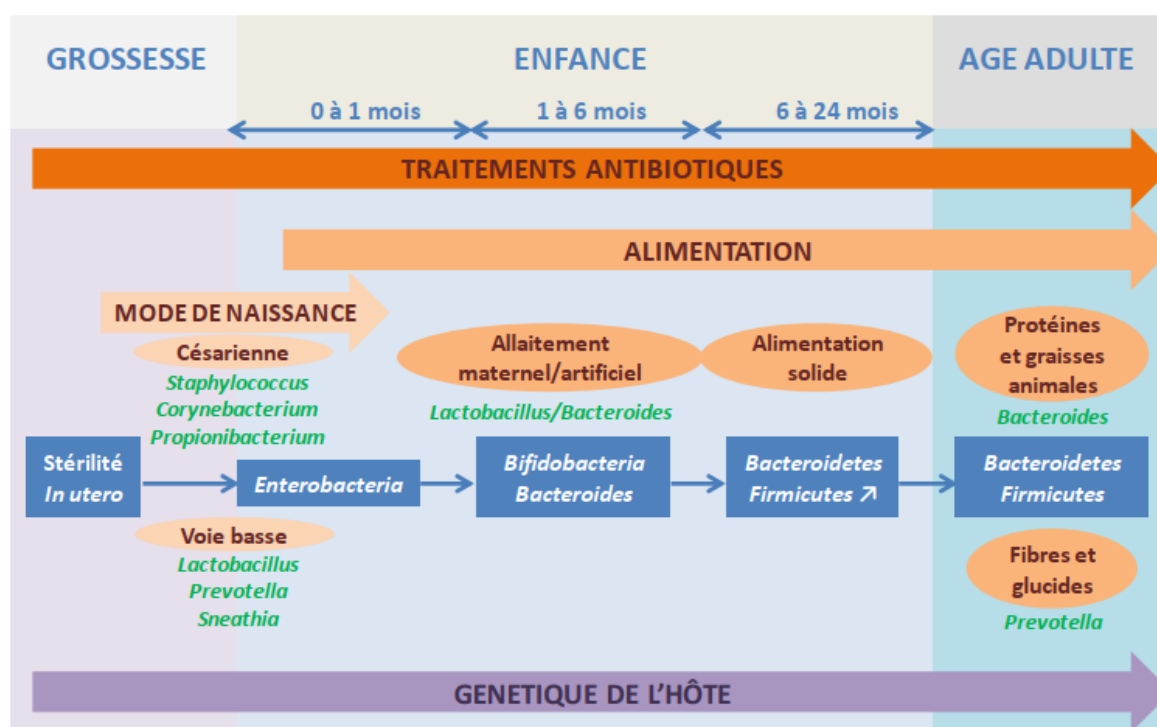


Figure 22 : Facteurs influençant le développement du microbiote intestinal chez l'Homme (Lécuyer, 2012).

3.2.3.1. Age gestationnel

Quelques études ont comparé le MI du nouveau-né prématuré et du nouveau-né à terme, confirmant que le MI du nouveau-né prématuré s'implantait tardivement et était caractérisé par une diversité bactérienne restreinte (Rougé, 2008).

L'influence de l'âge gestationnel du prématuré sur l'implantation de MI n'a été que très rarement étudiée. Dans une étude récente réalisée sur des enfants d'âge gestationnel variant entre 30 et 36 SA, Butel *et al.* (2007) ont rapporté que l'âge gestationnel des enfants avait une influence significative sur la colonisation intestinale par *Bifidobacterium*. Ces auteurs ont définis deux seuils d'implantation des Bifidobactéries : un premier seuil défini par un âge gestationnel de naissance de 32,9 SA et un deuxième seuil défini par un âge gestationnel corrigé

de 34 SA, suggérant qu'un certain degré de maturation digestive serait nécessaire pour l'implantation de ce genre bactérien.

3.2.3.2. Mode de délivrance

Les enfants nés par voie vaginale sont colonisés en premier lieu par les bactéries fécales et vaginales de leur mères (Penders *et al.*, 2006), tandis que les enfants nés par césarienne sont exposés aux bactéries de l'environnement hospitalier et des personnels soignants.

Une césarienne entraîne une diminution de la proportion de Bifidobactéries et de *Bacteroides fragilis*, tandis que parallèlement la proportion d'*E. coli*, de *Staphylococcus*, de *Streptococcus* et de *C. Difficile* est plus importante. Les enfants nés ainsi sont souvent amenés à passer un séjour plus long à l'hôpital et à recevoir un traitement antibiotique (Penders *et al.*, 2006).

De plus, il a été constaté une hausse de 20% de la prévalence d'asthme et de phénomènes allergiques chez les enfants nés par césarienne. Ceci est le résultat de la proportion diminuée en microorganismes à vocation protectrice que sont les Bifidobactéries et les *Bacteroides* (Bjorksten *et al.*, 1999).

Ce sont les enfants nés par voie vaginale au domicile de la mère, et exclusivement nourris au sein, qui ont la flore la plus bénéfique, avec une proportion importante de Bifidobactéries et une abondance diminuée en *E. coli* et en *C. difficile* (Penders *et al.*, 2006).

3.2.3.3. Mode d'allaitement

L'analyse comparative de composition de la flore fécale des nouveau-nés allaités au sein ou avec une préparation pour nourrisson révèle des taux variables des Bifidobactéries, *E. coli* et *Bactéroïdes* jusqu'à trois jours après la naissance. Au 7^e jour, chez les bébés recevant le lait maternel, les bactéries entériques et Bifidobactéries représentent un grand pourcentage de la flore totale (Cibik *et al.*, 2004).

Les lactobacilles et apparentés sont aussi présents en quantité assez importante. Chez les bébés nourris avec une préparation pour nourrisson, ce sont plutôt les genres *Bactéroïdes*, *Clostridium* et *Eubactérium* qui deviennent dominants. Ces derniers sont des marqueurs prédictifs de l'absence de lait maternel dans l'alimentation du nouveau-né. Apparemment le lait

maternel semble retarder l'apparition en dominance d'une flore diversifiée et composée des genres *Bactéroides*, *Clostridium* et apparentés.

Une étude clinique a également montré que le lait maternel a un effet protecteur contre la diarrhée infantile plus marqué dans les pays en voie de développement (Cibik *et al.*, 2004).

3.2.3.4. Influence de l'antibiothérapie

Les antibiotiques sont connus pour influencer le MI du nouveau-né. Des études ont été menées chez le nouveau-né prématuré pour mettre en évidence l'influence de l'antibiothérapie anténatale et postnatale sur le MI de ces enfants (Blakey *et al.*, 1982 ; Eriksson *et al.*, 1986 ; Hall *et al.*, 1990 ; Gewolb *et al.*, 1999 ; Bonnemaïson *et al.*, 2003 ; Schwiertz *et al.*, 2003 ; Butel *et al.*, 2007).

Il a été observé que l'administration de pénicilline seule ou associée à la gentamicine en période parentérale durant les 4 premiers jours de vie réduisait chez le nouveau-né prématuré traité l'incidence de *Clostridium sp*, de *Pseudomonas sp* et de *Lactobacillus sp*, avant le 12^{ème} jour de vie, et augmentait l'incidence de *Clostridium sp* et de *Pseudomonas sp* après le 12^{ème} jour de vie, par rapport aux prématurés non traités (Blakey *et al.*, 1982).

Eriksson *et al.* (1986) ont rapportés que le traitement de prématurés avec des antibiotiques (benzylpénicilline, cloxacilline, flucloxacilline, ampicilline...) par voie intraveineuse diminue le taux de germes anaérobies et augmente le taux de *Klebsiella spp*, mais pas des autres bactéries gram négatif.

D'après les travaux de Hall *et al.* (1990) le traitement des nouveaux nés prématurés avec les antibiotiques réduisait significativement l'incidence de la colonisation par les lactobacilles au 10^{ème} jour de vie, par rapport aux prématurés non traités.

L'administration orale d'antibiotiques (principalement l'amoxicilline) mais aussi d'antifongiques (le miconazole) à l'enfant pendant le premier mois de vie a montré une diminution du nombre de *Bifidobacterium* et de *Bacteroides fragilis* (Arrieta *et al.*, 2014 ; Albenberg *et al.*, 2014).

3.3. Rôle du microbiote intestinal

Le microbiome de l'intestin humain joue un rôle fondamental dans la régulation et le maintien des processus physiologiques et des relations homéostatiques dans le corps, avec la recherche prouvant complètement ses effets au-delà du fonctionnement gastro-intestinal comme dans la réponse immunitaire, fonctionnement psychologique et le métabolisme nutritionnel (Figure 23).

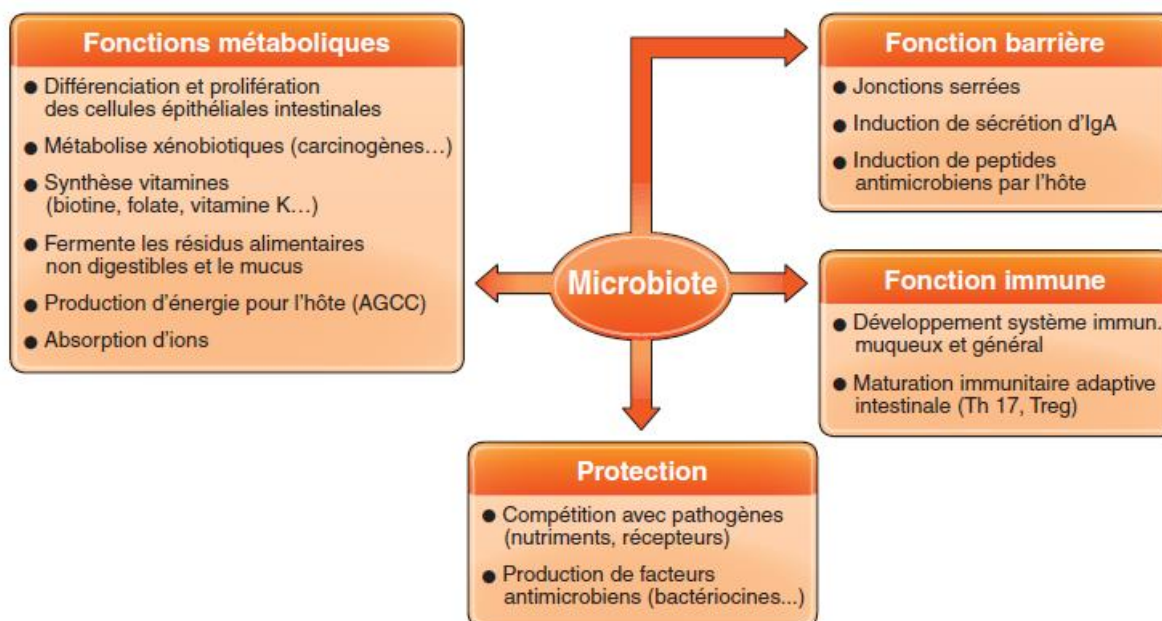


Figure 23 : Illustration des principales fonctions du microbiote vis-à-vis de l'hôte (Schneider, 2018).

3.3.1. Fonction métabolique

L'influence principale du microbiote sur le métabolisme de l'hôte provient du métabolisme bactérien des composés présents dans le côlon et en particulier du métabolisme des sucres, des gaz et des protéines (Nieuwdorp *et al.*, 2014).

Selon les individus et leur régime alimentaire, 10 à 60 g de glucides fermentescibles par jour parviennent au côlon. Différents groupes bactériens du microbiote colique avec des activités complémentaires forment une chaîne trophique de dégradation anaérobie des polymères glucidiques en métabolites fermentaires (Landman et Quévrain, 2016). La première étape est la dégradation des différents polymères en fragments plus petits (oligosides, oses, etc.) qui fait intervenir une grande variété d'hydrolases (polysaccharidase, glycosidases, etc.). Ces

enzymes sont produites par les bactéries du microbiote colique dites « fibrolytiques », appartenant principalement aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia*. Les bactéries glycolytiques transforment les glucides ainsi produits en pyruvate en utilisant la voie de la glycolyse. Par la suite, le pyruvate est lui-même transformé via différentes voies métaboliques en acides gras à chaînes courtes, produits finaux de la fermentation (Pryde *et al.*, 2002 ; Landman et Quévrain, 2016) (Figure 24).

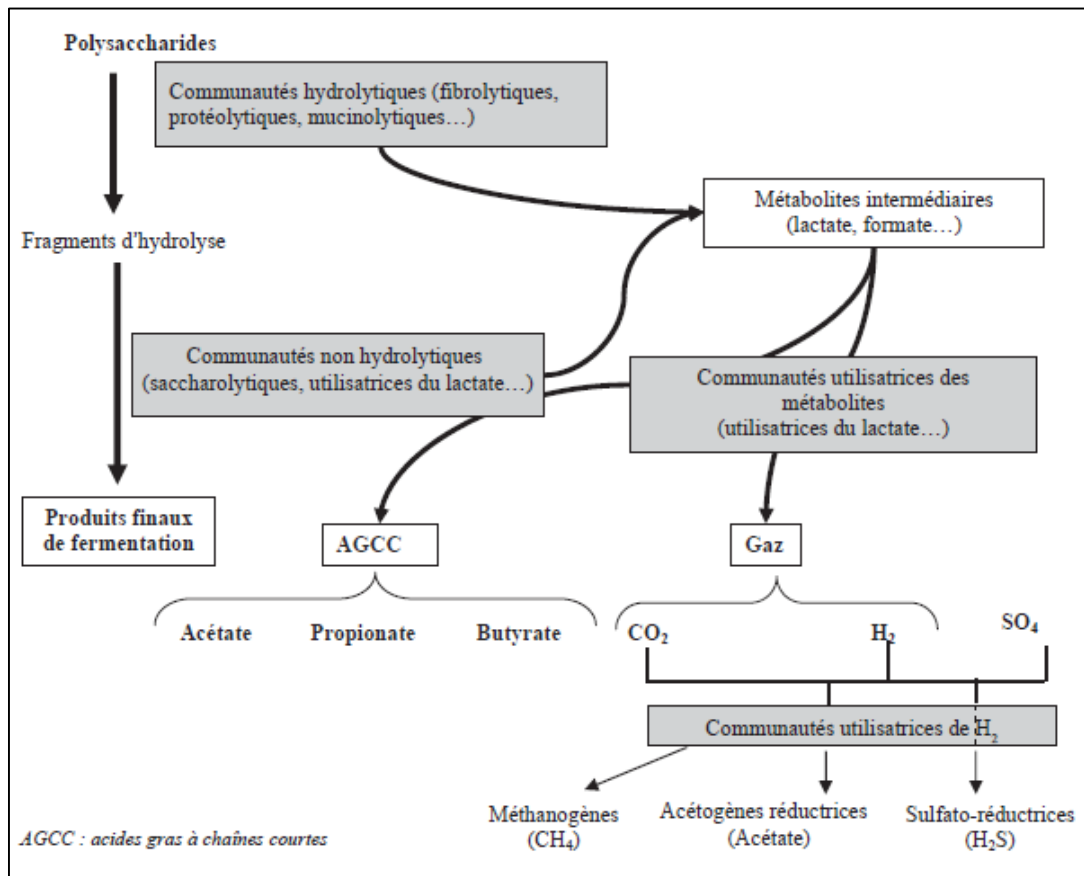


Figure 24 : Interactions nutritionnelles (cross-feeding) au cours de la dégradation et de la fermentation des polysaccharides par le microbiote intestinal humain (Bernalier-Donadille, 2010).

Le microbiote intestinal joue ainsi un rôle majeur dans l'homéostasie des gaz intestinaux. L'hydrogène est le gaz majoritairement produit lors des processus fermentaires, et ce, en grande quantité de façon quotidienne dans le côlon. Les espèces produisant de l'H₂ *in vitro* lors de la fermentation des oses ou des polysides appartiennent principalement au genre *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Eubacterium*. L'hydrogène est transformée *in situ* par des bactéries du microbiote colique dites hydrogénotrophes (Christl *et al.*, 1992). Les trois types de transformation principaux sont : en méthane par les archées méthanogènes (présents dans le

microbiote colique de 30 à 50 % des adultes et les deux espèces décrites dans le colon humain sont *Methanobrevibacter smithii* et *Methanosphaera stadtmaniae*), en acétate par les bactéries acétogènes, et enfin, en sulfures au potentiel délétère pour le colonocyte par les bactéries sulfato-réductrices (dont le genre prédominant est *Desulfovibrio*) (Landman et Quévrain, 2016).

Les bactéries du microbiote intestinal utilisent les protéines et les peptides comme les principales sources de carbone et d'azote dans le colon. Le métabolisme des protéines fait intervenir plusieurs espèces ayant des activités complémentaires. Les bactéries dites « protéolytiques », appartenant aux genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*, sont capables par leur activité protéasique d'hydrolyser les protéines en petits peptides (Landman et Quévrain, 2016) (Figure 25).

La fermentation des acides aminés utilise plusieurs réactions d'oxydation et de réduction dont la principale est la voie réductrice de désamination et aboutit comme la fermentation des glucides à la formation d'acides gras à chaînes courtes (acétate, propionate, butyrate) mais aussi d'ammoniac (Landman et Quévrain, 2016) (Figure 25).

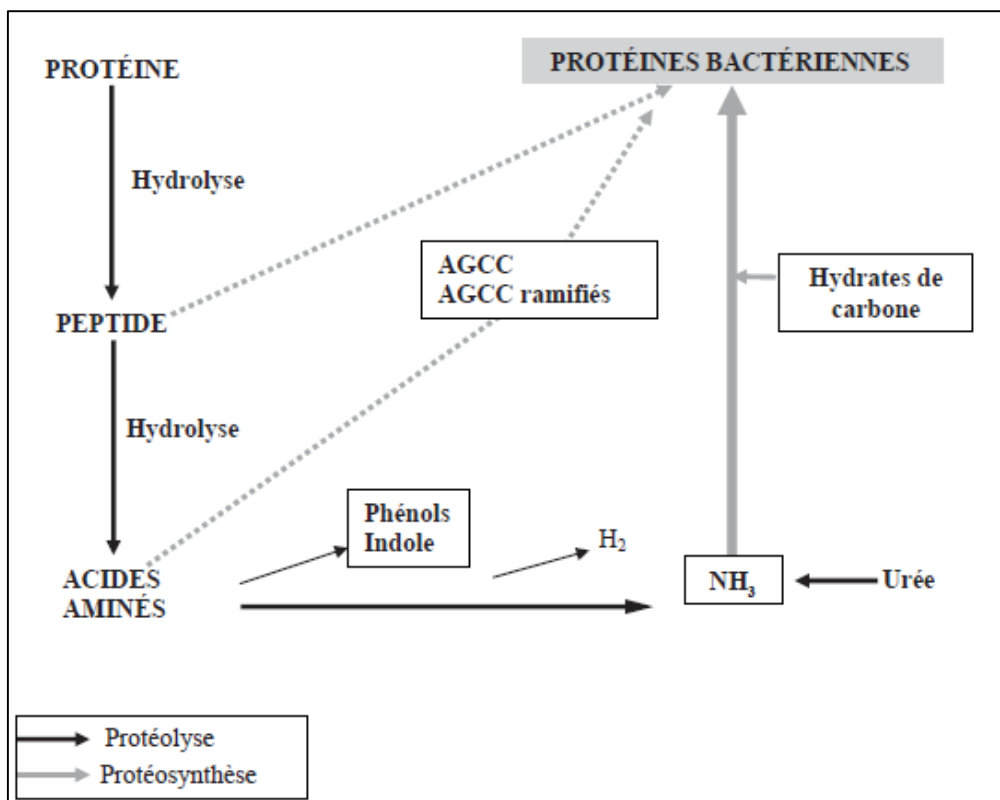


Figure 25 : Métabolisme des protéines par le microbiote intestinal humain (Bernalier-Donadille, 2010).

Les lipides de la lumière colique comprennent les lipides non absorbés dans l'intestin grêle, ceux provenant de la desquamation des colonocytes et les lipides bactériens. Ces acides gras sont transformés (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation ...) par les bactéries du microbiote colique (Landman et Quévrain, 2016). En outre, Le cholestérol colique, qui provient pour la majorité de la bile et pour le reste de l'alimentation et de la desquamation des cellules épithéliales intestinales, est transformé en coprostanol par le microbiote, avec une efficacité très variable d'un sujet à l'autre. Le coprostanol n'est pas absorbé et est donc éliminé dans les fèces (Sokol, 2014).

3.3.2. Effet barrière

3.3.2.1. Protection contre les pathogènes

En contact avec le milieu extérieur, le TD constitue une porte d'entrée pour les pathogènes. Le MI exerce un effet de barrière contre les attaques potentielles de l'environnement. Le microbiote dominant s'oppose à l'implantation des bactéries en transit, en sécrétant des bactériocines, en produisant des acides gras volatiles (inhibition de la croissance bactérienne) et/ou occupant des récepteurs ou encore en inhibant la production ou les effets des toxines bactériennes (Rougé, 2008).

La production de colicine et microcine (peptides antimicrobiens) par *Escherichia coli*, la synthèse de Ruminococcine A par *Ruminococcus gnavus* dirigée contre *Clostridium difficile* ; l'émission de protéases par *Saccharomyces boulardii* qui digèrent la toxine A de *Clostridium difficile* sont de nombreux exemples de cet effet barrière (Rougé, 2008).

3.3.2.2. Maintien de l'intégrité de la barrière intestinale

D'autre part, le microbiote intestinal est également impliqué dans le maintien de la barrière intestinale. Par exemple, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* protègent les cellules épithéliales des effets pro-apoptotiques de certains germes. D'autres microorganismes maintiennent l'intégrité de l'épithélium en régulant positivement des gènes impliqués dans la translocation des jonctions serrées ou le maintien des desmosomes. L'effet de consolidation de la barrière par les bactéries est également un mécanisme de défense dirigé contre les pathogènes invasifs. En effet, des lactobacilles inhibent l'adhésion épithéliale d'*Escherichia coli* entéropathogène en stimulant la synthèse de mucine, renforçant la barrière protectrice de mucus (Ouwerkerk *et al.*, 2013 ; Walsh *et al.*, 2014).

3.3.3. Fonction immunitaire

La stimulation permanente du système immunitaire par le microbiote intestinal est en fait nécessaire non seulement pour son développement et sa maturation mais également pour le maintien de l'homéostasie intestinale, de la fonction de barrière de l'épithélium ou encore de l'équilibre entre réponses pro- et anti-inflammatoires (Corthier, 2007) (Figure 26).

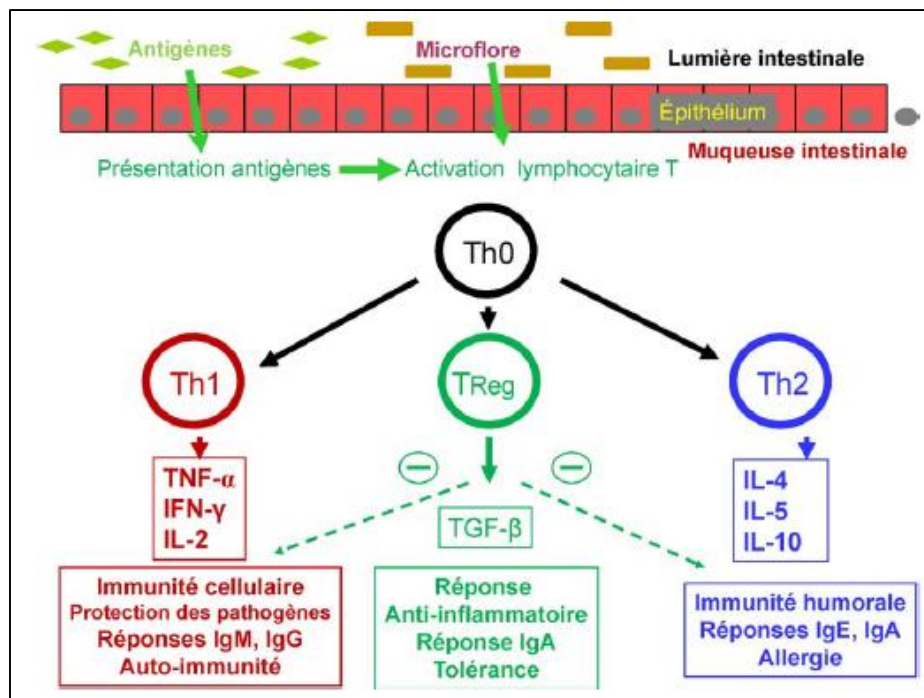


Figure 26 : Interactions microflores et système immunitaire et orientations de la réponse immune (Goulet, 2009).

3.4. Contribution du microbiote à l'homéostasie intestinale

L'intégrité des barrières intestinales, qui comprennent les barrières mécaniques, chimiques, biologiques et immunologiques, détermine la perméabilité intestinale. Lorsqu'une barrière est franchie, la perméabilité de l'intestin augmente.

Les bactéries sont déterminantes dans le développement du tube digestif et le maintien de son homéostasie, via la reconnaissance de composants bactériens par les récepteurs TLR (toll-like receptors) présents sur/dans les CEI (Abreu *et al.*, 2005). Divers composants bactériens stimulent l'expression des protéines de jonctions serrées, et celle des HSP, participant ainsi à la protection intestinale contre les agressions. Certains composés, appartenant notamment à des bactéries probiotiques telles que les lactobacilles, ainsi que certaines voies de

signalisation des CEI de l'hôte, ont été identifiées (Lebeer *et al.* 2008). Mais ce dialogue moléculaire n'est pas totalement décrypté à l'heure actuelle (Lallès, 2013).

Le microbiote, à travers l'évolution avec l'hôte, a des influences fonctionnelles majeures sur chaque composant qui aide à maintenir l'homéostasie intestinale (Torok *et al.*, 2008; Roto *et al.*, 2015; Rinttila et Apajalahti, 2013; Sergeant *et al.*, 2014; Polansky *et al.*, 2016). Le microbiote intestinal facilite la digestion et la fermentation des aliments et des composés alimentaires indigestes pour fournir des acides aminés et des vitamines essentiels à l'hôte (Rinttila et Apajalahti, 2013). En outre, les métabolites bactériens tels que les acides gras à chaîne courte (AGCA tels que le butyrate) fournissent de l'énergie aux cellules épithéliales qui tapissent l'intestin ainsi que l'expression des facteurs de virulence des bactéries pathogènes (Rinttila et Apajalahti, 2013 ; Sergeant *et al.*, 2014; Cecek et Binek, 2017; Roto *et al.*, 2015; Polansky *et al.*, 2016 ; Kogut, 2019).

3.5. La translocation bactérienne (TB)

La translocation bactérienne (TC) est définie comme l'évasion de bactéries indigènes viables du tractus gastro-intestinal (GI) vers les ganglions lymphatiques mésentériques, les organes stériles et la circulation sanguine (Deitch *et al.*, 1996).

En plus, le terme s'applique également au passage de particules inertes et d'autres macromolécules antigéniques. Ces produits comprennent l'ADN ; lipopolysaccharide (LPS) : grandes molécules trouvées sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif ; peptidoglycane : polymère qui joue un rôle structurel clé dans les parois cellulaires des bactéries à Gram positif ; acide lipotéchoïque (LTA) : un constituant clé des parois cellulaires bactériennes à Gram positif ; et flagelline : la protéine qui forme le composant principal d'un flagelle bactérien (Roy et Gatt, 2012).

La translocation des bactéries (TB) de la lumière intestinale vers le sang et les organes systémiques est due à des dommages dans la barrière intestinale, l'altération de la flore normale ou l'immaturation du tractus gastro-intestinal. En effet, l'immaturation du système immunitaire intestinal augmente le risque d'infections systémiques (Duffy, 2000) (Figure 27).

Les bactéries présentant un potentiel de pathogénicité élevé peuvent traverser la barrière intestinale (Lichtman, 2001).

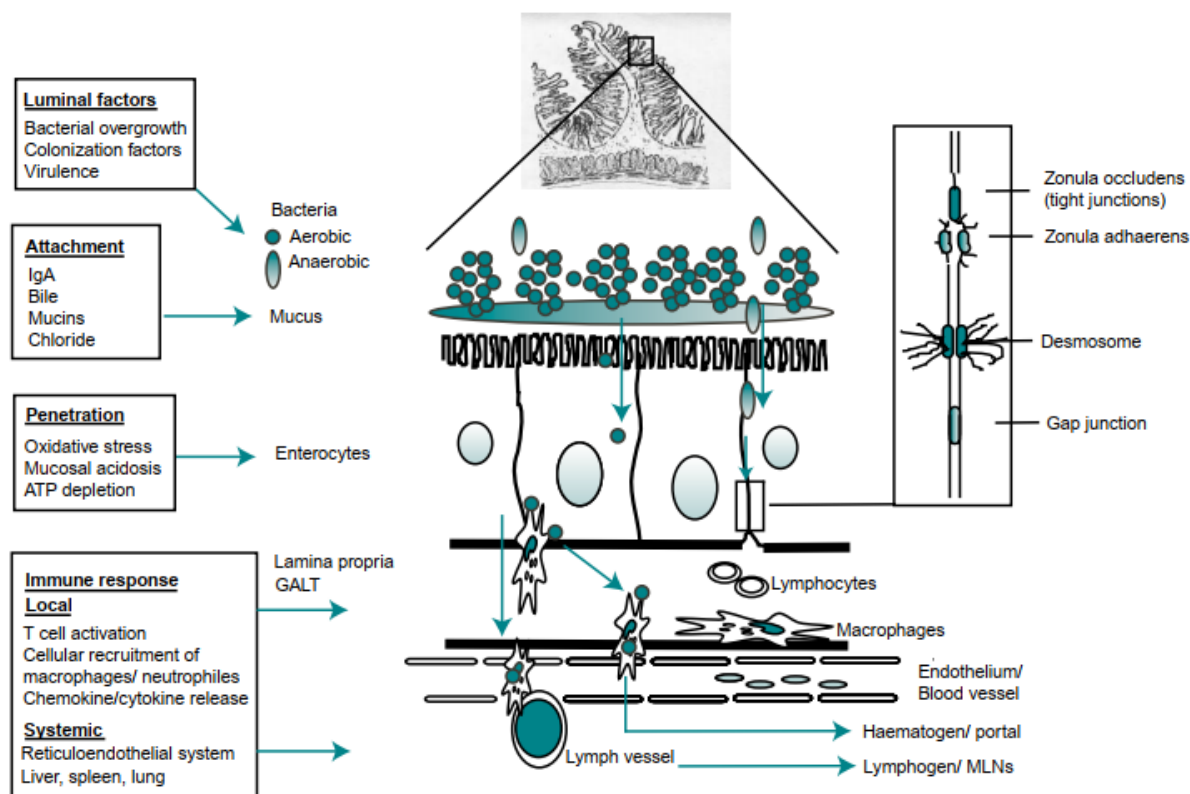


Figure 27 : Mécanismes et composants impliqués dans le processus de Translocation Bactérienne (TB) (Wiest et Rath, 2003).

3.5.1. Microbiologie des Translocations Bactériennes (TB)

Les TB sont fréquemment polymicrobiennes (Plantefève et Bleichner, 2001). La famille des entérobactéries (*E. coli*, *Klebsiella spp.*), les entérocoques et les *streptocoques spp.* sont les organismes les plus répandus observés dans la translocation bactérienne chez l'homme (O'Boyle *et al.*, 1998).

Une étude sur des souris a démontré que les bactéries à Gram négatif se transféraient en grand nombre vers le MLN, tandis que les bactéries anaérobies obligatoires et à Gram positif se translocaient à des niveaux beaucoup plus faibles (Steffen *et al.*, 1988 ; Prizone *et al.*, 2012).

Une autre étude a également montré que certaines espèces d'*E. coli* peuvent se déplacer plus efficacement que d'autres espèces (Ljungdahl, 2000).

Cette différence serait due à une capacité accrue à adhérer à la muqueuse intestinale (Skinner *et al.*, 2020).

4. Le système immunitaire intestinal

Étant donné que plus de 70 % des cellules du système immunitaire se trouvent dans le tractus gastro-intestinal, il n'est pas surprenant qu'il soit considéré comme le plus grand organe du système immunitaire (Vighi *et al.*, 2008).

Le système immunitaire intestinal, dont les fonctions peuvent sembler contradictoires, joue un rôle très important dans la physiologie des mammifères. Il doit d'abord développer des réponses protectrices cellulaire et humorale envers les virus, bactéries ou parasites entéropathogènes (Mowat, 2003 ; Corthier, 2007).

La réponse humorale est réalisée essentiellement grâce à la sécrétion d'anticorps spécifiques des muqueuses, les IgA, bloquant l'adhésion de bactéries pathogènes, la multiplication virale dans l'entérocyte et neutralisant les entérotoxines. La réponse cellulaire, quant à elle, fait appel aux lymphocytes intraépithéliaux qui permettent de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal (Mowat, 2003 ; Corthier, 2007).

Parallèlement à cette fonction protectrice, le système immunitaire intestinal doit également empêcher l'induction de réponses immunes envers les composants des aliments et des bactéries commensales présentes dans le tube digestif. Ce phénomène est nommé la tolérance orale (Mowat, 2003 ; Corthier, 2007) (Figure 28).

Le système immunitaire inné du système gastro-intestinal comprend de multiples éléments, dont chacun contribue à l'équilibre délicat entre la tolérance aux bactéries commensales et la réponse aux agents pathogènes (Celi *et al.*, 2017).

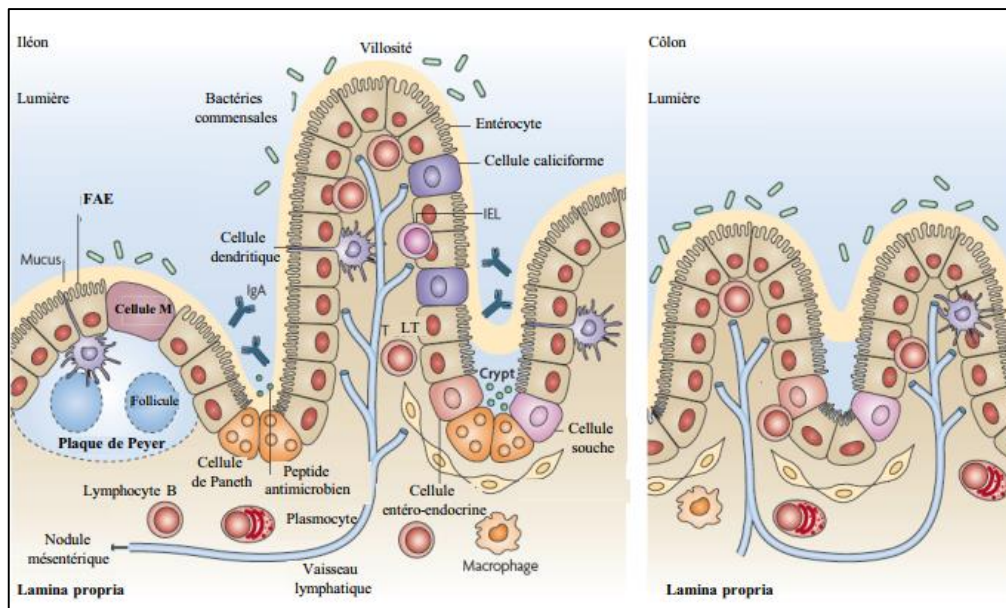


Figure 28 : Organisation du système immunitaire intestinale (Abreu, 2010).

Par ailleurs, les cellules caliciformes (goblet) sécrètent du mucus, et les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens pour favoriser le rejet des bactéries de la surface épithéliale. Les cellules des microplis (cellules M) et les cellules des coupes facilitent le transport des antigènes luminaux et des bactéries vivantes à travers la barrière épithéliale vers les cellules dendritiques (CD) situées dans la *lamina propria* (LP). Les CD surveillent le contenu de la lumière intestinale et activent les lymphocytes. Collectivement, les diverses fonctions des CEI créent un obstacle dynamique à l'environnement (Figure 28) (McDole *et al.*, 2012).

Aussi, les lymphocytes intraépithéliaux spécialisés sont intercalés parmi les CEI. Ils sont importants comme première ligne de défense, ainsi que pour le maintien des tissus, l'intégrité des barrières et la prévention de la translocation bactérienne à travers l'épithélium (Li *et al.*, 2011 ; Honda et Littman 2012) (Figure 28).

D'autres cellules immunitaires innées importantes dans le LP sont les macrophages, les éosinophiles et les cellules lymphoïdes innées (CAL). Les macrophages intestinaux régulent les réponses inflammatoires aux bactéries et aux antigènes qui pénètrent dans l'épithélium, protègent la muqueuse contre les pathogènes nocifs et récupèrent les cellules mortes et les débris étrangers. Les éosinophiles ont des buts multiples, mais leur travail principal est d'aider les macrophages à protéger le corps (Smith *et al.* 2011) (Figure 28).

On pense que ces cellules jouent un rôle important dans l'homéostasie immunitaire intestinale, y compris l'induction de la différenciation et du maintien des plasmocytes (Chu *et al.*, 2014) et la préservation de l'intégrité des tissus (Lee *et al.*, 2010).

Les CAL peuvent être divisées en sous-groupes, les CAL 3 étant les plus importants dans ce contexte. Les CI3 sont définis en fonction de leur capacité de produire de l'IL-17 et/ou de l'IL-22, et c'est en raison de leur importance critique dans le maintien de la fonction de barrière (Spits *et al.*, 2013).

Dans le système immunitaire adaptatif, les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ constituent la majorité des lymphocytes T dans l'intestin. Les lymphocytes T CD4+ dans la muqueuse intestinale comprennent un nombre important de lymphocytes IL-17 (Th17) et de cellules P3 (Fox-P3) exprimant des lymphocytes T régulateurs (Tregs). Ces 17 cellules jouent un rôle vital dans l'homéostasie de l'épithélium et dans la régulation de la défense de l'hôte contre divers agents pathogènes extracellulaires (Korn *et al.*, 2009).

Les Tregs possèdent différentes fonctions immunosuppressives et jouent un rôle important dans la régulation du système immunitaire intestinal. La PL intestinale est particulièrement abondante en Tregs, comparativement à d'autres organes et tissus (Hall *et al.*, 2008). L'initiation et le maintien de la différenciation et de la fonction de Tregs dépendent tous deux du facteur de transcription FoxP3 (Zheng et Rudensky, 2007). Leurs effets régulateurs se manifestent par la production de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- β (Sakaguchi *et al.*, 2008) et par l'inhibition d'une manière dépendante du contact cellulaire (Maloy *et al.*, 2003; Sakaguchi *et al.*, 2008). De plus, le nombre et la fonction des Tregs muqueux seraient affectés par la présence de bactéries intestinales. Les Tregs sont essentiels à la tolérance intestinale envers les antigènes alimentaires et le microbiote, et ils jouent un rôle important dans la modulation de l'homéostasie intestinale et l'intégrité de la barrière intestinale (Arpaia *et al.*, 2013 ; Lathrop *et al.*, 2011; Round et Mazmanian 2010).

5. Les marqueurs biologiques de la fonctionnalité gastro-intestinale

5.1. Biomarqueurs de la fonction de la barrière intestinale

Une fonction efficace de barrière intestinale est essentielle pour maintenir une fonctionnalité gastro-intestinale optimale, la santé et le bien-être animal (Celi *et al.*, 2017).

La première couche de la barrière intestinale est constituée d'une couche de mucus formée d'une couche externe associée au microbiote et d'une couche interne à fortes concentrations d'IgA et de mucine (Bischoff, 2011).

Plusieurs techniques sont disponibles pour évaluer la perméabilité et l'intégrité intestinales (Bischoff *et al.*, 2014). Ils peuvent être mis en place *in vitro* ou *in vivo*, ils ont été validés dans différents modèles animaux, ils peuvent mesurer un large éventail de molécules (ions, glucides de différentes tailles, macromolécules et antigènes, produits bactériens et bactéries), dans plusieurs matrices biologiques (sang périphérique, sang de la veine porte, urine).

Un résumé des différents biomarqueurs utilisés pour caractériser la fonction de barrière intestinale est présenté dans le tableau 02.

Tableau 02 : Biomarqueurs gastro-intestinaux de la fonction de la barrière intestinale (Celi *et al.*, 2019).

Biomarqueurs	Site d'essais	Echantillon biologique	Méthode	Observations
Lactulose (L)	Intestin grêle	Urines ; Sang.	Chromatographie en phase liquide ou gazeuse ; spectrométrie de masse	Mesure la perméabilité paracellulaire (L et FITC-d) ou transcellulaire (R et M).
L-rhamnose (R)	Intestin grêle			
Mannitol (M)	Intestin grêle			
Fluoresceine isothiocyanate dextran (FITC-d)	Intestin entier			
Mucine 2	Intestin entier	Matières fécales	Fluorescence	Peu d'études ont été menées sur des animaux d'élevage.
Acide Sialique	Intestin entier	Contenu digestif ; matières fécales	Colorimétrique/fluorimétrie	Il doit être validé.
Résistance électrique transépithéliale	Intestin entier	biopsie tissulaire	Mesure du courant de court-circuit en Chambres Ussing	Peut mesurer la perméabilité intestinale et le mouvement des nutriments dans des sections spécifiques de l'intestin ; technique invasive qui nécessite un équipement et un personnel hautement spécialisés ; ne peut pas être effectuée sur le même animal à plusieurs reprises.

Tableau 02 (Suite) : Biomarqueurs gastro-intestinaux de la fonction de la barrière intestinale (Celi *et al.*, 2019).

Biomarqueurs	Site d'essais	Echantillon biologique	Méthode	Observations
Diamine oxydase	Intestin grêle	Sang	Spectrophotométrie	Mesure l'étendue des dommages aux muqueuses et donc l'estimation indirecte de la perméabilité intestinale.
Protéines des jonctions serrées	Intestin entier	biopsie tissulaire ; plasma ; urine.	qPCR; Western blot ; immuno-essai	Technique invasive ; ne peut être effectuée sur le même animal à plusieurs reprises ; claudine-3 et zonuline pourrait être mesurée par ELISA dans l'urine, mais les données sont limitées.
Citrulline	Intestin grêle	Sang	Spectrométrie de masse ; immuno-essai	Mesure indirecte de la perméabilité intestinale ; ne convient pas au poulet.
Phosphatase alcaline intestinale	Intestin grêle	Matières fécales	dosage immunologique	Marqueur des entérocytes matures.
Protéines liant les acides gras intestinaux	Intestin grêle	Sang ; urines ; matières fécales	dosage immunologique	Marqueur des dommages intestinaux ; mesure indirecte de la perméabilité intestinale ; le niveau de I-FABP circulant a été rapporté pour corrélérer avec l'état histologique de l'épithélium.

5.2. Biomarqueurs du microbiote gastro-intestinal

L'étude du microbiome gastro-intestinal émerge comme un domaine passionnant et puissant pour gérer non seulement la santé gastro-intestinale, mais celle de l'organisme entier. Le microbiome gastro-intestinal a été désigné comme le « cinquième organe » et, en fait, la documentation suggère que le microbiome joue un rôle crucial dans le traitement des signaux et des indices provenant de l'environnement et leur distribution à l'organisme (Dietert et Silbergeld, 2015).

Il a été proposé que l'une des principales fonctions du microbiome gastro-intestinal soit d'enseigner au système immunitaire à maintenir une relation mutualiste entre le système immunitaire de l'hôte et le microbiome lui-même (Dietert et Silbergeld, 2015). Les résultats de cette relation complexe sont les principales voies que le microbiome gastro-intestinal a utilisées pour moduler la fonctionnalité des organes et des systèmes tels que le cerveau et le système immunitaire. Le microbiome gastro-intestinal module plusieurs fonctions physiologiques comme la digestion et l'absorption, le métabolisme énergétique, le développement du système

immunitaire, la prévention des infections (Willing et Van Kessel, 2010 ; Lee et Hase, 2014 ; Marchesi *et al.*, 2015) (Tableau 03).

Tableau 03 : Biomarqueurs gastro-intestinaux du microbiote (Celi *et al.*, 2019).

Biomarqueurs	Site d'essais	Echantillon biologique	Méthodes	Observations
Lactate	Intestin entier	Sang ; contenu digestif	Colorimétrique/Fluorimétrie	Mesure indirecte de la perméabilité intestinale, car le lactate peut traverser la muqueuse intestinale jusqu'au sang
Succinate	Intestin entier	contenu digestif ; matières fécales ; urine ; sang	Chromatographie en phase gazeuse ; spectroscopie de masse ; spectroscopie de mobilité ionique ; résonance magnétique nucléaire.	Composés phénoliques produits par fermentation microbienne d'acides aminés aromatiques ; ces composés organiques volatils pourraient être quantifiés à l'aide de nez électroniques et d'autres capteurs portatifs
Phénol p-crésol Indole	Intestin entier	Sang ; urine ; matières fécales		
Ammoniac	Gros intestin	Matières fécales ; urine	Colorimétrique	Associé à des niveaux élevés de protéines alimentaires, conduisant à une fermentation microbienne excessive
Hydrogène sulfide	Gros intestin	Matières fécales	Colorimétrique	Associé à des niveaux élevés de protéines alimentaires, riche en acides aminés sulfureux et en soufre inorganique

5.3. Biomarqueurs du statut immunitaire intestinal

La caractérisation de la relation entre le système immunitaire et le tractus gastro-intestinal prend de plus en plus d'importance non seulement dans la fonctionnalité gastro-intestinale, mais aussi dans la santé, le bien-être et les maladies (Yegani et Korver, 2008 ; Celi *et al.*, 2017).

L'importance de la barrière gastro-intestinale est soulignée par le fait qu'il s'agit d'une entité dynamique et fonctionnelle qui, tout en séparant le contenu intestinal de l'hôte, est également le lieu d'échantillonnage intensif et de communication entre l'hôte et le contenu gastro-intestinal (Celi *et al.*, 2019). Par conséquent, un large éventail de tests et de biomarqueurs peuvent être considéré pour l'évaluation de la barrière gastro-intestinale. Les biomarqueurs de l'inflammation gastro-intestinale et de la fonction immunitaire peuvent fournir des renseignements importants sur les interactions du tractus gastro-intestinal avec l'environnement et sur le maintien de la fonctionnalité de la barrière gastro-intestinale (Celi *et al.*, 2019).

Un résumé des différents biomarqueurs utilisés pour caractériser l'état immunitaire dans le système gastro-intestinal est présenté dans le tableau 04.

Tableau 04 : Biomarqueurs gastro-intestinaux du statut immunitaire (Celi *et al.*, 2019).

Biomarqueurs	Site d'essais	Echantillon biologique	Méthode	Observations
Protéines associées à la pancréatite ou protéines III dérivées des îlots de régénération	Intestin grêle	Sang ; urine ; matières fécales.	dosage immunologique	Lectines produites, stockées et sécrétées dans l'intestin et le pancréas ; le dosage dans les fèces doit être validé.
Myéloperoxydase	Intestin entier	Matières fécales	dosage immunologique	Marqueur de l'activité neutrophile ; très stable dans les échantillons fécaux ; non présent chez les espèces aviaires.
Urine de néoptérine.	Intestin entier	Matières fécales ; sang	dosage immunologique	Marqueur des macrophages et des cellules dendritiques ; très résistant à la protéolyse.
Alpha-1 antitrypsine	Intestin grêle	Matières fécales ; sang	dosage immunologique	glycoprotéine synthétisée dans le foie ; très résistante à la protéolyse.
Protéine cationique éosinophile et protéine éosinophile X	Intestin entier	Matières fécales	dosage immunologique	Marqueur de l'activité éosinophile.

Chapitre 3 :

Le stress oxydatif

1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif a d'abord été défini par Sies (1985, 1986) comme un grave déséquilibre entre l'oxydation et les antioxydants, « une perturbation de l'équilibre prooxydant-antioxydant en faveur des premiers, entraînant des dommages potentiels » (Halliwell et Poulsen, 2006).

Le stress oxydant est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à une production, endogène ou exogène, de radicaux libres oxygénés qui outrepassent leurs capacités antioxydantes. L'excès de radicaux libres non neutralisés par les moyens de défense est très dommageable pour les macromolécules essentielles, entraînant des anomalies dans l'expression des gènes et des récepteurs membranaires, prolifération ou mort cellulaire, troubles immunitaires, mutagenèse, dépôts de protéines ou de lipofuschine dans les tissus (Wang *et al.*, 2020).

Le stress oxydatif causé par une production disproportionnée de ERO contribue à de nombreuses maladies intestinales, cardiovasculaires et neurodégénératives, et même est associé à la vie humaine (Wang *et al.*, 2020).

2. L'origine du stress oxydant

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants (Favier, 2003).

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre (Figure 29). Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (Favier, 2003).

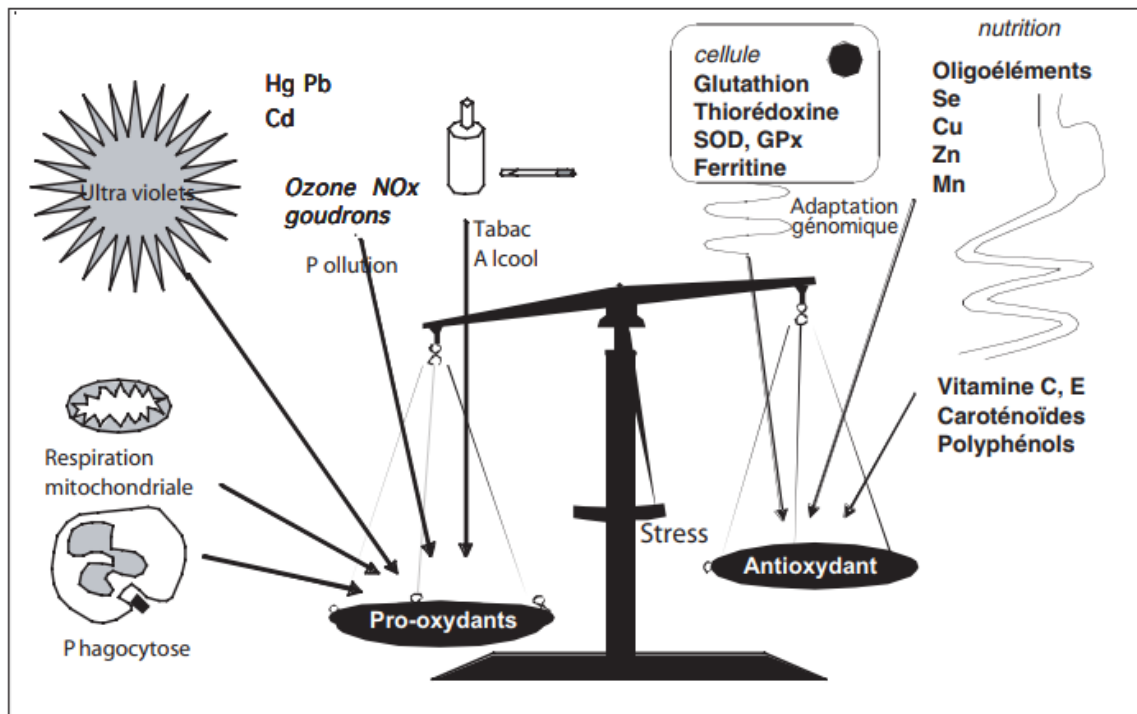


Figure 29 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

3. Les radicaux libres et les espèces actives de l'oxygène (ERO)

Les radicaux sont par définition des espèces chimiques possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité. Ils ont été longtemps considérés comme nuisibles, responsables de potentiels dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides (Migdal et Serres, 2011).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} (Yoshikawa, 2000).

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Favier, 2003) (Figure 30).

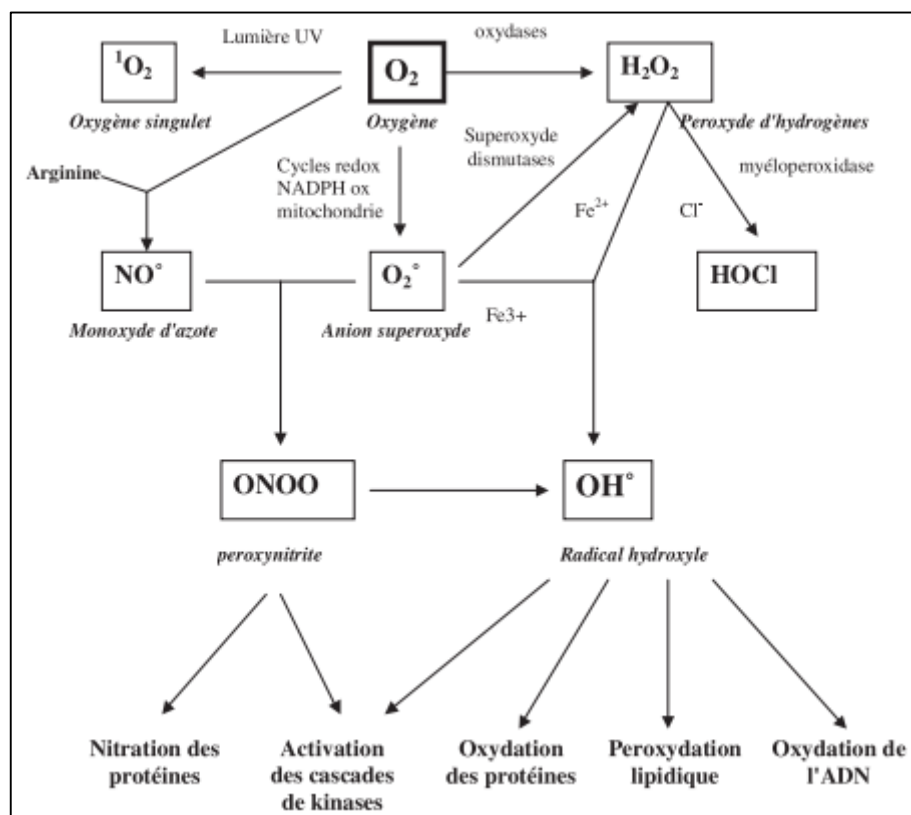


Figure 30 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

3.1. Effets biologiques des ERO

3.1.1. Action bénéfique

Les ERO jouent le rôle de seconds messagers, régulant plusieurs processus physiologiques moléculaires cellulaires et tissulaires. Elles participent dans la défense antibactérienne au cours des réactions de cytotoxicité face aux agents pathogènes, la destruction par apoptose des cellules tumorales, la transduction de signaux cellulaires, la régulation des gènes par un phénomène appelé contrôle redox des gènes, la modulation du métabolisme cellulaire par interaction ligand – récepteur, le développement embryonnaire, la croissance, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Bensakhria, 2018).

3.1.2. Actions délétères

Oxydation de l'ADN

L'ADN est attaqué principalement par les radicaux OH, et une variété de produits peuvent être produits par des réactions avec les bases d'ADN ou les sucres désoxyribose (Halliwell et Gutteridge, 1999). Par exemple, le OH peut ajouter à la guanine pour produire de la désoxyguanosine 8-hydroxy-2', qui peut être mesuré biochimiquement et détecté immunohistochimiquement. Les attaques sur les moitiés de sucre peuvent provoquer des ruptures de brins, tandis que celles sur les protéines histones peuvent conduire à des interconnexions qui interfèrent avec le pliage de la chromatine, la réparation de l'ADN et la transcription. Il peut donc en résulter une mutation ou une expression génétique aberrante (Burton et Jauniaux, 2011).

Peroxydation lipidique

Les radicaux hydroxyles sont capables de provoquer une peroxydation lipidique dans la membrane plasmique ou dans tout organite qui contient de grandes quantités de chaînes latérales d'acides gras polyinsaturés. En extrayant l'hydrogène de la chaîne latérale des hydrocarbures d'un acide gras, ils créent un radical centré sur le carbone, C. Si de l'oxygène est présent, il peut réagir pour former un radical peroxylique ($-C-O-O$), qui à son tour est capable d'extraire l'hydrogène d'un acide gras adjacent, propageant ainsi la réaction (Burton et Jauniaux, 2011).

Comme la vitamine E est soluble dans les lipides et possède une queue hydrophobe, elle a tendance à s'accumuler à l'intérieur des membranes lipidiques. Ici, il agit comme le plus important briseur de chaîne, car il réagit avec les radicaux lipidiques peroxyliques environ quatre fois plus rapidement qu'ils ne peuvent réagir avec les chaînes latérales des acides gras (Halliwell et Gutteridge, 1999).

La preuve de la peroxydation lipidique peut être détectée à l'aide d'anticorps dirigés contre l'un des principaux produits, le 4-hydroxynonéal. Il peut être efficacement détoxifié dans les cellules par le groupe d'enzymes glutathion S-transférase, mais des niveaux élevés sont associés à la perte de fluidité et de fonction de la membrane, et l'activation de la cascade apoptotique (Burton et Jauniaux, 2011).

Modifications protéiques

Les acides aminés, à la fois libres et dans les protéines, sont une cible pour les dommages oxydatifs. L'oxydation directe des chaînes latérales entraîne la formation de groupes carbonyles (aldéhydes et cétones), et la proline, l'arginine, la lysine et la thréonine sont particulièrement vulnérables à l'attaque. Les produits carbonylés sont stables et leur détection à l'aide d'enzymes-le dosage immunosorbant lié ou le transfert occidental est la méthode la plus couramment utilisée pour le dosage de l'oxydation des protéines (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

L'extraction d'ions hydrogène du groupe thiol de cystéine peut conduire à la formation de liaisons disulfures et à un repliement anormal des protéines, d'une manière analogue à l'activation de l'ASK1. Un pliage anormal peut entraîner une perte de fonction, mais aussi l'agrégation des protéines et la mort cellulaire (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

Enfin, le peroxy-nitrite réagira avec les résidus de tyrosine pour former de la 3-nitrotyrosine, qui peut à nouveau être détectée immunohistochimiquement. Aux niveaux physiologiques, on pense que la nitration des protéines est un processus sélectif et réversible qui mène à l'activation d'une manière analogue à la phosphorylation, mais à des niveaux plus élevés peut être préjudiciable. La nitration protéique dans le placenta peut donc avoir des effets divers, avec gain et perte de fonction (Myatt L., 2010).

4. Stress oxydatif intestinal

La lésion oxydative se produit lorsque le système antioxydant n'élimine pas les ERO supplémentaire de l'organisme hôte. Le stress oxydatif endommage principalement les macromolécules telles que l'acide nucléique, les protéines et les lipides (Norte *et al.*, 2018).

Les protéines sont la cible la plus fréquente de l'attaque des ERO car elles sont les composants les plus fondamentaux des tissus et des organes, étant responsables des fonctions physiologiques importantes de l'hôte (Talha *et al.*, 2021). L'attaque des ERO modifie les résidus d'acides aminés, croise les protéines et détruit la structure et la chaîne peptidique de la molécule protéique ciblée (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

La peroxydation lipidique du biomembrane mérite plus d'attention dans les dommages de stress oxydatif en raison de l'attraction solide parmi les espèces réactives d'oxygène et les graisses insaturées. De plus, la peroxydation lipidique peut favoriser la destruction de la

fonction cellulaire normale en modifiant sa structure, la fluidité du biofilm et la perméabilité de la paroi cellulaire (Sargis et Subbaiah, 2006).

Le stress oxydatif est directement lié aux dommages à l'ADN et à la modification de ses bases. Par exemple, l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène ont souvent été impliqués dans les dommages oxydatifs de l'ADN. Les ROS sont l'un des facteurs les plus importants pour les effets mutagènes, cancérigènes et tératogènes (Cooke *et al.*, 2003 ; Fleming et Burrows, 2020).

En bref, les substances étrangères potentielles dans l'intestin causant le stress oxydatif pourraient cibler les macromolécules (ADN, protéine, et lipides) au niveau moléculaire, ce qui mène finalement à la maladie intestinale macroscopique (Riaz Rajoka *et al.*, 2021).

5. Système de défense antioxydant dans l'intestin

Un antioxydant est défini comme « toute substance qui, lorsqu'elle est présente à une faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou empêche considérablement l'oxydation de ce substrat » (Halliwell et Gutteridge, 1999).

Divers antioxydants avec des fonctions différentes jouent leurs rôles respectifs dans le réseau de défense *in vivo* (Figure 31).

Comme première ligne de défense contre le stress oxydatif, la muqueuse intestinale contient un vaste système de défense antioxydants comprenant des enzymes (CAT, SOD, ou GP_x) et des charognards endogènes et exogènes non enzymatiques comme le glutathion, les ions transitoires (p. ex., Fe²⁺, Cu²⁺) ou des flavonoïdes (Circu et Aw, 2012). Le glutathion et le SOD sont des antioxydants intracellulaires, largement répandus dans l'intestin grêle, et leur abondance est plus élevée au cours du développement intestinal (Tang *et al.*, 2019).

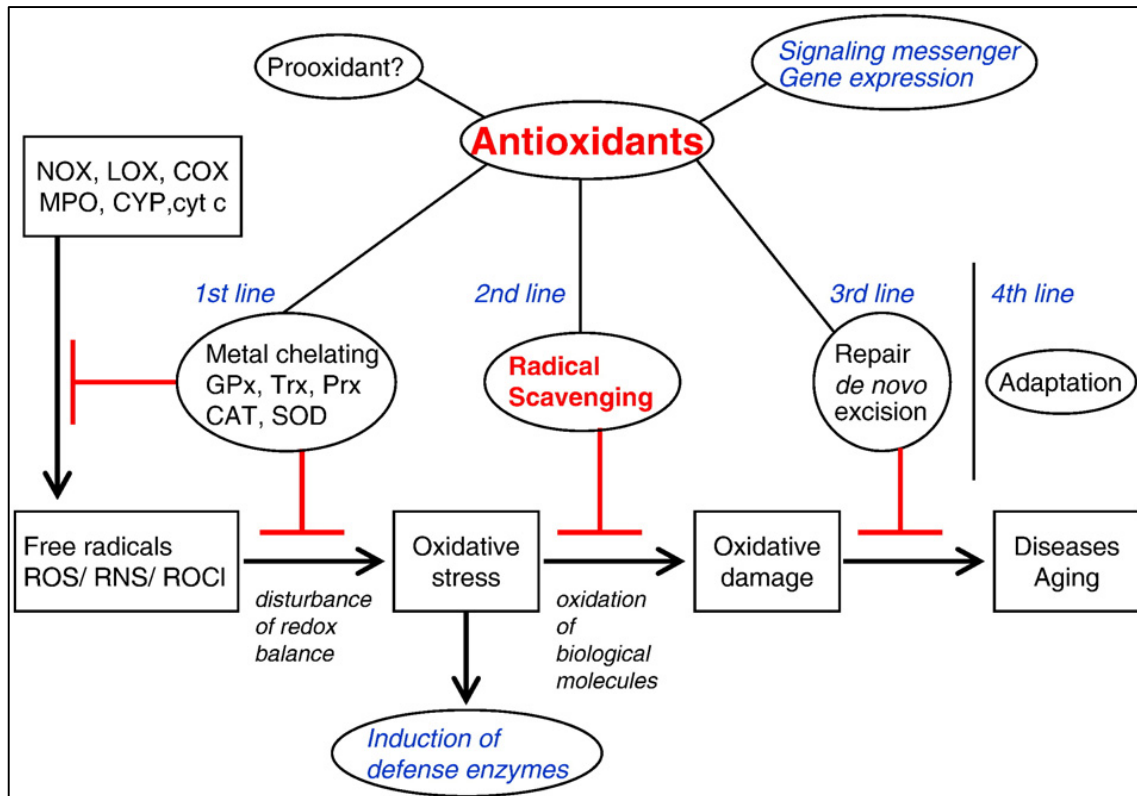


Figure 31 : Réseau de défense in vivo contre le stress oxydatif. Divers antioxydants avec des fonctions différentes jouent leur rôle dans le réseau de défense, les antioxydants des radicaux libres étant l'un des acteurs (Niki, 2010).

5.1. Les antioxydants endogènes enzymatiques

La concentration intracellulaire des ERO dépend de la production et/ou de l'élimination par le système antioxydant. Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la 1ère ligne de défense. Les cellules contiennent un grand nombre d'antioxydants pour prévenir ou réparer les dommages causés par les ERO, ainsi que pour réguler les voies de signalisation sensibles aux redox (Weydert et Cullen, 2010).

Trois des principales enzymes antioxydantes contenues dans les cellules de mammifères qui sont jugées nécessaires à la vie dans toutes les cellules métabolisantes de l'oxygène (McCord *et al.*, 1971) sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et une peroxydase propre au substrat, la glutathion peroxydase (GPx) (Figure 32).

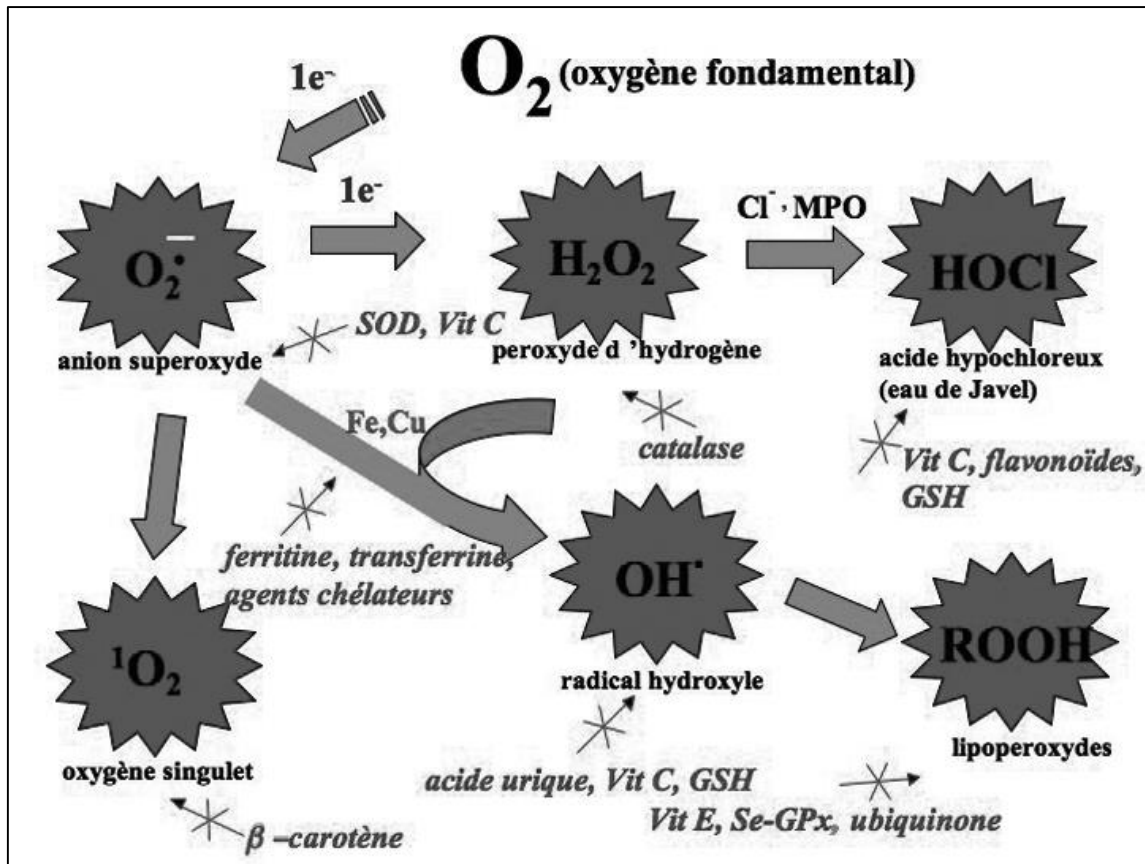
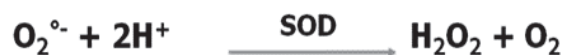


Figure 32 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng *et al.*, 2007).

5.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

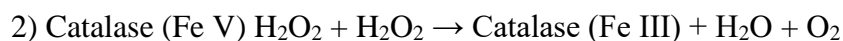
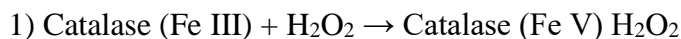
Ces métalloprotéines ubiquitaires, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivante (Bensakhria A., 2018) :



Chez l'homme, on décrit 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD₁ cytosolique, la Mn-SOD₂ mitochondriale et la Cu/Zn-SOD₃, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. La SOD₃ est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le système antioxydant majeur de la paroi artérielle : son expression et sa sécrétion sont augmentées par les facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II) et diminuées par l'homocystéine.

5.1.2. Catalase (CAT)

La catalase convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène par dismutation qui se fait en deux étapes (Bensakhria, 2018) :



L'activité de la catalase est largement localisée dans des organites subcellulaires connus sous le nom de peroxydes.

L'administration ciblée de catalase au foie par galactosylation supprime la métastase hépatique et diminue l'activité de la métalloprotéinase matricielle (MPM), tandis qu'une diminution de la catalase est corrélée avec l'émergence du phénotype malin à l'origine cancérogène dans les kératinocytes (Nishikawa *et al.*, 2002) de souris. La catalase atténue également l'expression basale et MnSOD-dépendante des MPM et du dépôt de collagène (Nelson *et al.*, 2003).

5.1.3. Les glutathion peroxydases (GPxs)

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH) (Haleng *et al.*, 2007).

GPx réduit non seulement H₂O₂, mais aussi les hydroperoxydes lipidiques. Dans l'intestin il y a quatre isoformes de GPx (Chu *et al.*, 2004). GPx1 est présent dans tous les types de cellules de l'intestin, GPx2 est principalement exprimé dans les cellules épithéliales, GPx3 est sécrété dans le plasma, et GPx4 est exprimé dans les cellules épithéliales et la *lamina propria* (Kudya *et al.*, 2015). GPx2 est dans la première ligne de défense contre les ROS dérivés de l'inflammation associée aux bactéries pathogènes et non pathogènes de l'intestin (Chu *et al.*, 2004).

5.2. Les antioxydants endogènes non-enzymatiques

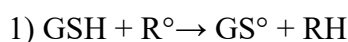
Les principaux antioxydants non enzymatiques dans l'intestin sont le GSH et le système de thioredoxine.

5.2.1. Glutathion (GSH)

Le GSH est un tripeptide formé par le L-glutamate, le L-glycine et la L-cystéine. Il est présent en concentrations millimolaires dans l'épithélium intestinal, un niveau similaire à d'autres types de cellules (2–10 mM). Le GSH intracellulaire existe sous forme de thiol réduit biologiquement actif, et son oxydation en GSSG est souvent associée au stress oxydatif. L'homéostasie redox de GSH muqueux est maintenue par synthèse *de novo*, régénération de GSSG et absorption de GSH (Circu et Aw, 2012).

Les enzymes cytosoliques γ -glutamylcystéine ligase et GSH synthétase sont impliquées dans la synthèse de novo GSH, tandis que la régénération de GSH à partir de GSSG est catalysée par NADPH-dépendante GSSG réductase (De Barboza *et al.*, 2017).

Le glutathion est le cofacteur de nombreuses enzymes antioxydantes (GPx) il permet la réduction des protéines oxydées par conjugaison aux espèces électrophiles selon les réactions suivantes (Bensakhria, 2018) :



Le glutathion permet l'élimination des espèces OH° , 1O_2 par interaction directe. L'interaction GSH - 4-HNE conduit à la formation d'adduits non toxiques (Bensakhria, 2018).

5.2.2. Thioridoxine peroxydases (Trx)

Le système de thioredoxine est composé de thioredoxine (Trx) et de thioredoxine réductases (TrxR). Il a un grand nombre de fonctions dans la synthèse de l'ADN, la défense contre le stress oxydatif et l'apoptose ou la signalisation redox. Il est situé dans le cytoplasme, les membranes, les mitochondries et dans l'espace extracellulaire. Les trxs oxydés sont réactivés par les TrxRs grâce à la puissance réductrice du NADPH. L'expression du trx est très élevée dans l'intestin et joue un rôle important dans la réponse immunitaire intestinale. Il a été démontré que le Trx participe à la régulation redox de la β -defensine 1 humaine, une protéine ayant une activité antimicrobienne. La colite ulcéreuse impliquant Trx comme marqueur candidat a été révélée par des profils protéomiques de biopsies du côlon (De Barboza *et al.*, 2017).

Les protéines de thioredoxine intestinale (Trx) fonctionnent dans la défense antioxydante et la régulation redox par la réduction du disulfure de cystéine dans le motif Cys-XX-Cys (CGPC) dans les protéines. Trx1 et Trx2 sont des isoformes régulés indépendamment qui sont spécifiques au cytosol/noyau et aux mitochondries (Circu et Aw, 2012).

6. La mise en évidence du stress oxydant

Le stress oxydant implique un ensemble complexe de paramètres et ne peut donc être mis en évidence par une seule méthode, aussi élaborée soit-elle (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Le tableau 05 reprend une liste des différents marqueurs qui se réalisent en routine clinique, moyennant un traitement pré-analytique rigoureux de l'échantillon (centrifugation immédiate, congélation à -20°C ou moins).

Ces marqueurs se répartissent selon quatre axes :

- 1) la détermination des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques ;
- 2) le dosage des oligo-éléments ;
- 3) la mesure des dommages oxydatifs au niveau des lipides, de l'ADN et des protéines ;
- 4) l'identification de sources génératrices de stress oxydant (inflammation, hyperglycémie, hyperhomocystéinémie).

Tableau 05 : Valeurs de référence des marqueurs sanguins du stress oxydant établies par le CHU de Liège, Belgique (Haleng *et al.*, 2007).

Marqueurs	Mode d'action et intérêt du dosage	Valeurs de références CHU-Liège
<i>Antioxydants</i>		
Vitamine C	Piégeur des radicaux libres Marqueur de la consommation de fruits valeur plasmatique basse associée avec l'apparition de diverses pathologies	H : 8,6 à 18,83 µg / ml F : 6,21 à 15,18 µg / ml
Alpha- tocophérol	inhibiteur de la peroxydation lipidique action de synergie avec la vitamine C (rapport idéal de concentration)	8 à 15 mg / litre
γ- tocophérol	valeur plasmatique basse plus prédictive que l'α - tocophérol dans la survenue de pathologies cardiovasculaires et de cancer de la prostate	0,28 à 2,42 mg / litre
Vitamine A	piégeur de radicaux libres implication dans la vision	1200 à 3700 UI / litre
β- carotène	marqueur de la consommation de légumes piégeur de l'oxygène singulet (-- >photoprotecteur) inhibition à forte concentration de mécanismes physiologiques de défense	0,05 à 0,68 mg / litre
Glutathion réduit Glutathion oxydé Rapport GSH/GSSG	marqueur de la présence d'un stress oxydant action de synergie avec la vitamine C et l'α - tocophérol	717 à 1110 µMol/litre 1,17 à 5,32 µMol/litre 156 à 705
Capacité antioxydante totale (test ORAC)	test global de screening (ne peut être interprété seul) (plasma non déprotéinisé)	11 000 - 16 000 µM Equiv Trolox
Ubiquinone	inhibiteur de la peroxydation lipidique implication dans la chaîne respiratoire mitochondriale	0,3 à 1,39 mg / litre
Acide urique	antioxydant possédant la plus forte réactivité avec les radicaux libres reflet de la présence de phénomènes d'ischémie - reperfusion	H < 70 mg / litre F < 60 mg / litre
Vitamines B6, B9 et B12	régulatrices de la concentration plasmatique en homocystéine implication dans la synthèse de l'ubiquinone	B9 : 2,2 à 17,5 ng / ml B12 > 200 pg / ml
Superoxyde dismutase (SOD)	élimination de l'anion superoxyde	785 à 1570 UI / g Hb
Glutathion peroxydase (GPx)	élimination du peroxyde d'hydrogène et de peroxydes lipidiques reflet d'une adaptation au stress oxydant facteur de risque cardiovasculaire	H : 20-56 UI / g Hb F : 26-58 UI / g Hb
Sélénium	cofacteur des différentes GPx rôle dans l'immunité	94-130 µg / litre
Cuivre	cofacteur de la SOD facteur prooxydant à forte concentration	F : 0,8-1,55 mg / litre H : 0,7-1,40

Tableau 05 (Suite) : Valeurs de référence des marqueurs sanguins du stress oxydant établies par le CHU de Liège, Belgique. (Haleng *et al.*, 2007).

Marqueurs	Mode d'action et intérêt du dosage	Valeurs de références CHU-Liège
Zinc	cofacteur de la SOD inhibe les réactions d'oxydation induites par le cuivre-rôle dans l'immunité	0,7-1,20 mg / litre
Rapport Cu/Zn	marqueur de la présence d'un stress oxydant corrélation positive avec le taux plasmatique de peroxydes lipidiques	1 - 1,17
Marqueurs d'oxydation		
Peroxydes lipidiques	marqueur des dommages oxydatifs au niveau des lipides implication dans le développement de l'athérosclérose	10-400 µMol / litre
LDL oxydées	facteur de risque cardiovasculaire (LDL petites et denses plus susceptibles à l'oxydation)	< 500 ng / ml
Anticorps contre les LDL oxydées	réponse de l'organisme à la production de LDL oxydées facteur de risque cardiovasculaire	200-600 UI / litre
Isoprostanes	marqueur spécifique de la peroxydation lipidique	en développement
8 hydroxy-déoxyguanosine	marqueur d'oxydation de l'ADN facteur de risque de développement de cancer	0-16 µg / litre 0-20 µg / g créatinine
Protéasone	système de régulation des protéines oxydées sensible à la production des radicaux libres	
Sources d'oxydation		
Fer libre	fer toxique conduisant à une augmentation accrue de radicaux libres	
Fer sérique	surcharge en fer	H 8-33, F 6-31 µMol/litre
Ferritine		H 30-400, F 15-150 ng/ml
Coefficient de saturation en fer de la transferrine		H 0,2-0,4 , F 0,2-0,5
Homocystéine	facteur de risque cardiovasculaire indépendant du cholestérol contribue à l'oxydation des LDL	< 60 ans : 5-15 µMol / litre > 60 ans : 5-20 µMol / litre
Myéloperoxydase	marqueur de l'inflammation (source de production de radicaux libres) facteur de risque cardiovasculaire	10 à 75 ng / ml
Glucose	amplifie la peroxydation lipidique implication dans la glycation des protéines	0,6-1,1 g / litre

Etude Expérimentale

Matériels et Méthodes

1. Les Objectifs de la thèse

Pour répondre à la question, si l'administration de la caféine modifie-t-elle à long terme le développement des marqueurs biologiques qui contrôlent l'homéostasie intestinale chez les rats nouveau-nés ?

Et pour atteindre l'objectif principal de cette étude, nous avons examiné, les conséquences de l'administration néonatale de la caféine similaire à celui utilisé en clinique (12 mg/kg/jour) de la naissance au 60^{ème} jour de vie, sur la fonction gastro-intestinale. En visant l'homéostasie intestinale qui regroupe les interactions complexes entre le microbiote intestinal, la structure et la fonction efficace de la barrière gastro-intestinale, et le système immunitaire intestinal. Ces composants sont liés entre eux par plusieurs mécanismes et voies complexes, cependant, pouvoir identifier certains composants clés de la fonctionnalité gastro-intestinale offre la possibilité d'évaluer des biomarqueurs potentiels qui peuvent nous permettre de mesurer la fonctionnalité du système gastro-intestinal.

Afin d'atteindre cet objectif, et à l'aide d'un modèle animal, sur des rats nouveau-nés recevant une dose quotidienne de la substance thérapeutique (citrates de caféine) durant une période définie nous avons évalué :

- 1) La composition du microbiote intestinal.
- 2) La perméabilité intestinale par le dosage de la D-lactate dans le plasma et les homogénats intestinaux, et par l'évaluation de la translocation bactérienne vers les organes distincts.
- 3) L'analyse de différents marqueurs du stress oxydatif dans les intestins.
- 4) L'analyse de l'expression génétique des protéines des jonctions serrées impliquées dans l'intégrité de la barrière intestinale.

Ce travail a été réalisé entre le laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (LBGMSS) à l'université de Mustapha Stambouli (Mascara-Algérie) et le laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire à l'université de Yarmouk (Irbid-Jordanie). Sur une période allant de Novembre 2017 à Avril 2022.

2. Matériels

2.1. Produit utilisé : Citrate de Caféine

Pour une bonne assimilation, la caféine a été administrée sous forme de substance thérapeutique pharmacologique « **Citrate de caféine** » (Société Sigma, France, 99% de pureté) (Figure 33).



Figure 33 : Le citrate de caféine.

3. Les animaux

De nos jours, l'expérimentation animale est soumise à une réglementation très stricte. Elle est en effet porteuse de nombreuses questions éthiques à la fois de la part du public et des expérimentateurs. Malgré le développement constant des "méthodes alternatives", le recours à l'animal reste indispensable dans le domaine scientifique. L'expérimentation animale pratiquée dans les laboratoires de recherches doit être réalisée dans des conditions respectant la réglementation et donc se conformer aux textes réglementaires en vigueur. L'évaluation éthique doit permettre de comprendre la nécessité scientifique du recours aux animaux vivants, ainsi que la raison du choix de l'espèce.

Dans cette étude, des rats de race Wistar ont été utilisés. Le choix de ce modèle animal est établi vu les similitudes physiologiques avec l'espèce humaine, ainsi que pour des raisons pratiques d'exploitation : sa petite taille, sa nature relativement docile, sa faible longévité (2 – 3 ans), et sa courte période de gestation.

Les expériences sur les animaux ont été menées conformément aux directives de l'Organisation de coopération économique et du développement (OCDE) (protocole n°408, 25 juin 2018), et approuvées par le comité d'éthique pour la recherche animale de l'Université Mustapha Stambouli de Mascara.

3.1. Conditions d'élevage

Les rats ont été placés dans un environnement protégé à l'abri des bruits. C'est une pièce à température ambiante (18-20°C) du moment qu'elle fait partie des facteurs environnementaux critiques à maîtriser car ce paramètre possède un effet direct sur le métabolisme des animaux.

Les rats sont nourris d'un régime complet standard sous forme de granules ("EL AALF"), composé de céréales, tourteaux de soja : issues de céréales, huile de soja, phosphate monocalcique, carbonate de calcium, lysine, méthionine, choline, plus un complexe minéralovitaminiques avec les pourcentages suivants : Glucides 55%, protéines brutes 18%, matière grasse brute 3,4%, cellulose brute 3%, cendre brute 4,9%, humidité 14%, vitamine 1,7%. L'eau et l'aliment leur sont fournis *ad libitum*.

3.2. Accouplement

Les rats sont très faciles à reproduire. Ils peuvent atteindre la maturité sexuelle à l'âge de 5 semaines. Ils se reproduisent durant toute l'année, bien que des températures très chaudes ou froides réduisent l'élevage. Les femelles ont un cycle œstral, tous les 4 à 5 jours.

Les rats de race Wistar, de sexe opposé, d'un poids compris entre 175 et 185g ont été accouplés. En général on met un male avec 2 à 4 femelles. Placés dans la même cage avec une grille adaptée pour nourriture tout en surveillant l'état gestationnel des femelles pour les séparer ensuite de leurs congénères en vue d'éviter toute contrainte ou stress jusqu'à la mise bas.

La gestation peut varier de 21 à 23 jours. Durant la gestation, l'abdomen de la femelle commence à s'élargir. Cet élargissement devient visible au 13ème jour. Au jour 14, le développement mammaire et l'agrandissement du mamelon peuvent être observés.

4. Protocole expérimentale

4.1. Mise bas et randomisation des groupe

Les femelles augmentent l'activité de nidation environ 5 jours avant le début de la mise bas et continuent pendant la lactation. La taille de portée est de 8 à 12 ratons en moyenne.

A la naissance, les nouveau-nés sont répartis en trois (03) séries (S_1 , S_2 et S_3) sur une dynamique de croissance de 60 jours. Chaque série est constituée de deux groupes au nombre de 10 : un contrôle (GC) qui reçoit un placebo (eau distillée stérile), l'autre administré avec le citrate de caféine (GT) à raison de (12mg/kg/j) durant l'expérimentation, tous les ratons sont allaités par leurs mères (Figure 35) :

- 1^{ère}Série (ratons âgés de 15j), le sacrifice des ratons après quinze jours (GC= 10, GT= 10)
- 2^{ème}Série (ratons âgés de 30j), le sacrifice des ratons après trente jours (GC= 10, GT=10)
- 3^{ème}Série (ratons âgés de 60j), le sacrifice des ratons après soixante jours (GC= 10, GT=10)

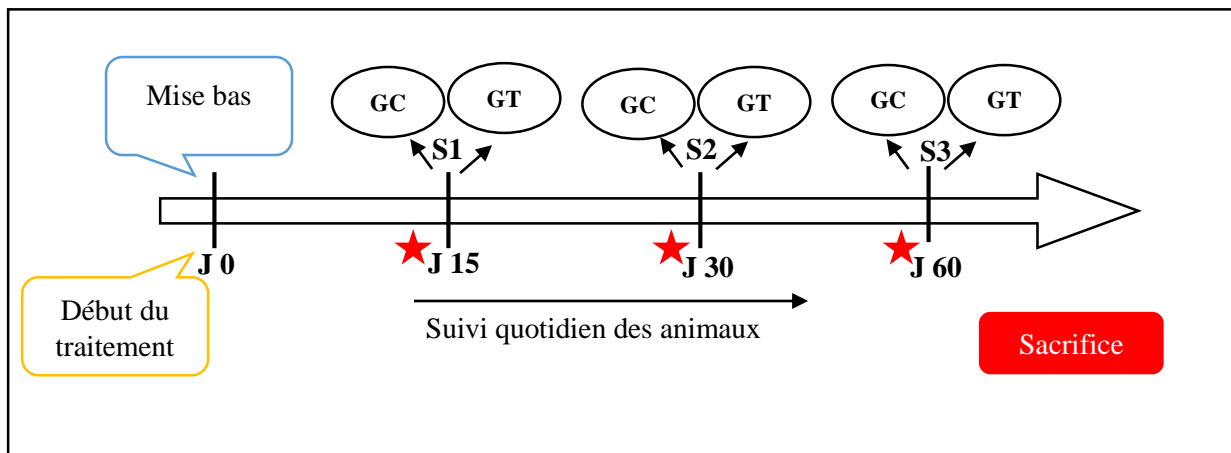


Figure 34 : Randomisation des groupes et début du traitement.

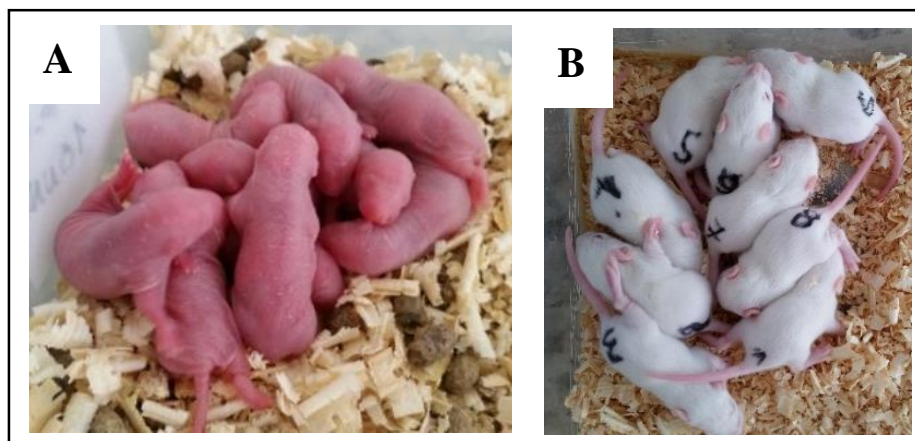


Figure 35 : Mise bas des ratons (A) et randomisation des groupes (B).

4.2. Traitement des animaux par gavage

Nous avons commencé l'administration orale quotidienne du citrate de caféine à partir du premier jour de naissance pour tous les animaux.

Chaque matin (entre 8h00 et 9h00), la mère était séparée de ces petits et déplacée dans une autre cage, afin d'éviter toute perturbation ou stress pour les nouveau-nés. Les rats néonataux ont été pondérés (quotidiennement) afin de déterminer la taille appropriée de l'aiguille de gavage et le volume posologique.

La dose de charge recommandée de citrate de caféine est de 20 à 25 mg/kg/jour (l'équivalent de 10 à 12,5 mg/kg/jour de caféine base), suivie d'une dose d'entretien de 5 à 10 mg/kg/jour (l'équivalent de 2,5 à 5 mg/kg/jour de caféine base).

Pour réaliser le gavage, des aiguilles stériles en plastique souple ont été utilisées pour éviter les lésions de l'œsophage des nouveau-nés. Le volume de caféine (GT) et du placebo (GC) administré était de 1mL/kg/jour (équivalent à 0,08mL pour un rat nouveau-né de 8g).

Pour la procédure, le raton était retenu délicatement ; la tête de l'animal a été tenue en place. L'aiguille de gavage a été placée dans la bouche et légèrement avancée le long du palais supérieur jusqu'à ce que l'œsophage soit atteint. Une fois le bon emplacement vérifié, la caféine a été administrée lentement par une seringue fixée à l'extrémité de l'aiguille. Après le dosage, l'aiguille a été délicatement retirée et l'animal a été remis dans la cage (Figure 36). A la fin du traitement, la mère était placée de nouveau dans la cage avec ses bébés.



Figure 36 : Administration du Citrate de Caféine aux rats par gavage.

4.3. Evolution pondérale et suivi des animaux

Les animaux ont été suivis quotidiennement durant la durée d'expérimentation (S1, S2 et S3). Le poids corporel de tous les animaux a été pris chaque jour (Figure 37).

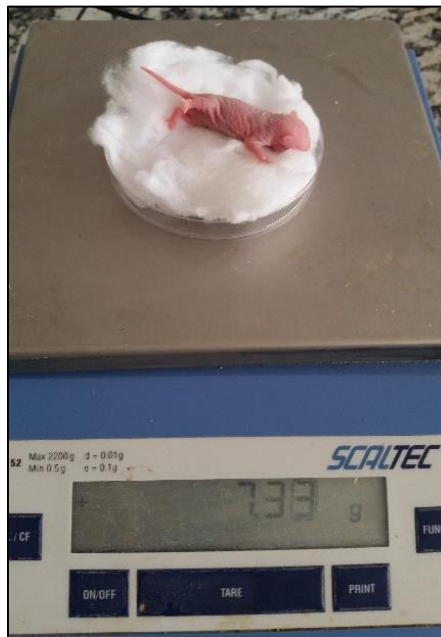


Figure 37 : Peser quotidienne des rats.

Les rats néonataux de la même mère ont été considérés comme un groupe. Parce que les rats nouveau-nés dépendent des soins de leur mère pendant les trois premières semaines de leur vie postnatale. De plus, séparer trop tôt les nouveau-nés de leur mère a des effets à long terme,

surtout sur leur comportement et leur développement. De plus, pour éviter le cannibalisme, nous avons choisi de garder les nouveau-nés avec leur vraie mère.

Les critères d'inclusion :

- Animaux venant de la même portée.
- Animaux avec un poids corporel équivalent à tout le groupe.

Les critères d'exclusion :

- Animaux venant d'une portée différente.
- Animaux présentant des malformations ou comportement anormaux (réservés, faible poids par rapport à la portée).

4.4. Sacrifice et prélèvement du sang et différents organes

Le jour du sacrifice, les rats sont placés dans un dessiccateur et anesthésiés par un coton imbibé de chloroforme pendant quelques minutes (Figure 38.A).

Dans des conditions d'asepsie totale, une simple laparotomie a été réalisée, qui consiste à une ouverture ventrale et la dissociation des éléments anatomiques (Figure 38.B).

Les prélèvements sanguins ont été réalisés à partir de l'aorte abdominale. L'échantillon du sang a été ensuite, récupéré dans des tubes à hémolyse héparines et centrifugé à 6000 tour/mn pendant 10min. Le sérum obtenu a été conservé à -20 °C jusqu'à la détermination des paramètres biochimiques.

Dans les mêmes conditions, les organes internes tels que : le thymus, les MLNs, les poumons, le foie, la rate, les reins et des fragments d'intestins de 2 à 3 cm ont été prélevés au niveau des deux segments l'iléon et le colon (Figure 38.C).

Chaque échantillon (organe ou intestin) est immédiatement transféré dans une boîte de Petrie stérile numérotée et renseignée pour être traité dans les plus brefs délais.

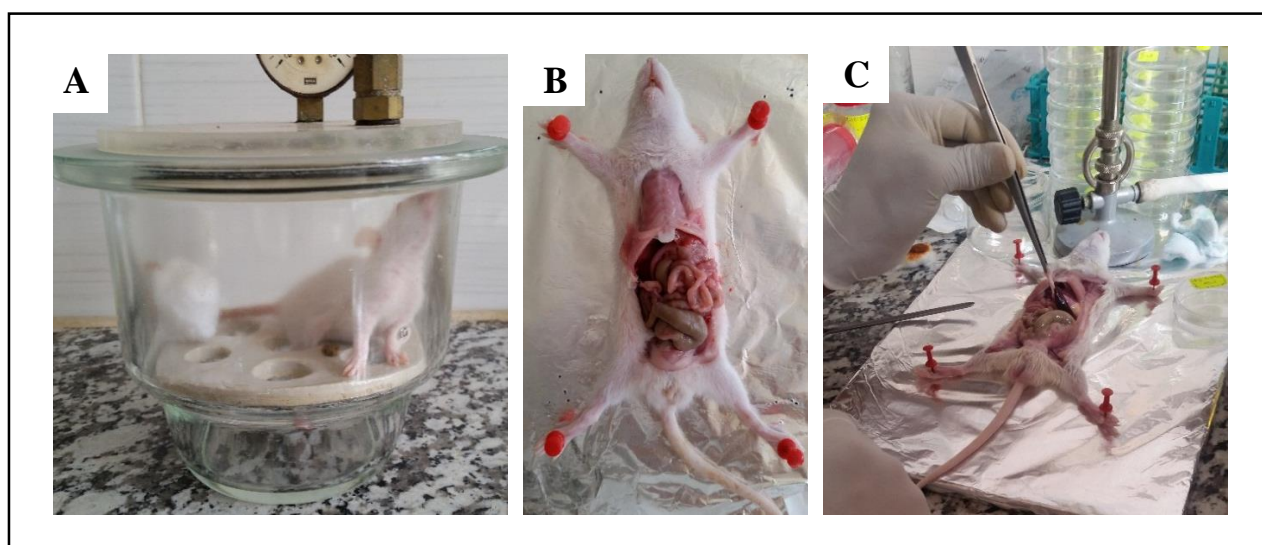


Figure 38 : Laparotomie (B) d'un raton âgé de 15 jours après l'anesthésie par le chloroforme (A) et prélèvement aseptique du sang et de différents organes (C).

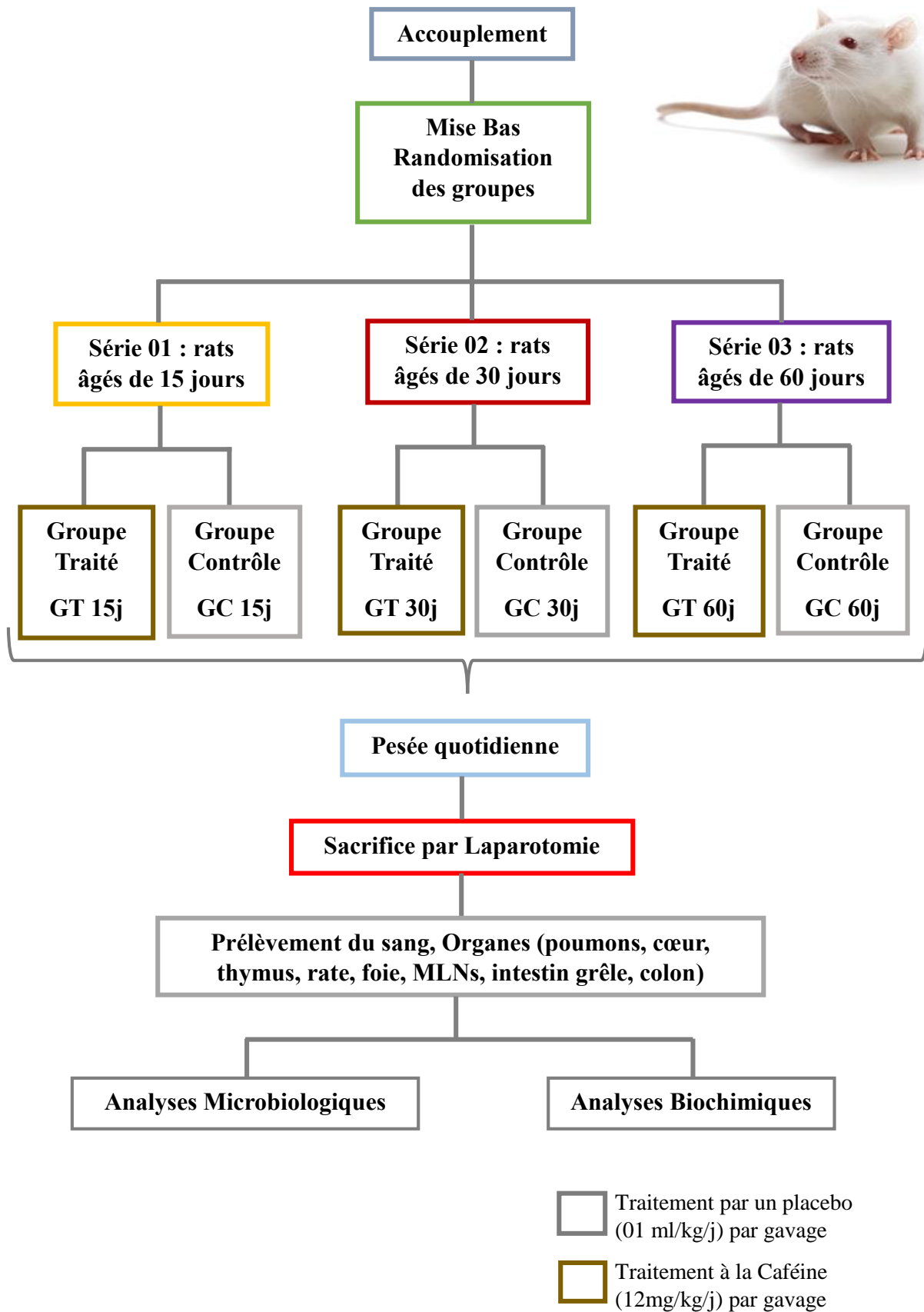


Figure 39 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

5. Analyses microbiologiques

Dans cette partie l'analyse microbiologique a concerné :

- 1) Suivi de l'établissement du microbiote intestinal dans l'iléon et le côlon à partir de l'isolement des : les aérobies totaux, les entérobactéries, les anaérobies stricts et les lactobacilles (Figure 40).
- 2) L'évaluation de la translocation bactérienne vers différents organes : MLNs, le foie, la rate et le thymus (Figure 40).

5.1. Traitement des échantillons intestinaux (iléon et colon)

5.1.1. Préparation des homogénats des fragments intestinaux

Les échantillons de l'iléon et du colon (1g) ont été disséqués, coupés longitudinalement, grattés à l'aide d'un scalpel, broyés et homogénéisés dans une solution Ringer stérile (Annexe).

Ensuite, une série de dilutions a été réalisée pour obtenir des concentrations de 10^{-3} , 10^{-5} et 10^{-7} suivant le segment, la charge microbienne et la période de croissance des rats (T_{15j}, T_{30j} ou T_{60j}).

5.1.2. Isolement et identification du microbiote intestinal et évaluation de la translocation bactérienne (TB)

Un ensemencement de 0.1 mL de chaque dilution a été réalisé sur les boîtes de milieu de culture appropriées. Gélose Columbia pour le dénombrement des aérobies totaux ; gélose EMB pour le dénombrement des entérobactéries (*Escherichia coli*) (Figure 40).

Pour le dénombrement des anaérobies stricts (Bacteroides), le milieu Schaedler a été utilisé (Figure 41). Et enfin la gélose MRS a servi pour dénombrer les lactobacilles (Figure 40).

Pour évaluer le degré de translocation bactérienne, on a prélevé les MLN (de l'iléon), le foie, la rate et le thymus. Les échantillons de tissus ont été rincés dans une solution saline stérile pour éliminer les traces de sang (Figure 42).

Pour les cultures bactériologiques, 0,1 g de chaque échantillon a été immédiatement homogénéisé dans 0,9 mL de solution Ringer stérile. 0,1 mL aliquote de chaque échantillon a été mis en culture sur l'agar Columbia, l'agar Eosin Methylene Blue (agar EMB) et l'agar

Schaedler (Lei *et al.*, 2018). La translocation bactérienne a été jugée positive lorsque le nombre était supérieur à 100 colonies formant des unités/g de tissu (Li *et al.*, 2010) (Figure 42).

Les boîtes de gélose ont été incubées pendant 24 à 48 h à 37 °C pour la recherche des germes aéro-anaérobies et pendant 72 h à 37 °C dans des jarres d'anaérobiose pour la recherche des germes anaérobies.

Les colonies ont été identifiées par des méthodes microbiologiques standards, y compris les caractéristiques morphologiques des colonies et des cellules (la coloration de Gram), les tests d'identification biochimique (Figure 41) utilisant les systèmes API 20E (BioMérieux, Lyon, France) et enfin le test de sensibilité aux antibiotiques (Annexes).

5.2. Dénombrement des populations bactériennes

Les dénombrements bactériens ont été exprimés sous forme de logarithmes du nombre d'unités formant colonie (UFC) par gramme de tissu (Log UFC/g). Selon la formule suivante :

$$\text{Log UFC/g d'échantillon} = \frac{N}{d \times V} \quad (\text{Béraud, 2001})$$

- **N** : le nombre de colonies ;
- **d** : l'inverse de la première dilution ;
- **V** : le volumeensemencé.

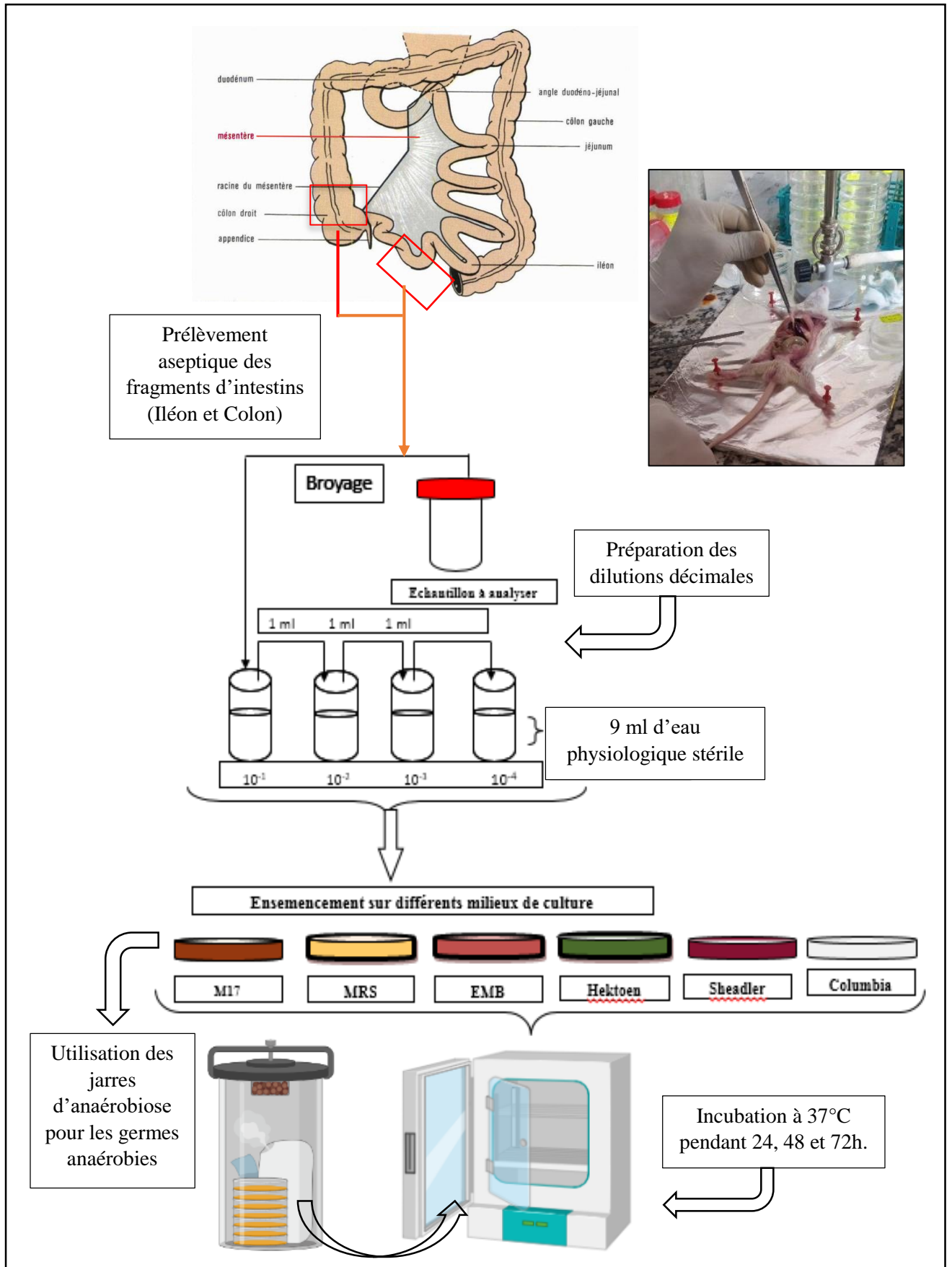


Figure 40 : Schéma représentatif de l'analyse microbiologique pour étudier la flore intestinale chez les rats témoins et traités avec de la caféine.

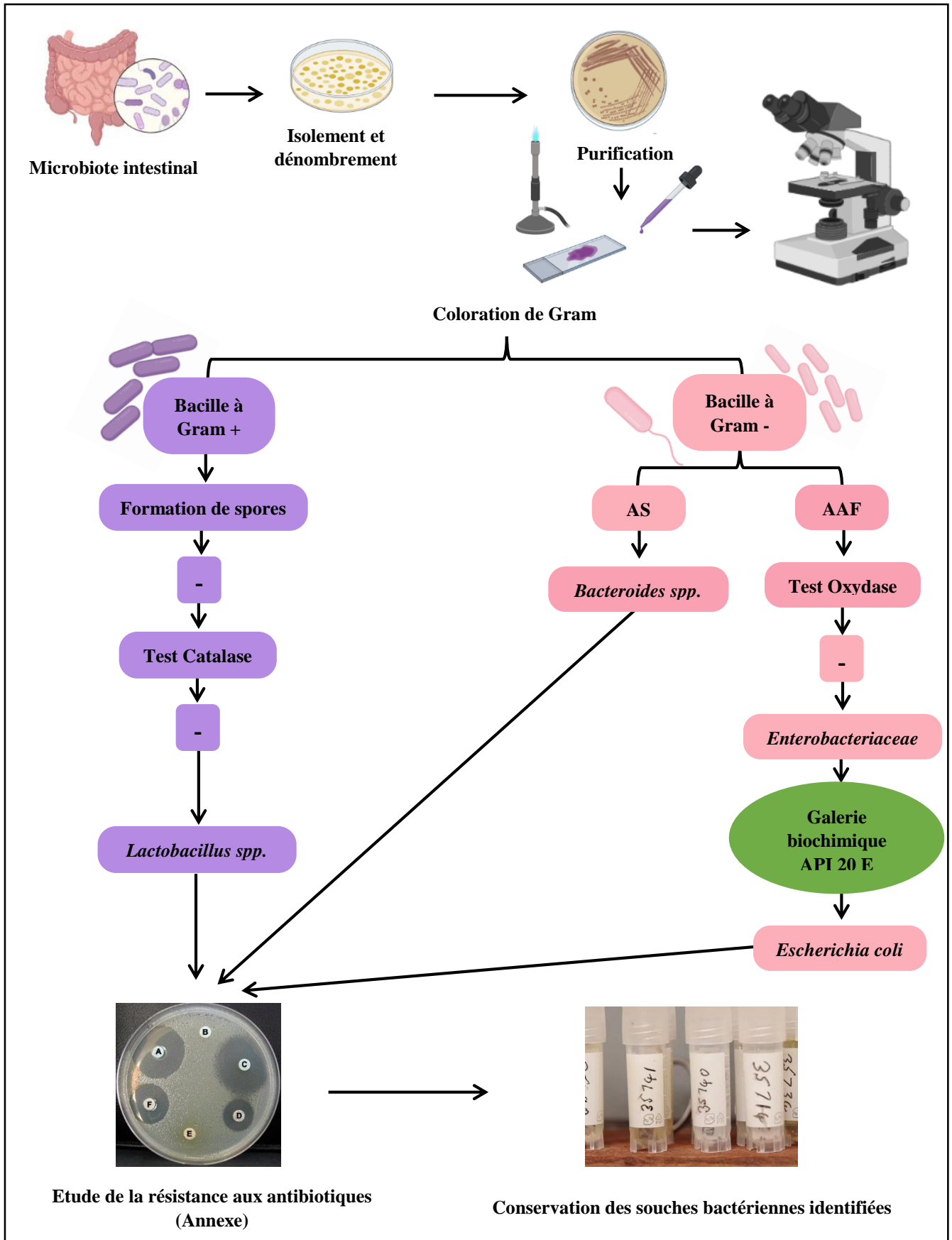


Figure 41 : Schéma représentatif des étapes de l'identification des bactéries isolées.

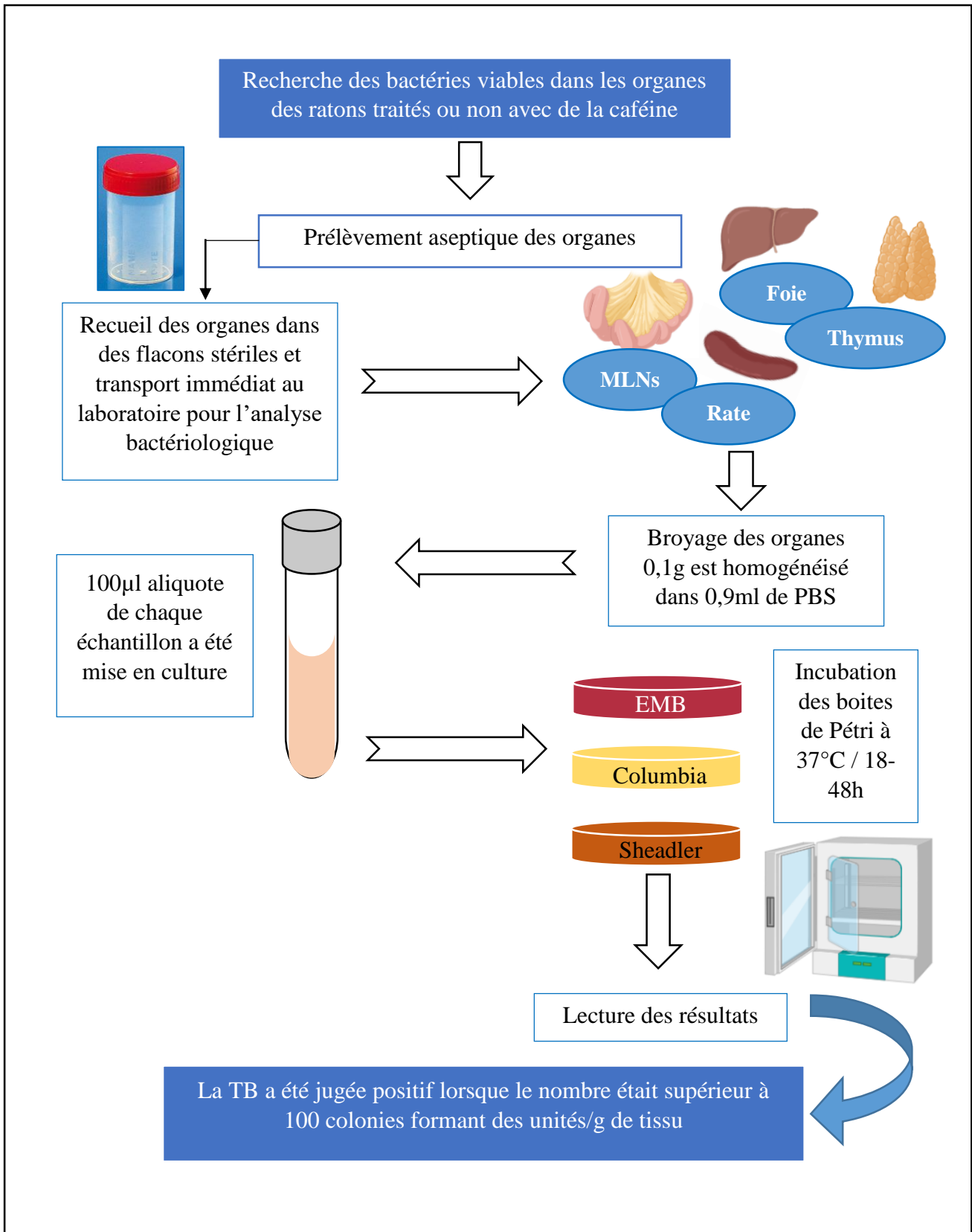


Figure 42 : Schéma représentatif de l'analyse microbiologique pour détecter la translocation bactérienne chez les rats témoins et traités avec de la caféine.

6. Analyses biochimiques

6.1. Test de motilité gastro-intestinal avec du lait BaSO₄ (BSM)

Le modèle BSM a été réalisé selon la méthode rapportée par Solanki et Nagori (2012). 30 rats à jeun pendant une nuit ont été répartis au hasard en 06 groupes égaux (n = 05). 03 groupes témoin 15j, 30j et 60j recevant de l'eau distillée par rat par gavage. Et les 03 autres groupes traités par la caféine. Le jour du sacrifice, tous les rats ont été administrés avec 2 ml de solution à 10% de BaSO₄.

Après 30 minutes, les rats ont été anesthésiés et sacrifiés. La distance parcourue par le lait BaSO₄ a été mesurée et exprimée en pourcentage de la longueur totale de l'intestin grêle (du pyllore à la jonction iléo-cæcale).

6.2. Dosages de différents paramètres biochimiques sériques

Les analyses sanguines ont été réalisées au niveau des laboratoires des analyses médicales (Annexe).

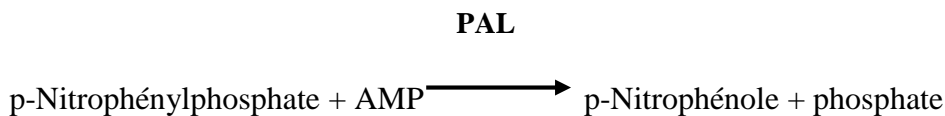
Après chaque période d'expérimentation, le sang prélevé dans la veine aortique des rats témoins et traités à la caféine était recueilli dans des tubes à hémolyse, et transporté directement au laboratoire pour être analysés (Figure 48).

Les paramètres biochimiques tel : Cholestérol total sérique (TC), cholestérol des lipoprotéines de basse densité (LDL-C), cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL-C), les concentrations de triacylglycérol (TG), d'aspartate transaminase (AST), d'alanine transaminase (ALT), Les taux d'urée, de créatinine (CREA), de bilirubine (BL), de lactate déshydrogénase (LDH) et de phosphatase alcaline (PAL) ont été déterminés avec des essais colorimétriques à l'aide d'un l'auto-analyseur Respons 920-DiaSys Diagnostic Systems GmbH (65558 Holzheim, Allemagne). En utilisant des kits commercialisés (Biolab, France ; Diasys, Allemagne).

6.3. Dosage de la Phosphatase alcaline (PAL)

Les phosphatases alcalines sont des enzymes qui sont présentes dans presque tous les tissus de l'organisme, en étant particulièrement élevées dans les os, le foie, le placenta, les intestins et les reins.

Principe : La phosphatase alcaline (PAL) catalyse le transfert du groupe phosphate depuis le p-nitrophénylphosphate (pNPP) vers le 2-amino-méthyle-1-propanol en libérant du p-nitrophénol et du phosphate, selon la réaction suivante :



La vitesse de formation du p-Nitrophénol, déterminé de manière photométrique est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé (Wenger *et al.*, 1984 ; Rosalki *et al.*, 1993) (SPINREACT).

Technique : 20 µL de l'échantillon a été mélangé avec 1,2 mL du réactif de travail (p-Nitrophénylphosphate) et incubé pendant 1 minute à une température ambiante. L'absorbance est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm. La lecture est effectuée pendant 3 minutes. La concentration est exprimée en unités par litre (U/L) (SPINREACT).

6.4. Dosage de la Lactate déshydrogénase tissulaire (LDH)

La LDH est une enzyme intracellulaire ubiquitaire contenue dans la plupart des tissus. Elle catalyse la transformation du lactate en pyruvate et inversement en présence de NAD⁺/NADH (Figure 43).

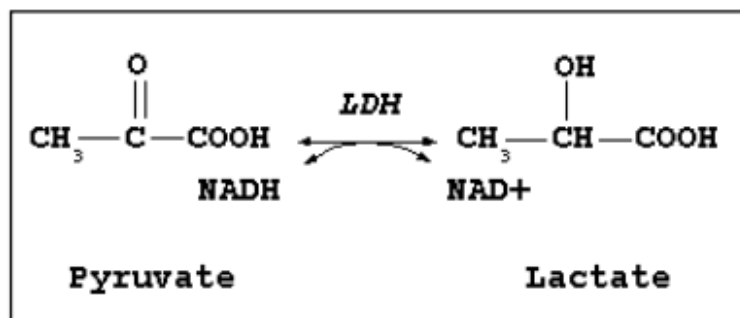


Figure 43 : Action catalytique de l'enzyme LDH transformant le pyruvate en lactate.

La LDH étant une enzyme intracellulaire, elle est régulée dans la circulation sanguine en cas de lyse cellulaire ou d'altération tissulaire.

Principe : Le lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction du pyruvate au moyen de la NADH. La vitesse de réduction de la concentration en NADH dans la méthode de détermination par photométrie est proportionnelle à la concentration catalytique de LDH dans l'échantillon testé (Pesce, 1984) (SPINREACT).

Technique : 50 µL de l'échantillon est mélangé à 3 mL du réactif de travail (NADH). Le mélange est incubé pendant 1 minute. L'absorbance est mesurée pendant 3 minutes à une longueur d'onde de 340 nm. La concentration est exprimée en unité par litre (U/L) (SPINREACT).

6.5. Dosage des protéines totales au niveau tissulaire

La teneur en protéines des homogénats a été quantifiée selon la méthode colorimétrique de Bradford (1976) en utilisant le Bleu de Coomassie G250 (BBC) comme réactif et le sérum bovin (BSA) comme étalon (Figure 44). La réaction entre le BBC et les groupements amines (-NH₂) des protéines forme un complexe de couleur bleue. L'apparition de cette couleur représente le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines qui est mesurée au spectrophotomètre (Bradford, 1976).

Le mélange réactif était composé de 5 ml de bleu brillant de Coomassie et de 0.1 ml d'homogénat. Cinq minutes plus tard, l'absorbance a été mesurée à 595 nm.

6.6. Dosage des sucres totaux au niveau tissulaire

Le dosage des sucres a été effectué par la méthode de Dubois *et al.* Cette méthode utilise le phénol comme réactif (phénol 5%, d'acide sulfurique 96%) et une solution mère de glucose (1g/l) comme standard (Dubois *et al.*, 1956).

La méthode consiste à additionner à une quantité de 1 ml de phénol à 1 ml de surnageant des différents échantillons, en plus de 5 ml d'acide sulfurique. Après un chauffage du mélange dans un bain marie (100°C pendant 5 min) est effectué. Ensuite le mélange est stocké 30 min à l'obscurité avant la mesure de l'absorbance.

L'intensité de la coloration mesurée à une longueur d'onde de 490 nm est proportionnelle à la concentration des glucides présente dans l'échantillon.

7. Etude du statut oxydatif intestinal

7.1. Préparation des homogénats

Les tissus de l'iléon et du côlon ont été décongelés et homogénéisés sur de la glace dans le rapport de 2 g de tissu pour 8 ml de tampon phosphate salin. Les homogénats ont ensuite été centrifugés pendant 15 min à 12000 rpm à 4°C et le surnageant a été utilisé pour les différentes analyses.

Les dosages biochimiques ont été effectués uniquement sur la fraction glycoprotéique (surnageant) qui contient la majorité des constituants.

7.2. Mesure de la teneur en malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique par les espèces d'oxygène réactives (ERO) est connue pour être impliquée dans le mécanisme dommageable de plusieurs troubles aigus et chroniques. L'essai le plus important et le plus couramment utilisé comme indice pour les produits de peroxydation lipidique est l'essai sur l'acide thiobarbiturique (test TBA) (Garcia *et al.*, 2005).

MDA est un paramètre important de l'oxydation des lipides, qui a été déterminé par la méthode d'Okhawa *et al.* ; et Chiva *et al.* Chaque molécule de MDA interagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) dans un milieu acide et une température élevée pour former un composé rose qui peut être mesuré à 532 nm (Okhawa *et al.*, 1979 ; Chiva *et al.*, 2003) (Figure 46).

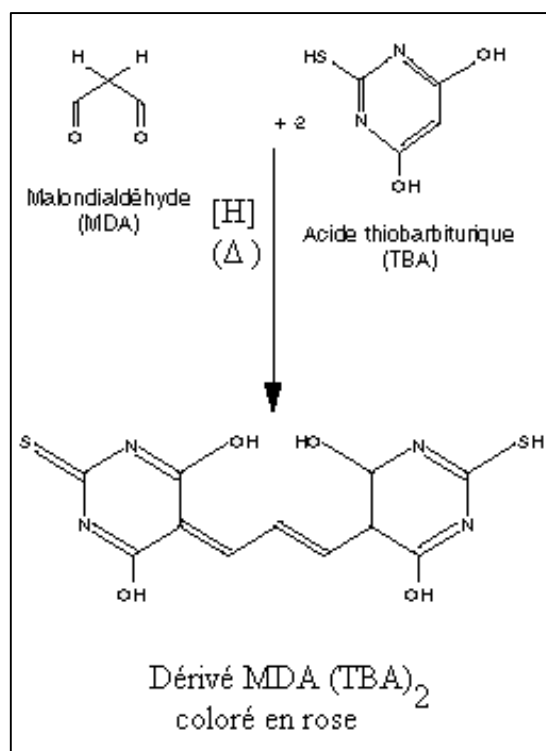


Figure 44 : Principe de dosage du malondialdéhyde.

Brièvement, 0,5 ml d'homogénat (surnageant) a été mélangé avec 0,5 ml de l'acide trichloracétique TCA (20 %) et 1 ml de TBA (0,67 %). Le mélange a été incubé au bain marie à 80°C pendant 15 min. Ensuite, 2 ml de n-butanol ont été ajoutés, et la solution a été centrifugée à 3000 rpm pendant 15 min et l'absorbance est lue à 532 nm. La concentration de MDA a été déterminée à partir d'une courbe standard de 1, 1, 3,3 tétraéthoxypropane dans les mêmes conditions et elle a été exprimée en nmol/mg de tissu.

$$C = \frac{DO \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot \chi \cdot L \cdot Fd}$$

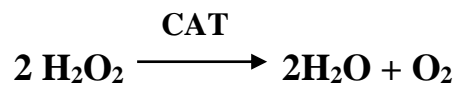
- C : Concentration de MDA en nmoles/mg de prot ;
- DO : Densité optique lue à 530 nm ;
- ε : Coefficient d'extinction molaire du MDA, $\varepsilon_{MDA} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;
- χ : Concentration du surnagent en protéines (mg/ml) ;

- Fd : Facteur de dilution, Fd = 0.2083.

7.3. Mesure de l'activité de la catalase (CAT)

Les catalases peuvent être trouvées dans un large éventail de tissus. Il s'agit d'enzymes tétramériques avec une molécule d'hème et une molécule de NADPH dans chaque unité. Ces enzymes aident la cellule à se défendre contre le stress oxydatif en éliminant les espèces réactives et en accélérant la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui est nocif pour la cellule, dans l'eau et l'oxygène (Aebi, 1984).

La réaction se fait en deux étapes. La réaction bilan est :



L'activité de l'enzyme catalase dans les tissus intestinaux a été mesurée selon le protocole de Caliborne et al, qui était basée sur la diminution de l'absorbance à 240 nm causée par la fragmentation du H₂O₂ dans l'eau et de l'oxygène par l'enzyme (Caliborne, 1985).

Du surnageant (0,2 ml) a été ajouté à 1 ml de peroxyde d'hydrogène (30 mM de peroxyde d'hydrogène dans un tampon de phosphate de 0,1 M pH 7). L'absorbance a été mesurée pendant 3 min à une longueur d'onde de 240 nm et le changement d'absorbance par minute a été utilisé pour calculer l'activité en utilisant coefficient d'extinction molaire et l'activité est exprimée en mM de peroxyde d'hydrogène décomposé par minute par mg de protéine.

$$\text{CAT } (\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min/mg prot}) = \frac{\Delta \text{DO} \times d}{\epsilon \times X \times L \times 0.02}$$

- ΔDO : variation de la densité optique par minutes, c'est-à-dire pour :
 - * AI (Absorbance initiale) : 15 s ;
 - * AF (Absorbance finale) : 1min ;
 - On fait : (AI - AF) \times 4/3 par min ;
- d : dilution de l'échantillon au début ;

- ε : Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée, $\varepsilon \text{ H}_2\text{O}_2 = 0.043 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = 0,043 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-1}\text{ml}^{-1}$;
- L : Trajet optique de la cuve = 1 cm ;
- X : Concentration de protéines en mg/ml.

7.4. Mesure de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

L'activité enzymatique de la SOD (superoxyde dismutase) a été évaluée en utilisant la méthode spectrophotométrique développée par Marklund et Marklund.

Le mélange d'essai consistait en 2 ml de Tris-HCl (0,1 M, pH 8,2), 1,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de surnageant. La réaction a été amorcée par l'ajout de 0,5 ml de pyrogallol (2 mM de pyrogallol dans 50 mM de Tris-HCl pH 7,4). Un témoin a le même mélange d'essai avec ajout de 2 ml d'eau distillée au lieu de 1,5 ml dans les échantillons (Marklund et Marklund, 1974).

Le changement de l'absorbance a été enregistré sur une période de 3 minutes à une longueur d'onde de 420 nm et un changement de l'absorbance par minute suivi d'une activité enzymatique qui correspond à la quantité d'enzyme qui inhibe l'auto-oxydation du pyrogallol de 50 % a été calculé et exprimé par mg de protéine (Marklund et Marklund, 1974).

7.5. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)

Le glutathion est un thiol intracellulaire le plus abondant présent dans toutes les cellules animales.

La réduction du glutathion (GSH) a été mesurée selon Moron *et al.* Cette méthode repose sur la réduction du 5,50-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) (réactif d'Ellman) par des groupes sulfhydryles pour former de l'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque, qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 412 nm (Moron *et al.*, 1979) (Figure 47).

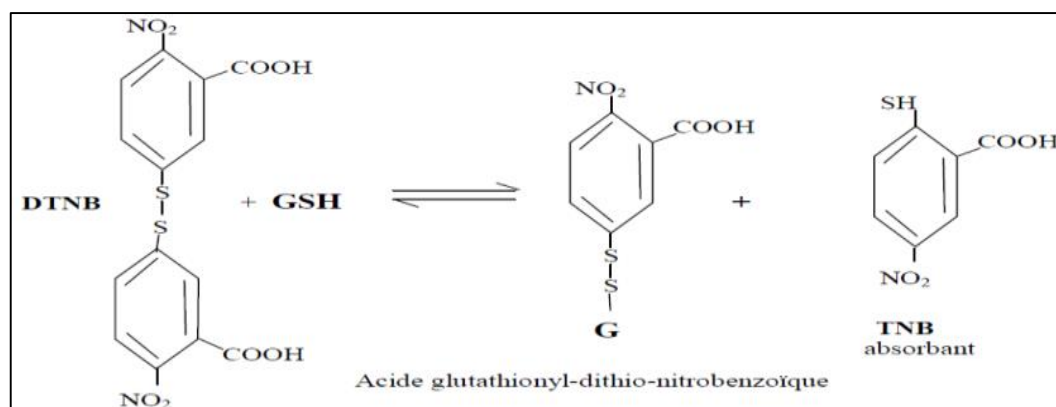


Figure 45 : Principe de dosage du glutathion.

La méthode consiste à ajouter 0,1 ml d'homogénat avec 0,9 ml de tampon de phosphate (0,2 M, pH 8), puis 2 ml (0,6 M DTNB) et à mesurer l'absorbance. Elle est exprimée en μg de glutathion réduit par gramme de tissu (Monor *et al.*, 1979).

8. Mesure des niveaux de Nitrite (NO)

L'oxyde nitrique (NO), produit de façon endogène à partir de la L-arginine par synthèse d'oxyde nitrique, joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques, y compris la régulation vasculaire, les réponses immunitaires et la communication neurale. Le NO est extrêmement instable et subit une dégradation oxydative remboursée en nitrite (NO₂⁻) et en nitrate (NO₃⁻), qui peuvent être déterminés par spectrophotométrie.

La réaction de Griess a été utilisée pour déterminer les niveaux de nitrite comme indicateur de la production de NO dans tous les surnageants, comme décrit précédemment par Cristol *et al.* et modifié par Touil-Boukoffa *et al.* Brièvement, 100 μl de chaque échantillon ont été mélangés avec 50 μl de réactif Griess (5 % de sulfanilamide, 0,5 % de chlorhydrate de naphthylethylènediamine, 20 % de HCl) (Cristol *et al.*, 1994 ; Touil-Boukoffa *et al.*, , 1998).

Les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 20 minutes et l'absorbance mesurée à 543 nm par spectrophotomètre.

La concentration de nitrite a été déterminée à l'aide d'une courbe standard construite avec du nitrite de sodium (NaNO₂ ; 0 à 200 $\mu\text{mol/ml}$).

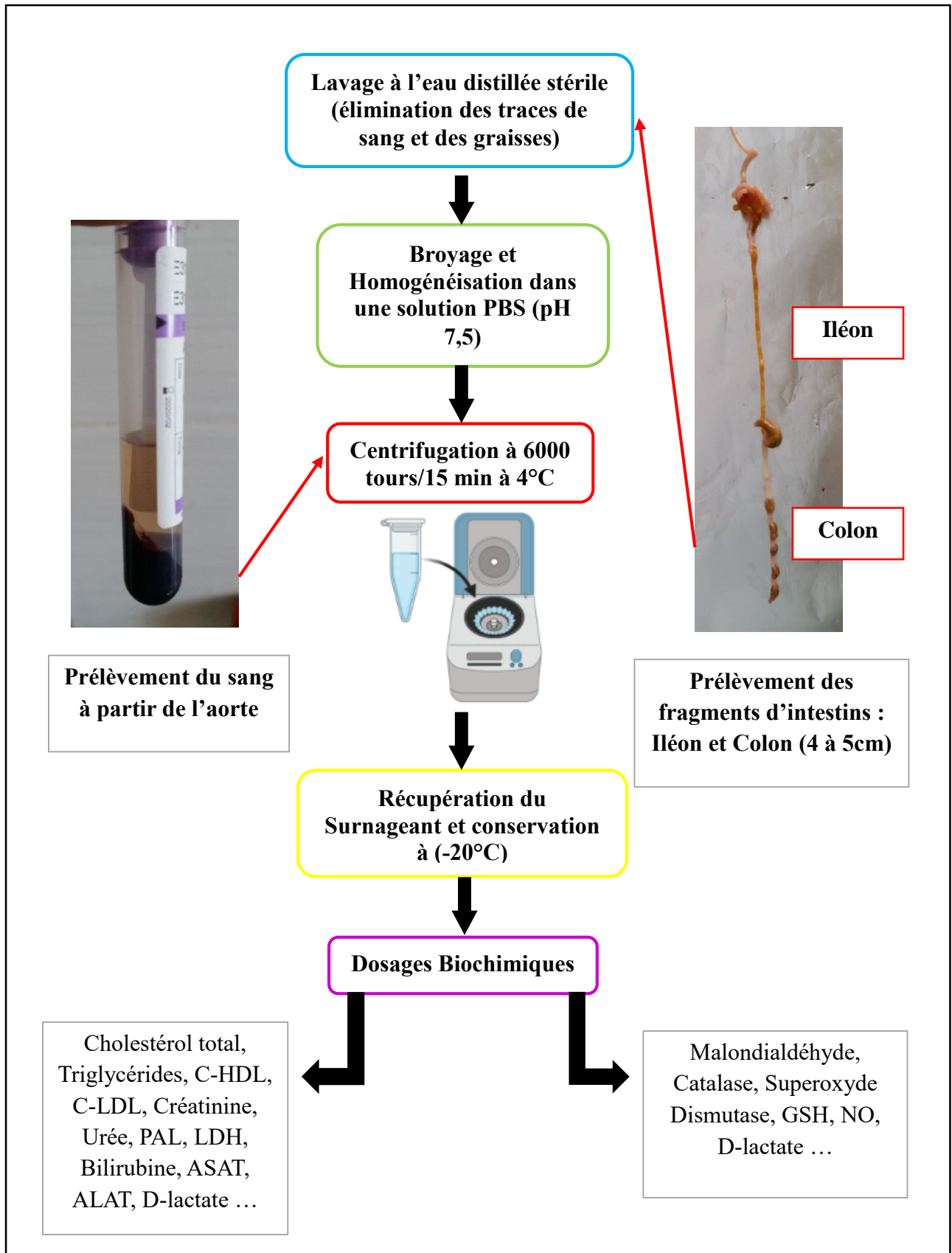


Figure 46 : Schéma représentatif du prélèvement des échantillons et réalisation de différentes analyses Biochimiques.

9. Mesure de la perméabilité intestinale

9.1. Mesure de la D-Lactate

Les taux d'acide D-lactique (D-lactate) ont été mesurés afin d'évaluer les modifications de la perméabilité intestinale. À l'aide d'un test spectrophotométrique (Szalay *et al.*, 2003), des échantillons de plasma, des homogénats d'iléon et de côlon ont été déprotéïnés et neutralisés avec de l'acide perchlorique et de l'hydroxyde de potassium, respectivement. Le niveau de D-lactate a ensuite été quantifié à l'aide de D-lactate déshydrogénase et d'alanine aminotransférase dans une série de processus enzymatiques liés (Figure 48).

9.2. Mesure de l'expression génétique des protéines des jonctions serrées avec PCR quantitative en temps réel

L'analyse de l'expression génétique de protéines des jonctions serrées sélectionnées (Claudine-1 et Zonula Occludens-1) a été menée au niveau du Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire (Université Yarmouk- Jordanie) afin de déterminer si la caféine affectait des changements dans l'expression des gènes codant pour ces protéines dans l'iléon et le colon.

L'analyse d'expression génique utilisant la PCR quantitative en temps réel (qPCR) offre une grande sensibilité, une plage dynamique et une reproductibilité. Contrairement à la PCR traditionnelle, la PCR quantitative en temps réel (qPCR) est à la fois qualitative et quantitative.

Le principe de qPCR est le même que pour la PCR traditionnelle, mais l'ADN amplifié est détecté après chaque tour d'amplification au lieu de la détection de l'ADN amplifié seulement à la fin de la réaction. L'analyse d'ARNm avec qPCR nécessite la transcription inverse des transcriptions d'ARNm en ADN complémentaire (ADNc) avant l'amplification et l'analyse subséquente.

9.2.1. Extraction de l'ARN totale

L'ARN total a été extrait d'échantillons de tissus intestinaux (iléon et colon) conservés à -20°C à l'aide d'un Kit d'extraction d'ARN total (JenaBioscience, Allemagne), suivant les instructions du fabricant.

L'ADN génomique a été digéré par traitement à la désoxyribonucléase I (QIAGEN). Ensuite, les concentrations d'ARN ont été déterminées à l'aide du QuantiFluor RNA System (Promega, Madison, É.-U.) et du Quantus Fluorometer (Promega, Madison, É.-U.).

Enfin, l'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé par transcription inverse de 2 mg d'ARN à l'aide de 0,5 µg oligo (dT) 15-amorces, à l'aide de RevertAid First Strand cDNA Kit (Thermo Scientific, Lituanie) et stocké à -20 °C jusqu'au jour de réalisation de la qPCR.

9.2.2. La PCR en temps réel (qPCR)

Les niveaux d'expression des protéines ont été examinés par l'utilisation de la réaction de polymérase quantitative (qPCR).

qPCR ont été appliqués sur des échantillons d'ADNc à l'aide d'ensembles précis d'amorces conçues qui sont énumérés dans le tableau (06). Les amorces d'introduction spécifiques pour claudin-1 et ZO-1 ont été conçues à l'aide du logiciel Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical). Les séquences oligonucléotides ont été obtenues de Sigma ARK (Darmstadt, Allemagne).

Tableau 06 : Les séquences d'oligonucléotides.

Gène	Amorce	Les Séquences
Gènes cibles		
<i>Claudine – 1</i>	Sens (5'-3')	5'-GTGGATGTCCTGCGTTTC-3'
	Inverse (5'-3')	5'-GTGTTGGGTAAGAGGTTGTT-3'
<i>Zonula occludens</i>	Sens (5'-3')	5'-CCACCTCTGTCCAGCTCTTC-3'
	Inverse (5'-3')	5'-CACCGGAGTGATGGTGTCT-3'
Gène de référence		
<i>β-actine</i>	Sens (5'-3')	5'-GAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'
	Inverse (5'-3')	5'-CTGGAAGGTGGACACTGAG-3'

La qPCR a été réalisé avec le système PCR en temps réel Line-Gene 9600 (Bioer Technology, Bingjiang, Chine) (Figure 49).

La réaction qPCR a été réalisée à l'aide d'un agent de liaison ADN SYBR Green (lunaRUnversal qPCR Master Mix) selon la procédure recommandée. L'expression relative a été calculée à l'aide de la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Le gène bêta-actine (β -actine) a été utilisé comme témoin positif interne pour normaliser les niveaux d'expression. Chaque expérience a été réalisée en trois répétitions.

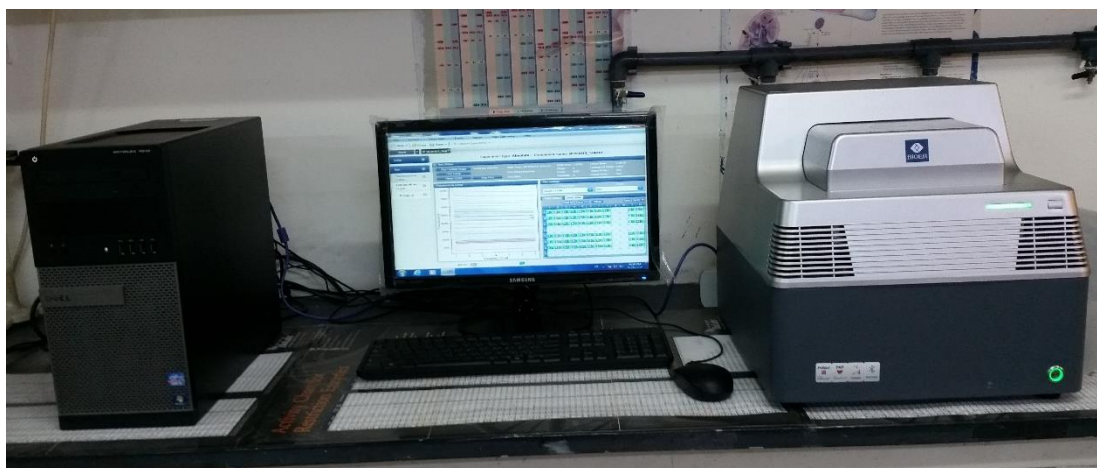


Figure 47 : Le système PCR en temps réel Line-Gene 9600 (Bioer Technology, Bingjiang, Chine).

10. Analyse statistique

Dans la présente étude tous les tests microbiologiques et biochimiques, ont été réalisés en duplicata ou triplicata. Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type (SD).

Pour comparer les valeurs obtenus chez les groupes traités et témoins, l'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test *t* de Student. Le seuil de significativité statistique était de $p < 0.05$.

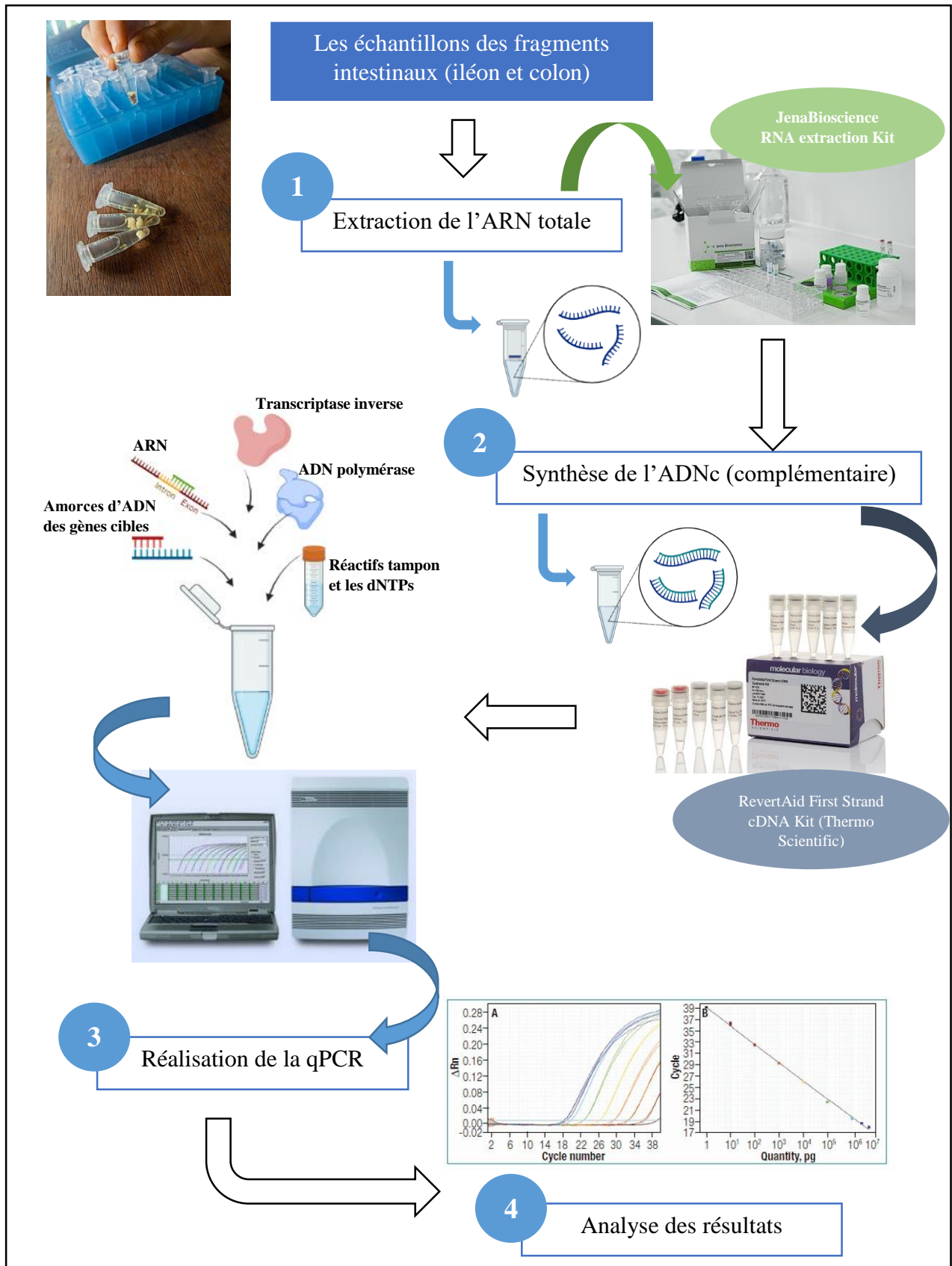


Figure 48 : Schéma représentatif de l'analyse de l'expression génétique des protéines des jonctions serrées (Claudine-1 et ZO-1) avec la PCR quantitative en temps réel dans l'iléon et le colon des rats témoins et traités avec de la caféine.

Résultats et Discussion

La présente étude avait comme objectif principale de déterminer l'impact d'un traitement au citrate de caféine sur différents marqueurs biologiques régulant l'homéostasie intestinale en période néonatale.

Le protocole expérimental a été conçu pour déterminer les effets de l'administration de la caféine sur l'implantation du microbiote intestinal, la perméabilité gastro-intestinale, la translocation bactérienne (TB), différents marqueurs biochimiques et le statut oxydatif intestinal chez les rats nouveau-nés.

1. Variation dans le poids corporel et des organes des rats au cours de l'administration de la caféine

1.1. Le poids corporel (PC)

Les principaux résultats du poids corporel sont illustrés dans la figure 51. Le poids corporel a augmenté dans les groupes traités et non traités d'une manière dépendante du temps. Le poids des animaux recevant un traitement à la caféine ne différaient pas de celui des témoins. Cependant, une diminution significative ($p < 0.05$) du poids corporel a été notée dans la série 3 (60 jours de traitement).

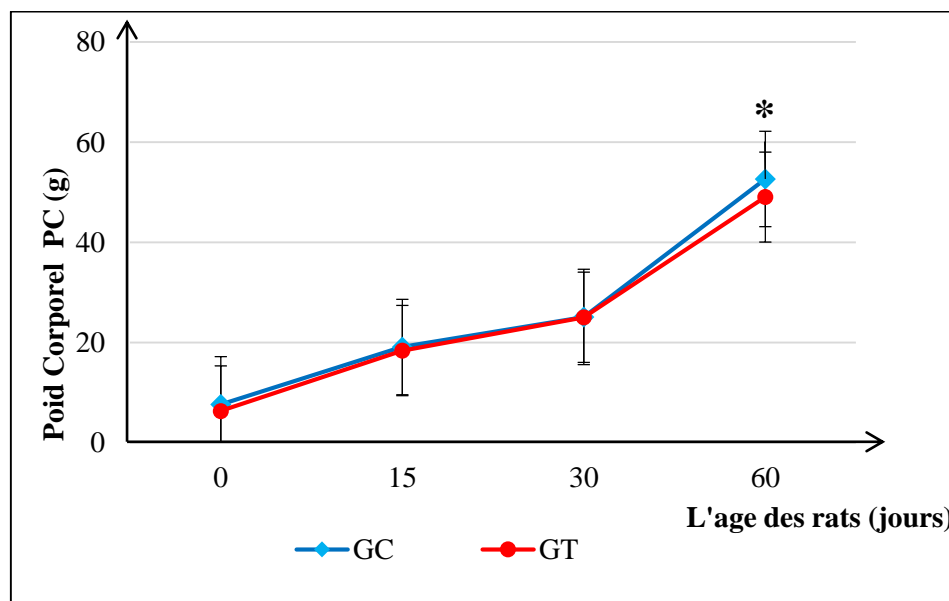


Figure 49 : Variation de poids corporel (PC) (g) chez les rats. GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine. * $p < 0.05$ GC vs GT (S3 : 60 jours).

1.2. Le poids des organes

Les poids des organes (cœur, poumons, foie, rates, les reins et le tube digestive) sont représentés dans le tableau 07. Nos données ont révélé que le poids des organes avait augmenté considérablement dans le premier groupe traité (S1) par rapport au groupe témoin. En effet, les poids du cœur, des poumons, du foie, de la rate, des reins et du tube digestif sont passés de 0.0882, 0.2844, 0.451, 0.067, 0.179 et 1.061 g à 0.142, 0.368, 0.73, 0.092, 0.238 et 1.48 , respectivement (Tableau 07).

L'administration orale de la caféine n'a induit aucun changement significatif du poids des organes étudiés chez les rats des groupes traités durant 30 et 60 jours (S2 et S3) par rapport aux témoins (Tableau 07).

Tableau 07 : Effet de la caféine sur le poids du tube digestif et les différents organes chez les rats nouveau-nés.

Groupes		TD (g) (S, D, J, I, C)	Cœur (g)	Poumons (g)	Foie (g)	Rate (g)	Reins (g)
S1 (15J)	GC	1.06 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.01
	GT	1.48 ± 0.14*	0.14 ± 0.01*	0.36 ± 0.03*	0.73 ± 0.08*	0.09 ± 0.02	0.23 ± 0.01*
S2 (30J)	GC	5.39 ± 0.8	0.17 ± 0.007	0.35 ± 0.03	2.03 ± 0.33	0.17 ± 0.02	0.43 ± 0.02
	GT	5.49 ± 1.45	0.14 ± 0.03	0.39 ± 0.08	1.41 ± 0.42	0.07 ± 0.04	0.37 ± 0.05
S3 (60J)	GC	11.45 ± 1.08	0.33 ± 0.07	0.53 ± 0.10	3.81 ± 0.8	0.26 ± 0.07	0.62 ± 0.09
	GT	12.10 ± 0.99	0.34 ± 0.04	0.66 ± 0.04	4.07 ± 0.4	0.38 ± 0.08	0.71 ± 0.09

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 06). GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine ; TD : tube digestif ; S : estomac, D : duodénum ; J : jéjunum ; I : iléon ; C : côlon.

* $p < 0,05$ GT vs GC (S1 : 15 jours).

L'état physiologique des animaux influe sur leur apport en nutriments (administration de substances thérapeutiques), ainsi que leurs poids corporels.

Les changements dans le poids des rongeurs après une exposition à la caféine ont été signalés dans plusieurs études. Nos résultats ont montré que l'augmentation du poids corporel n'était pas significative chez les rats nouveau-nés après 15 et 30 jours de traitement (Figure 52). Ce résultat corrobore les résultats de Kovacs *et al.*, qui n'ont signalé aucune différence significative dans le poids corporel entre les sujets recevant de la caféine avec du thé vert et

ceux ingérant seulement un placebo après 13 semaines avec un régime très faible en énergie (Kovacs *et al.*, 2004). De plus, Schmitt *et al.* n'ont signalé aucun changement significatif du poids au cours de l'exposition à la p-synéphrine, à l'éphédrine, à la salicine et au mélange de caféine utilisé comme anti-obésité pendant 28 jours (Schmitt *et al.*, 2016) .

Toutefois, une étude antérieure réalisée par notre laboratoire a démontré que le traitement au citrate de caféine semble entraîner une suppression temporaire de la prise de poids chez les rats nouveau-nés. La différence de perte de poids entre les groupes traités et les groupes témoins a augmenté et est devenue très importante le 30e jour de la vie (Moumen *et al.*, 2012).

De plus, de nombreux chercheurs ont montré que la consommation à long terme de la caféine réduisait le poids corporel chez les rongeurs (Zheng *et al.*, 2004 ; Shimoda *et al.*, 2006 ; Tofovic *et al.*, 2007). Shimoda *et al.* (2006) ont démontré que la consommation d'extrait de café vert (GCBE) pendant 14 jours a un effet supprimeur sur le gain de poids et l'accumulation de graisse viscérale chez les souris. GCBE contient 10% de caféine et 27% d'acide chlorogénique comme constituants principaux, et ces constituants ont montré une tendance à supprimer la prise de poids et l'accumulation de graisse viscérale. En outre, la caféine est connue pour être un composé lipolytique.

De plus, Jayakeerthana (2016) a constaté que les régimes qui sont complétés par la combinaison de composants de thé vert comme la caféine et la catéchine réduisaient le gain de poids par la combustion de certaines calories ; ce processus est appelé thermogénèse. Ces données sont en accord avec nos résultats qui ont montré une diminution significative du poids après 60 jours de traitement.

Aussi, Ryu *et al.* (2001), ont montré que l'ingestion de la caféine augmenté l'oxydation des graisses pendant l'exercice chez les athlètes et a un effet d'économie de glycogène pendant l'exercice chez les rats. L'ingestion de la caféine 60 min avant l'exercice a entraîné une augmentation de la concentration d'acide gras libre dans le sang (FFA), ce qui a été démontré pour augmenter le métabolisme lipidique et diminuer l'utilisation de glycogène musculaire. Leurs résultats suggèrent également que les acides gras augmentés par l'ingestion de la caféine ont été utilisés comme une source d'énergie majeure lors d'exercices d'endurance modérée.

En outre, la caféine réduit l'activité phosphodiesterase stimulée par les cathécholamines. L'augmentation du niveau de cathécholamine dans le sang augmente la concentration de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans les cellules, qui a son tour activera la lipase

hormono-sensible (HSL) dans le muscle squelettique et le tissu adipeux, respectivement. Par conséquent, l'hydrolyse accrue du TG stocké libérant plus de FFA dans le sang (Tarnopolsky *et al.*, 1989 ; Ryu *et al.*, 2001).

La transformation des graisses en métabolites énergétiques, qui fournissent une deuxième voie de production d'énergie, représente l'effet thermogénique du citrate de caféine (Astrup, 2000), un deuxième mécanisme qui peut être responsable de la perte de poids.

2. Résultats des analyses microbiologiques

2.1. Évaluation de l'effet de la caféine sur le microbiote intestinal dans l'iléon et le côlon

Les résultats de l'établissement du microbiote intestinal dans l'iléon et le côlon des rats nouveau-nés traités ou non à la caféine sont présentés sur la figure 52, respectivement.

La distribution bactérienne dans les groupes traités et non traités a montré la présence constante de bactéries aérobies à Gram négatif (*Enterobacteriaceae*). En effet, *Escherichia coli* a été isolée systématiquement alors que d'autres espèces seulement occasionnellement (*Enterobacter sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia liquefaciens* et *Citrobacter koseri*). Quantitativement, les niveaux d'*E. coli* étaient de $5 \text{ à } 8 \times 10^5/\text{g}$ de tissu. De plus, des bactéries anaérobies strictes du genre *Bacteroides* ont été isolées ($5\text{-}9 \times 10^6/\text{g}$ de tissu) (Figure 52).

Il n'y avait pas de différences significatives dans le nombre des flores aérobies et anaérobies totales dans les deux groupes traités et témoins. Cependant, les niveaux d'entérobactéries et de lactobacilles étaient légèrement inférieurs chez les nouveau-nés traités par rapport aux témoins, mais les différences n'étaient pas significatives (Figure 52).

Nous avons évalué le côlon et l'intestin grêle, à savoir l'iléon, parce que ce sont les sites avec une charge bactérienne prononcée et donc la barrière a une fonction protectrice particulière pour l'hôte.

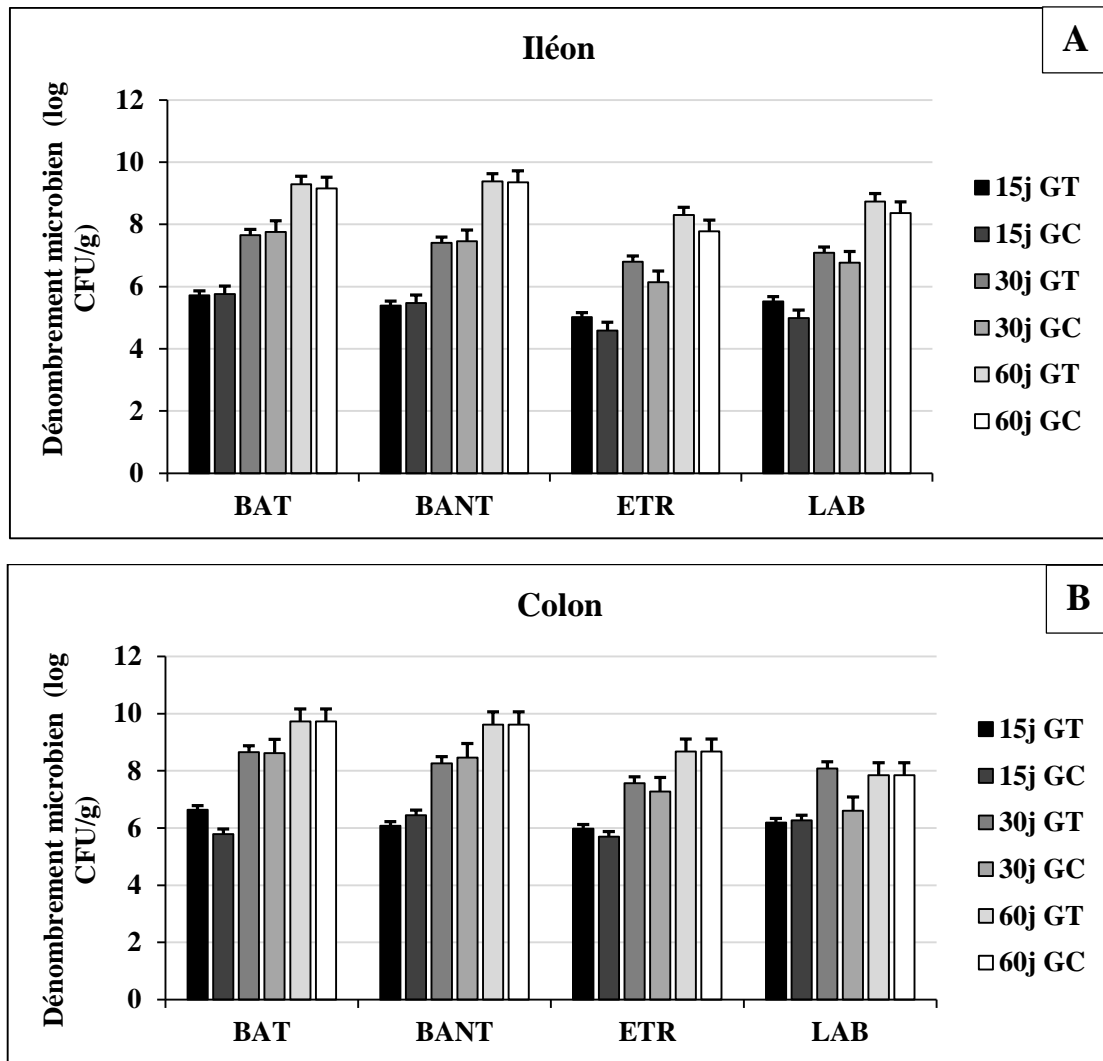


Figure 50 : Effet de l'administration de la caféine sur l'implantation du microbiote intestinal dans l'iléon (A) et le colon (B). GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine ; BAT : bactéries aérobies totales ; BANT : bactéries anaérobies totales ; ETR : Entérobactéries ; LAB : Lactobacillus. 15j, 30j, 60j : jours de traitement. UFC/g : unité formant colonie par gramme de tissu.

Le microbiote est une composante de la barrière biologique, qui exerce des effets positifs et négatifs sur la perméabilité intestinale (Cai *et al.*, 2017). Les anaérobies (Firmicutes et Bacteroidetes) sont les principales bactéries présentes dans le tractus gastro-intestinal et représentent environ 90 % de tous le microbiote (Barandouzi *et al.*, 2021).

L'hôte fournit au microbiote intestinal une niche anatomique pour l'attachement et la croissance des bactéries, les nutriments et les substrats, le métabolisme bactérien et les processus biologiques, et la tolérance immunitaire qui permet au microbiote de prospérer (Rehman *et al.*, 2008 ; Oakley *et al.*, 2013 ; Oakley *et al.*, 2014; Oakley et Kogut, 2016 ; Kogut, 2019).

Les études sur les effets directs de la caféine sur la modulation du microbiote intestinal sont rares et ne consistent qu'en de plus petites études.

Dans notre étude, aucune différence entre les nombres des anaérobies des rats traités à la caféine et des rats témoins n'a été observée (figure 52). Dans la même lignée, Kleber Silveira *et al.* n'ont trouvé aucun changement significatif dans l'abondance des bactéries anaérobies dans les groupes traités à la caféine comparativement aux groupes traités au guarana et aux groupes témoins (Kleber Silveira *et al.*, 2018).

De plus, Jaquet *et al.* (2009) ont démontrés que le nombre total de bactéries détectées dans les fèces ne différait pas entre la consommation avant et après du café ($P = 0,27$). De même, peu ou pas de différences significatives n'ont été observées dans le nombre de membres du groupe *Clostridium/Eubacterium*, de la famille des Enterobacteriaceae, du groupe des *Bacteroides/Prevotella* et du groupe des *Lactobacillus/Enterococcus*.

Nos résultats ont montré que le traitement à la caféine réduisait le nombre d'entérobactéries intestinales et de lactobacilles dans les groupes traités. Cette diminution peut être liée aux propriétés antibactériennes de la caféine (Almeida *et al.*, 2006 ; Ibrahim *et al.*, 2006 ; Gaul et Donegan, 2015 ; Nonthakaew *et al.*, 2015).

Dans une étude précédente, notre équipe a montré que le traitement de la caféine pendant la période postnatale chez les rats nouveau-nés, n'a pas radicalement altéré la cinétique de l'établissement du microbiote intestinal, Seules les entérobactéries étaient significativement plus faibles dans différents segments intestinaux des groupes traités ($p < 0,05$) (Moumen *et al.*, 2012).

De plus, la caféine peut affecter négativement le microbiote et réduire les niveaux de *Lactobacillus*, selon Kleber Silveira et al. (Kleber Silveira *et al.*, 2018).

L'action de la purine sur les voies métaboliques des bactéries peut varier de nocives à bénéfiques, selon l'espèce de bactéries. Certaines espèces de bactéries utilisent la caféine comme source majeure de carbone pour leurs besoins nutritionnels, tandis que d'autres sont inhibées en présence de caféine (Yamaoka-Yano et Mazzafera, 1999 ; Al-Janabi, 2011).

La pulpe de café a été documentée comme ayant une activité antimicrobienne contre les bactéries. Selon Duangjai *et al.* (2016), l'extrait aqueux de pulpe de café a révélé une activité

antibactérienne plus forte sur les bactéries à Gram positive, *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis* que sur les bactéries à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Selon Vamanu *et al.* (2020), l'acide chlorogénique (CGA) et la caféine (CF) restantes d'environ 80 % après la digestion gastro-intestinale *in vitro* pourraient être une valeur cruciale en pharmaceutique et pourraient être appliquées comme substrat pour la modulation du microbiote humain. Ces composés bioactifs pourraient favoriser la synthèse des acides gras à chaîne courte et enrichir les bactéries probiotiques naturellement existantes, donc l'inhibition de la multiplication d'*E. coli*.

Dans l'étude de Khochapong *et al.* (2021), l'extrait de pulpe de café (CPE) a inhibé *Escherichia coli* TISTR 780 et *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 à 150 et 200 mg/mL, respectivement. Le CPE et le CPE digéré n'ont eu aucun effet sur les probiotiques testés. Par conséquent, le CPE pourrait être un antimicrobien naturel potentiel pour l'industrie alimentaire sans effet sur les probiotiques.

Les principaux composés de l'extrait de pâte de café qui pourraient contribuer à son efficacité inhibitrice contre la croissance du micro-organisme sont l'acide chlorogénique, la caféine, l'acide quinique et l'acide malique (Duangjai *et al.*, 2016).

L'action principale de la caféine dans les cellules bactériennes peut être expliquée par de nombreux mécanismes : par exemple, l'interaction de la caféine avec l'acide nucléique bactérien (Sacks et Thompson, 1977) d'où l'inhibition de la synthèse de l'ADN (comme noté dans *E. coli* K12) (Sandlie *et al.*, 1980). La caféine peut également interagir avec l'enzyme responsable de la réparation des dommages causés à l'ADN bactérien par l'inhibition de l'enzyme dépendante de l'ATP (Selby et Sancar, 1990 ; Al-Janabi, 2011). Cet effet peut être dû aussi à la lipolyse des lipopolysaccharides (LPS) des parois bactériennes à Gram négatif par la caféine (Al-Janabi, 2011).

De plus, la caféine peut aussi influencer la communication entre les bactéries en tant qu'inhibiteur potentiel du quorum. La détection du quorum est une forme de système de communication cellulaire pour les bactéries. Il permet aux bactéries de contrôler l'expression des gènes en réponse à la densité cellulaire. Il régule une variété de fonctions physiologiques bactériennes telles que la formation de biofilm, bioluminescence, facteurs de virulence et essaimage, qui ont été montrés pour contribuer à la pathogenèse bactérienne (Norizan *et al.*, 2013 ; Cui *et al.*, 2020).

Le mécanisme par lequel la caféine a altéré le nombre total des bactéries aérobies et anaérobies dans l'intestin n'a pas été exploré dans cette étude. Des recherches approfondies sur l'impact de la caféine sur les communautés de microbiote intestinal sont nécessaires.

Malgré les quelques rapports existants sur la relation entre la caféine et les bactéries intestinales, cela est considéré comme un domaine d'un grand intérêt pour l'avenir.

2.2. Action de la caféine sur la translocation bactérienne

Comme le montre le tableau 08, la translocation bactérienne est présentée comme le nombre de rats avec une culture bactérienne positive divisé par le nombre total de rats nouveau-nés.

Aucune translocation bactérienne (TB) n'a été observée à la naissance (0 j) chez les deux groupes d'animaux traités et contrôles (Tableau 08).

Nos résultats ont révélé que des bactéries ont été observées dans les ganglions lymphatiques mésentériques (MLN), le foie et la rate des rats témoins de 15 jours (S1) (Tableau 08). Cependant, nous avons remarqué que la TB avait diminué dans les groupes traités. En fait, le traitement à la caféine a réduit la TB dans les MLN et les organes distants.

De plus, une absence totale de la translocation a été notée dans le groupe traité à la caféine à 30 jours de vie (sauf 1/6 dans les MLNs) par rapport au témoin. Aucune TB n'a été prononcée dans les groupes traités et témoins durant 60 jours (S3) (Tableau 08).

Tableau 08 : Translocation bactérienne vers les MLN, le foie, la rate et le thymus des groupes traités et les groupes témoins.

Groupes		MLN	Foie	Rate	Thymus
00 J	GC	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
	GT	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
S1 (15 J)	GC	4/6 (66.6%)	2/6 (33.3%)	2/6 (33.3%)	0/6 (0%)
	GT	2/6 (33.3%)	1/6 (16.6%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
S2 (30 J)	GC	2/6 (33.3%)	2/6 (33.3%)	1/6 (16.6%)	0/6 (0%)
	GT	1/6 (16.6%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
S3 (60 J)	GC	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
	GT	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)

GC : groupe contrôle, GT : groupe traité à la caféine

Les résultats sont données sous la forme (d/e) = culture positive/rat total du groupe.

Il est bien connu que la perméabilité gastro-intestinale est étroitement liée à la translocation bactérienne intestinale.

De nombreuses études animales et humaines ont clairement démontré que les microorganismes et les toxines normalement présents dans le tractus gastro-intestinal peuvent se déplacer de la lumière vers les sites d'extra-intestinaux (Qiao *et al.*, 2009).

Dans la présente étude, nous avons montré que la translocation bactérienne s'est produite à un âge précoce, ce qui représente un phénomène naturel chez les nouveau-nés, en vue de l'immaturité de leur système gastro-intestinal. En fait, nous avons observé la présence de bactéries (en particulier les Entérobactéries) dans les MLN et des organes tels que le foie et la rate des rats après 15 jours de vie (S1).

À l'appui de nos résultats, Berg (1995) a montré que les bactéries viables détectées dans les MLN indiquent une translocation bactérienne de la lumière intestinale.

Aussi, Wiest *et al.* (2014) ont révélé que les aérobies à Gram négatif se transloquent facilement que les anaérobies à travers l'épithélium intestinal.

Cependant, l'incidence de la TB était plus faible chez les rats traités à la caféine. Dans une étude précédente réalisée par notre équipe de recherche, il a été observé que le citrate de caféine a considérablement réduit la translocation bactérienne des bactéries Gram positives et négatives à partir du 20^{ème} jour de vie ($p < 0,05$) (Léké *et al.*, 2012). Selon Almeida *et al.* (2006) les composants du café comme la caféine, l'acide caféique et la trigonelline ont des effets antibactériens sur les microorganismes pathogènes. En effet, le café a inhibé la croissance des entérobactéries (*E. coli*), les bactéries les plus abondantes dans l'intestin.

Dans la présente enquête, la diminution de la TB s'explique, du moins en partie, par des altérations dans l'implantation du microbiote intestinal ou bien la maturation intestinale suite à l'administration du citrate de caféine.

3. Résultats des analyses biochimiques

3.1. Test de motilité gastro-intestinal avec du lait BaSO₄ (BSM)

Les résultats de l'effet de la caféine sur la motilité gastro-intestinale en période néonatale chez les rats sont présentés dans le tableau 09.

A partir des résultats obtenus la caféine ne semble pas affecter la motilité gastro-intestinale. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes traités à la caféine et les groupes témoins (Tableau 09).

Tableau 09 : Effet de la caféine sur la motilité gastro-intestinale avec le modèle BSM chez les rats.

Groupes		Longueur du tractus gastro-intestinal (cm)	Distance parcourue par BaSO ₄ cm (moyenne ± ecartype)	BaSO ₄ Traverse (%)
S1	GC	103,89 ± 4,80	69,00 ± 15,01	60,5847
(15J)	GT	110,7 ± 6,20	68,11 ± 11,4	60,3371
S2	GC	115,2 ± 8,02	70,00 ± 16,3	60,7638
(30J)	GT	113 ± 7,60	68,00 ± 10,8	60,1769
S3	GC	118 ± 2,80	65,00 ± 5	55,5555
(60J)	GT	115,40 ± 5,78	61,2 ± 8,5	53,7918

BaSO₄ : sulfate de baryum, GC : groupe contrôle, GT : groupe traité à la caféine.

La motilité gastro-intestinale est un processus complexe impliquant différents facteurs. L'élément le plus directement responsable de la fonction motrice est le muscle lisse, dont deux couches se trouvent dans tous les organes gastro-intestinaux : les couches circulaires (internes et plus épaisses) et longitudinales (externes et plus minces) (Leurs noms se réfèrent à l'orientation de leurs cellules musculaires lisses, autour ou le long de l'axe longitudinal du tractus gastro-intestinal ; l'estomac a une couche musculaire lisse oblique supplémentaire) (Iriundo-DeHond *et al.*, 2020).

Les effets du café et de ses composants sur la fonction motrice du tractus gastro-intestinal en général et les mécanismes spécifiques impliqués ont été relativement peu évalués.

Il a été observé que la caféine augmente le péristaltisme intestinal de par la contraction des muscles présents au niveau intestinal. Elle agit comme un léger laxatif en stimulant la

motricité du colon, en induisant l'excrétion d'acides biliaires et en relâchant les muscles lisses intestinaux.

Les sécrétions intestinales de l'eau et du sodium ne sont pas influencées par le café mais on remarque que la sécrétion de la cholécystokinine par l'intestin proximal est augmentée. En revanche, le temps de transit oro-coecal n'est pas modifié.

Il n'y a pas d'études récentes à ce sujet. Cependant, La caféine a été utilisée comme outil pour étudier les propriétés contractiles et/ou électriques des différents composants de la paroi intestinale impliqués dans la fonction motrice le long du tractus gastro-intestinal, y compris le plexus myentérique (neurones et cellules gliales), les cellules musculaires lisses et les cellules interstitielles de Cajal (CIC), ainsi que leur dépendance à la dynamique calcique intracellulaire (Ito *et al.*, 1974).

En 1998, on a comparé l'effet du café avec et sans caféine, de l'eau et des aliments sur le péristaltisme intestinal. Cette étude a montré que le café avec ou sans caféine et les aliments avaient un péristaltisme intestinal plus élevé que l'eau. Le café avec caféine était au même niveau que les aliments (1000 kcal), il était 60 % supérieur au péristaltisme de l'eau et 23% supérieur au péristaltisme du café sans caféine.

Il faut également noter qu'il existe des personnes sensibles à cet effet du café. Ainsi, chez ces personnes, l'augmentation de l'activité recto-sigmoïdienne survient dans les quatre minutes qui suivent l'ingestion. Cela peut être intéressant si la personne a tendance à être constipée. Nehlig A. déclare que le café augmente également la motricité de l'intestin grêle et du colon, ce qui active la défécation chez certaines personnes (Nehling A., 2018).

3.2. Effet de la caféine sur les paramètres biochimiques sériques

Dans la présente étude, nous avons déterminé différentes concentrations des paramètres biochimiques dans le plasma des deux groupes de rats nouveau-nés à l'aide de l'analyseur Respons 920- DiaSys Diagnostic Systems GmbH (65558 Holzheim, Allemagne).

3.2.1. Effet de la caféine sur la fonction lipidique

Les concentrations moyennes des paramètres biochimiques de la fonction lipidique chez les rats nouveau-nés traités et les témoins sont résumées dans le tableau 10.

Nous avons observé que l'administration du citrate de caféine diminuait la majorité des niveaux des paramètres sériques dans les groupes traités par rapport aux groupes témoins.

Tableau 10 : Effets de la caféine sur les niveaux des paramètres biochimiques sériques de la fonction lipidique.

Paramètres et groupes	S1 (15 J)		S2 (30 J)		S3 (60 J)	
	GC	GT	GC	GT	GC	GT
TG (g/l)	0.39 ±0.05	0.35 ±0.07	0,67±0.07	0.65±0.09	0.94±0.10	0.57±0.22*
TC (g/l)	0.42 ±0.03	0.451± 0.03	0.57±0.02	0.53±0.02*	0.61±0.12	0.51± 0.08
HDL (g/l)	87.83 ±4.53	83.16 ± 8.47	93.16 ±7.30	81 ±6.92	107.33 ± 15.50	84.83±10.45
LDL (g/l)	0.84 ±0.05	0.73 ± 0.14	0.87 ±0.36	0.93 ±0.10	0.85±0.50	0.91±0.20

GC : groupe contrôle, GT : groupe traité par la caféine, TG : Triglycérides, TC : Cholestérol Total, HDL : cholestérol des lipoprotéines de haute densité, LDL : cholestérol à lipoprotéines de basse densité.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 06).

* $p < 0.05$ GC vs GT (TG : S3 ; TC : S2).

Les taux de triglycérides ont été considérablement réduits chez les rats traités pendant 60 jours par rapport aux témoins (de 0.94 ± 0.10 à 0.57 ± 0.22 g/l). De même, une réduction significative du taux de cholestérol total a été obtenue dans le groupe traité de 30 jours. En effet, le taux de cholestérol total est passé de 0.57 ± 0.02 à 0.53 ± 0.02 g/l (Tableau 10).

De plus, les taux de cholestérol à lipoprotéines de basse densité (LDL) ne différaient pas statistiquement entre les groupes traités ou non (tableau 10). Bien que les rats traités aient présentés des taux de cholestérol à lipoprotéines de haute densité (HDL) inférieurs à ceux des témoins, la différence n'était pas statistiquement significative.

De même, une réduction significative des taux sériques de cholestérol total a été obtenue dans le groupe traité 30 jours (de $0,57$ $0,02$ à $0,53$ $0,02$ g/l). Par contre, il n'y a eu aucun changement significatif des valeurs de HDL-C et de LDL-C entre les groupes traités et non traités (Tableau 10).

La réduction considérable du profil lipidique sérique est conforme à une étude précédente qui a révélé que le traitement à la caféine avait réduit les niveaux de triglycérides chez les rats (Birkner *et al.*, 2006).

En fait, nos résultats ont montré que le traitement à la caféine a supprimé les niveaux de triglycérides (TGs) chez les rats traités pendant 60 jours (de $0,94$ $0,10$ à $0,57$ $0,22$ g/l). Dans la

même ligne, Jarrar et Obeid (2014) ont démontré que l'administration de la caféine avant ou avec le repas diminué les niveaux sériques des TGs. Il a été démontré que l'extrait de thé vert contenant 5 % de caféine, entre autres polyphénols, inhibe l'activité *in vitro* de la lipase gastrique et pancréatique (les principales enzymes impliquées dans la dégradation postprandiale des TGs) (Juhel *et al.*, 2000).

3.2.2. Effet de la caféine sur les paramètres plasmatiques de la fonction hépatique

Les concentrations moyennes des paramètres biochimiques de la fonction hépatique chez les rats nouveau-nés traités et les témoins sont résumées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Effets de la caféine sur les niveaux des paramètres biochimiques sériques de la fonction hépatique.

Paramètres et groupes	S1 (15 J)		S2 (30 J)		S3 (60 J)	
	GC	GT	GC	GT	GC	GT
AST (U/l)	148.60±6.08	143.33±2.16	162± 5.15	184 ± 34.2	165± 6.30	198.5 ± 24.80*
ALT (U/l)	53.33 ±3.26	61.83±18.17	49±11.66	79.5± 36.76	60.5± 2.16	107.16 ±42.10*
PAL (U/l)	493 ±52.30	301 ±48.30*	355,66±37.47	251±32.02*	289±38.75	281±71,21
LDH (U/l)	1316 ±5.83	1349.33±7.89*	1134.66±265.71	880.66±30.45	783.83 ±236.41	982.16 ±68.57
TB (mg/ml)	10.46 ±0.45	9.71± 0.54	9.40±0.34	7.78 ±0.42*	7.48±0.78	7.26±0.94
DB (mg/ml)	2.26 ±0.07	1.95± 0.49	2.35 ±0.16	1.54 ±0.27*	1.73±0.37	1.62±0.14

GC : groupe contrôle, GT : groupe traité par la caféine, AST : Aspartate Transaminase, ALT : Alanine Transaminase, LDH : Lactate Déshydrogénase, PAL : Phosphatase alcaline, TG : Triglycérides, TC : Cholestérol Total, HDL : cholestérol des lipoprotéines de haute densité, LDL : cholestérol à lipoprotéines de basse densité, TB : bilirubine totale, DB : bilirubine directe.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD. * $p < 0.05$ GC et GT.

En comparant aux témoins, la caféine a augmenté de manière significative ($p < 0.05$) l'activité des transaminases (AST et ALT) chez le groupe traité pendant 60 jours (S3). Alors que les niveaux d'AST et d'ALT sont restés inchangés dans les autres groupes.

Par contre, l'administration de caféine a entraîné une réduction de 301 ± 48.30 , 251 ± 32.02 et 281 ± 71.21 des niveaux de la phosphatase alcaline (ALP) après 15, 30 et 60 jours, respectivement (Tableau 11).

Le traitement par la caféine a induit une augmentation significative de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH) dans le groupe traité de 15 jours (Tableau 11).

On note aussi une diminution statistiquement significative ($p < 0.05$) du taux de bilirubine totale et directe dans les groupes traités de 30 jours (S2) (Tableau 11).

Les transaminases (ASAT/SGOT et ALAT/SGTP), PAL et LDH sont utilisés comme marqueurs cliniques pour diagnostiquer et évaluer l'affection hépatique. Lorsque le foie est endommagé, le taux de ces biomarqueurs sera élevé dans le sang.

L'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST) sont deux enzymes bien connues impliquées dans le métabolisme du foie, elles reflètent l'activité fonctionnelle du foie. Une maladie chronique du foie est fréquemment détectée lorsque les taux d'ALT et d'AST augmentent. De plus, plusieurs études ont démontré que l'ALT et l'AST sont liés à des troubles du métabolisme (Oh *et al.*, 2016). La caféine elle-même est un composé bioactif lié aux caractéristiques métaboliques chez les humains (Ding et Zhang, 2021).

Les transaminases (ou aminotransférases) jouent un rôle très important dans le cycle du citrate, elles catalysent la réaction de transfert d'un groupe amine d'un acide aminé soit à partir de l'acide aspartique, soit de l'alanine à l'acide α -cétoglutarique (Kim *et al.*, 2008).

Nos résultats ont montré que les concentrations des deux enzymes (ALT et AST) ont augmenté considérablement après 60 jours d'administration de la caféine. À l'appui de nos résultats et selon Boekschoten *et al.* (2004), les extraits de grains de café peuvent augmenter les niveaux d'ALT et d'AST. En outre, Urgert *et al.* (1996) ont découvert que la consommation régulière de café fort pourrait directement augmenter le niveau d'ALT circulant. De plus, Onuegbu *et al.* (2011) ont constaté que la consommation de café peut augmenter les niveaux d'ALT et d'AST selon le sexe. Dans la même ligne, l'étude récente de Handayani *et al.* a montré que l'administration d'extrait d'éthanol de café *Robusta* augmentait les niveaux d'ALT et d'AST chez les rats albinos de la souche Wistar (Handayani *et al.*, 2021).

Par conséquent, le lien entre la consommation de café et les niveaux d'ALT et d'AST peut être influencé par la conception de la recherche. Contrairement aux études épidémiologiques, les participants à ces essais contrôlés randomisés (ECR) buvaient toujours du café pendant une courte période (environ un mois seulement) (Ding et Zhang, 2021).

L'administration de caféine peut provoquer diverses réactions aiguës dans le foie/corps, ce qui pourrait expliquer les niveaux momentanément élevés d'ALT et d'AST. Dianzani *et al.* (1991) ont signalé que l'effet peroxydant de la caféine dans les tissus adipeux du foie pourrait

être à l'origine de la fuite d'enzymes. Les observations de Manne et de Saab confirment nos résultats (Manne et Saab, 2015).

Pour bien comprendre les enjeux à l'étude, plusieurs Essais contrôlés randomisés (ECR) à long terme sont nécessaires. Les phosphatases sont des enzymes qui participent au métabolisme, à la détoxification et à la production de macromolécules d'énergie pour une variété de fonctions physiologiques. L'interférence avec ces enzymes mène aux perturbations biochimiques, aux lésions tissulaires et la perte de fonction cellulaire (Djeffal, 2014).

La phosphatase alcaline (PAL) dégrade les esters de phosphate, et indique aussi l'état des voies d'absorption et de transport dans la membrane cellulaire (Djeffal, 2014). Nos résultats montrent que l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) a diminué de façon significative ($p < 0,05$) chez les rats traités par rapport aux témoins.

Rahman *et al.* (2000) ont proposé que la diminution des activités de la PAL et de l'acide phosphatase (AcP) dans différents tissus puisse être due à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique ou à la nécrose cellulaire, montrant l'état d'un stress dans l'animal traité (Rahman *et al.*, 2000).

Conformément à nos résultats, des travaux antérieurs ont révélé une réduction similaire dans la concentration de la PAL chez des rats ayant reçu de la caféine filtrée et non filtrée (Fried et O'Connell, 1987). Ainsi, Nyblom *et al.* (2006) ont suggéré que la caféine ou d'autres composants du café ciblent les enzymes hépatiques.

Le lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme importante de la voie métabolique anaérobie. Il appartient à la classe des oxydoréductases. La fonction de l'enzyme est de catalyser la conversion réversible du lactate en pyruvate avec la réduction du NAD⁺ en NADH et vice versa (Schumann *et al.*, 2002).

Le lactate déshydrogénase est une enzyme présente dans presque tous les tissus du corps. Les conditions qui peuvent causer une augmentation de la LDH dans le sang peuvent inclure une maladie du foie, anémie, crise cardiaque, fractures osseuses, les traumatismes musculaires, les cancers et les infections comme l'encéphalite, la méningite, l'encéphalite et le VIH. La LDH est également un marqueur non spécifique du renouvellement des tissus, qui est un processus métabolique normal (Farhana et Lappin, 2021). Le traitement par la caféine semble affecter l'activité de cette enzyme.

La bilirubine est un biomarqueur impliqué directement dans l'ampleur des dommages et de la toxicité hépatique. C'est le produit de la dégradation des hématies vieillies ou abimées. Ces hématies vont libérer le hème et la globine (Basso *et al.*, 1991). La bilirubine est liée à d'autres molécules dans le foie avant d'être éliminée dans la bile. Les taux de bilirubine totale et directe des groupes traités ont été réduits significativement ($p < 0,05$) par rapport aux témoins (30 jours).

Nos résultats sont en accord avec les observations d'Emmanuel *et al.* (Emmanuel *et al.*, 2017). Ils ont signalé que la consommation de caféine à différentes doses diminue les niveaux de bilirubine.

3.2.3. Effet sur les concentrations plasmatiques de la fonction rénale

Le tableau 12 résume les biomarqueurs plasmatiques de la fonction rénale des rats témoins et traités par le citrate de caféine sur trois périodes.

Tableau 12 : Effets de la caféine sur les concentrations de l'urée et la créatinine (n = 06).

Paramètres et groupes	S1 (15 J)		S2 (30 J)		S3 (60 J)	
	GC	GT	GC	GT	GC	GT
Urée (g/l)	0.21 ± 0.02	0.15 ± 0.01*	0.35 ± 0.02	0.29 ± 0.02*	0.34 ± 0.06	0.30 ± 0.06
Créatinine (mg/l)	5.18 ± 0.16	5.55 ± 0.28*	6.56 ± 0.17	6.13 ± 0.24*	7.41 ± 0.14	6.61 ± 0.35*

GC : groupe contrôle, GT : groupe traité par la caféine.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 06).

* $p < 0.05$ GC vs GT (Urée : S1 et S2 ; Créatinine : S1, S2 et S3).

Nos résultats ont démontré que l'administration de caféine aux rats nouveau-nés a réduit les niveaux d'urée et de créatinine par rapport aux témoins. Dans tous les groupes, les différences étaient statistiquement significatives ($p < 0,05$).

Les reins jouent un rôle central dans l'excrétion des médicaments et constituent donc une cible importante pour la toxicité des médicaments, en particulier chez les nouveau-nés d'âge gestationnel extrêmement bas, qui sont souvent atteints de morbidités graves et exposés à de nombreux autres médicaments. Les reins des nouveau-nés prématurés sont fonctionnellement immatures, ce qui entraîne des déséquilibres électrolytiques et acido-basiques qui entraînent souvent une hyperkaliémie, une hypocalcémie et une acidose (Sulemanji et Vakili, 2013). Ces effets toxiques rénaux impliquent les cellules tubulaires et glomérulaire (Mohamed *et al.*, 2003).

De plus, les nouveau-nés gravement prématurés (< 1500 g) présentent un risque accru (18 % à 40 %) de lésions rénales aiguës (IRA) comparativement aux nouveau-nés à terme (Koralkar *et al.*, 2011).

L'urée est produite à partir du catabolisme protéique dans le foie, elle est filtrée au niveau du glomérule et n'est réabsorbée que passivement. Son élimination dépend de la diurèse. Tandis que la créatinine est le résultat du métabolisme de la créatine, qui est un déchet du muscle. La créatinine est ensuite soumise à la filtration glomérulaire passive pour être totalement excrétée dans les urines.

L'urée et la créatinine sanguines des animaux d'expérience sont parmi les paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (Amadi *et al.*, 2013).

La concentration de l'urée dans le sérum sanguin dépend de la décomposition des protéines endogènes ou de l'activité excrétrice des reins. Ce n'est qu'avec la filtration glomérulaire (débit) élevée de plus de 50% que la concentration d'urée dans le sérum sanguin diminue, ce que nous avons constaté dans notre étude (lors de l'administration de la caféine).

La caféine produit la diurèse. Son élimination est beaucoup plus lente chez les nouveau-nés d'âge gestationnel extrêmement bas que les néonataux à terme en raison du cytochrome hépatique immature P450 et les fonctions rénales (Le Guennec *et al.*, 1985 ; Falcao *et al.*, 1997 ; Beharry *et al.*, 2018). La caféine exerce ses effets diurétiques en augmentant la clairance de la créatinine et le taux de filtration glomérulaire.

Gillot *et al.* (1990) ont trouvé que le débit urinaire, le rapport débit/débit d'eau et la clairance de la créatinine ont augmenté considérablement chez les nouveau-nés après l'administration de caféine. Par contre chez les adultes, la caféine a réduit le débit vasculaire rénal et la réponse du débit vasculaire rénal à l'angiotensine II exogène (Brown *et al.*, 1993). Chez les animaux, la caféine a exacerbé l'insuffisance rénale chez les rats diabétiques obèses (Tofovic *et al.* , 2002). Ces effets de la caféine sur le débit urinaire et vasculaire peuvent être dus à des altérations des prostanoïdes rénales (Engelhardt G., 1996).

La réduction dans les taux des paramètres rénale dans notre étude indique que la caféine possède un effet protecteur des reins. Il a été démontré que la caféine diminue l'incidence et la gravité des lésions rénale aigus, probablement en raison de l'antagonisme de l'adénosine (Carmody *et al.*, 2016).

3.3. Effet de la caféine sur la phosphatase alcaline intestinale

La figure 53 illustre les concentrations tissulaire de la phosphatase alcaline intestinale chez les rats témoins et traités par le citrate de caféine sur les trois périodes (S1, S2 et S3).

Les résultats du dosage de l'activité de la phosphatase alcaline intestinale indiquent que l'expression de cette enzyme a été réduite significativement ($p < 0.05$) suite à l'administration de la caféine dans les groupes traités pendant 15 et 30 jours par rapport aux témoins (Figure 53).

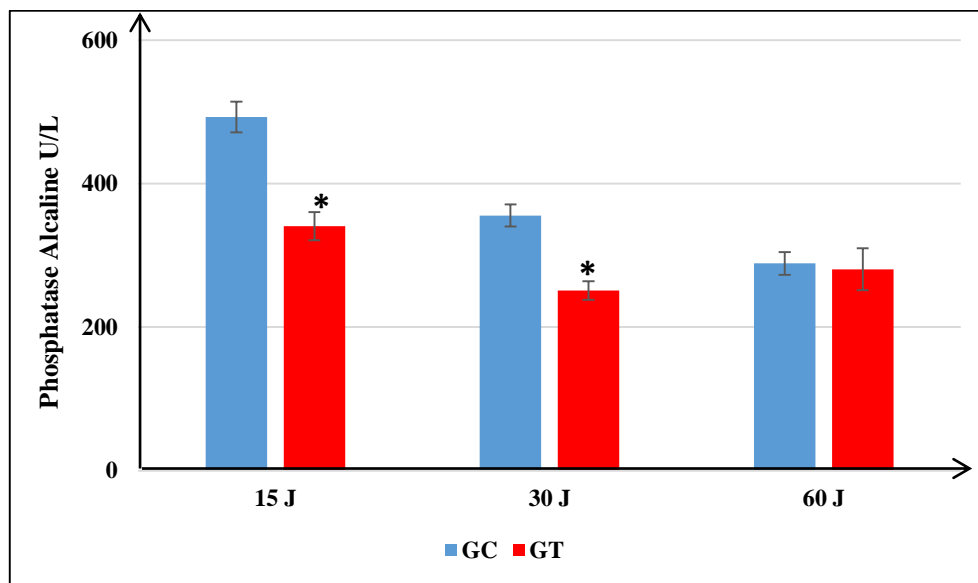


Figure 51 : Effets de la caféine sur les la phosphatase alcaline intestinale (dans l'iléon).
* $p < 0.05$ GC vs GT (S1 et S2).

La phosphatase alcaline intestinale (PAI) est une enzyme phosphomonoestérase qui provoque l'hydrolyse de liaisons esters phosphomonoestérase non spécifiques au pH alcalin. La PAI s'exprime en grandes quantités dans le duodénum, et celles-ci diminuent graduellement dans le reste du tractus gastro-intestinal ; étant donné que son activité est plus élevée dans l'extrémité de la villosité que dans la crypte, la PAI est considéré comme un marqueur de la maturité des entérocytes (Lallès, 2014).

La PAI joue plusieurs rôles physiologiques dans le tractus gastro-intestinal, comme la régulation de l'absorption des lipides, la régulation de la sécrétion duodénale de bicarbonate et du pH de surface, la déphosphorylation du LPS bactérien et, par conséquent, la protection contre l'inflammation induite par les LPS, réduction de la translocation bactérienne et modulation de la tolérance intestinale aux bactéries commensales (Goldberg *et al.*, 2008 ; Lallès, 2010).

L'utilisation de la PAI fécale comme biomarqueur des dommages épithéliaux intestinaux a été proposée chez les rongeurs il y a plusieurs années (Thomas et Henton, 1985) et la littérature actuelle suggère également qu'il pourrait s'agir d'un biomarqueur prometteur pour les maladies métaboliques (Lallès, 2015).

3.4. Effet de la caféine sur la Lactate déshydrogénase tissulaire (LDH)

La figure 54 illustre les concentrations tissulaire du lactate déshydrogénase chez les rats témoins et traités par le citrate de caféine sur les trois périodes.

A partir des résultats obtenus, on a observé que le taux du lactate déshydrogénase dans l'iléon diminue au cours du temps suivant la cinétique de croissance des rats dans les groupes contrôles (Figure 54).

Dans les groupes traités au citrate de caféine le taux du LDH a été réduit après 30 jours (S2) de traitement par rapport au groupe contrôle, mais cette réduction n'a pas été statistiquement significative (Figure 54).

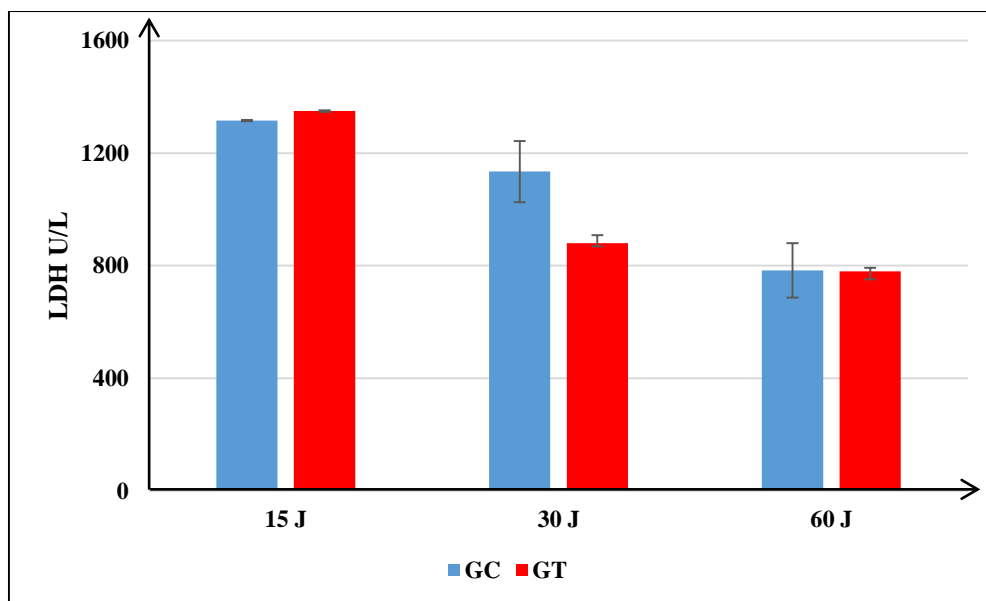


Figure 52 : Effets de la caféine sur l'activité du lactate déshydrogénase (dans l'iléon).

L'enzyme a été choisie parce qu'elle peut être déterminée comme un test de laboratoire de routine, elle est située différemment dans la cellule et dans la paroi intestinale, et elle a été signalée pour être augmentée pendant la nécrose ischémique du petit et du grand intestin. La LDH, est une enzyme intracellulaires présentes dans la couche sérométrique de la paroi

intestinale, tandis que La PAI est liée à la membrane, principalement située dans la couche muqueuse (Morini *et al.*, 2008).

Lorsque des lésions ischémiques intestinales se produisent, les lésions des muqueuses progressent progressivement vers une nécrose des villosités et de la couche musculaire. En conséquence, les enzymes intracellulaires et membranaires sont libérés dans l'espace extracellulaire et peuvent traverser la barrière intestinale-muqueuse perturbée dans la circulation systémique, provoquant une augmentation de leur activité (Morini *et al.*, 2008).

L'activité de la LDH est actuellement (et systématiquement) utilisée dans les études expérimentales comme marqueurs de dommages intestinaux (Sola *et al.*, 2001 ; Caglayan *et al.*, 2002 ; Fujino *et al.*, 2003 ; Mallick *et al.*, 2005 ; Morini *et al.*, 2008).

Le citrate de caféine ne semble pas avoir d'incidence notable sur l'activité de la LDH dans l'intestin (iléon).

3.5. Effet de la caféine sur les protéines totales et les sucres totaux

Les figures 53 et 54 représentent les courbes d'étalonnages pour le dosage des protéines totales et des sucres totaux.

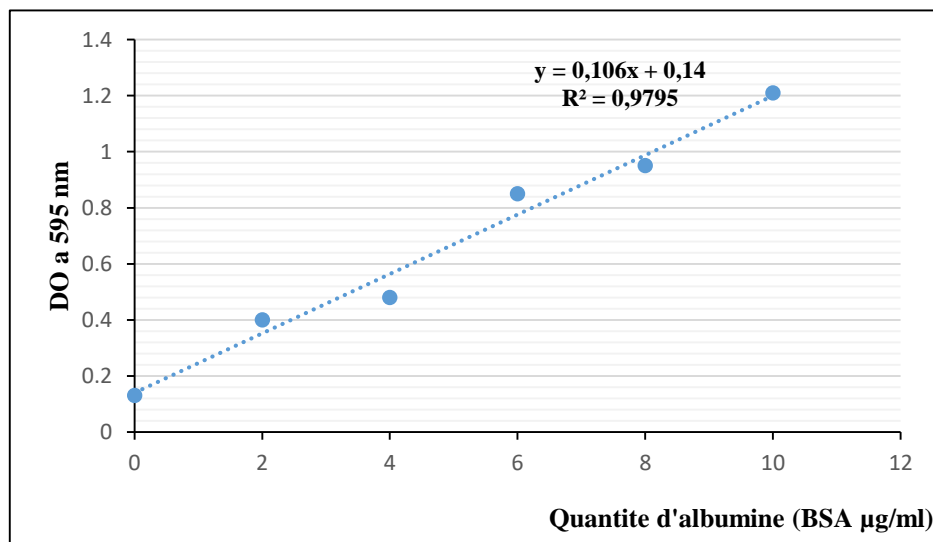


Figure 53 : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des protéines.

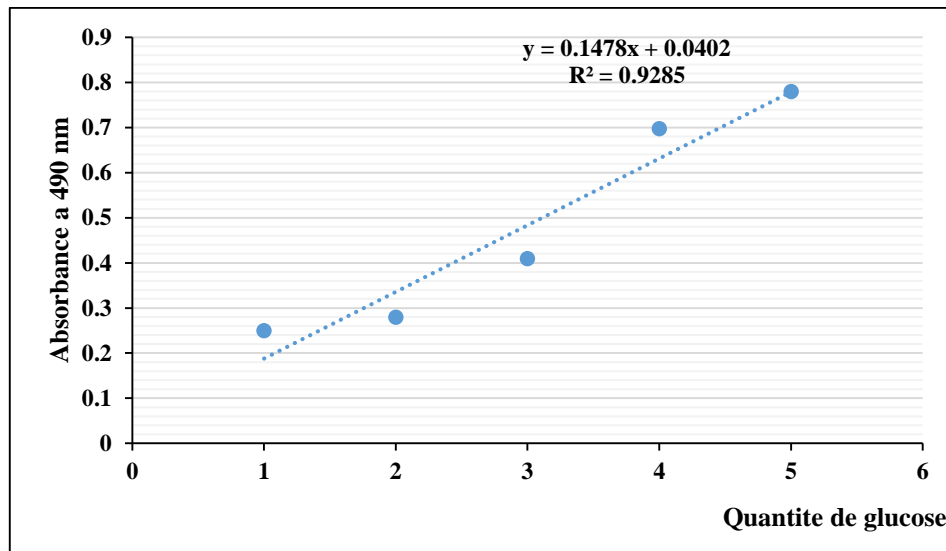


Figure 54 : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des sucres totaux.

La figure 55 illustre les concentrations tissulaire des protéines et des sucres totaux chez les groupes de rats contrôles et traités avec le citrate de caféine sur les trois périodes du traitement (15, 30 et 60 jours).

Dans les groupes de la première série (15 jours), la teneur en protéines totales est importante dans les échantillons d'iléon des rats.

Par ailleurs, la teneur en protéines totales s'abaisse au cours du temps (30 jours et 60 jours) dans les deux groupes contrôle et traités. Cependant, les taux des protéines totales étaient plus réduits dans les groupes traités par rapport aux groupes contrôles.

Aucune différence significative dans les concentrations des protéines totales n'a été notée entre les groupes traités à la caféine et les groupes contrôles (Figure 55.A).

L'analyse des taux en sucres totaux dans l'iléon et dans les groupes contrôles a montré que les taux des sucres augmenté au cours de la croissance de l'animal (de 15j à 60j de vie).

Par contre, on a observé que les taux des sucres dans l'iléon ont été affectés par l'administration du citrate de caféine. Par ailleurs, une réduction significative ($p < 0.05$) a été observée dans le groupe traité à la caféine pendant 15 jours (Figure 55.B).

La réduction dans le taux des sucres a été aussi notée dans le groupe traité pendant 60 jours (S3) en comparant au témoin, mais cette différence n'était pas significative.

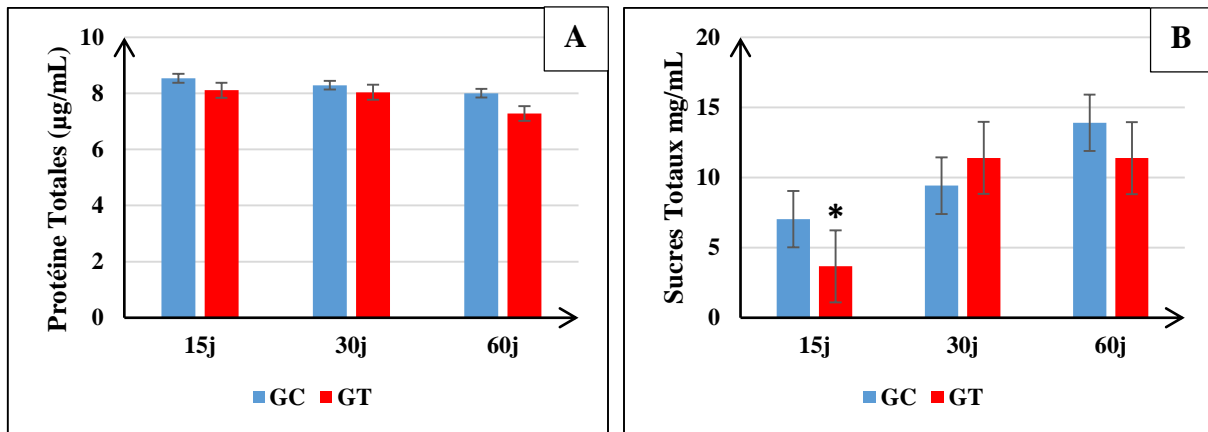


Figure 55 : Effets de la caféine sur les niveaux des protéines totales (A) et les sucres totaux (B) au niveau tissulaire (iléon). * $p < 0.05$ GC vs GT (S1).

L'iléon est un segment de l'intestin où se déroule l'activité de dégradation de différentes molécules en présence d'enzymes digestives et par conséquent une meilleure absorption.

Les glucides et les protéines d'origine endogène présents dans la lumière intestinale chez les rats nouveau-nés sont mal connus. Leur étude s'avère cependant utile, d'une part à cause de leurs fonctions physiologiques et d'autre part pour mieux préciser la digestion, dans les différentes parties de l'intestin, des glucides et des protéines complexes des aliments d'allaitement (lait maternel) (Besle *et al.*, 1983).

Au niveau intestinal, la digestion des protéines est facilitée par des protéases d'origine pancréatique et des peptidases localisées dans les entérocytes. Les protéases pancréatiques sont classiquement subdivisées en endopeptidases (trypsine, chymotrypsine et les élastases) et en exopeptidases (carboxypeptidases A et B) (Le Floc'H et Sève, 2000).

L'absorption des glucides se fait sous forme de monosaccharides. Les polysaccharides doivent donc être scindés en unités avant d'être absorbés. Cela se passe entre le jéjunum et l'iléon proximal (intestin grêle) où des enzymes spécifiques (lactase, sucrase et isomaltase) coupent les molécules qui vont être par la suite absorbées au niveau des entérocytes.

Les teneurs en protéines totales tissulaires montrent une diminution non significative pour les rats traités par rapport aux rats témoins. Tandis que les taux de sucres totaux ont été significativement réduits chez les rats traités (S1).

Cette diminution peut être liée à la stimulation des glandes de la médullosurrénale à sécréter de l'adrénaline, l'adrénaline agit alors sur les cellules comme un antagoniste des

récepteurs de l'adénosine, qui inhibent l'adénylate cyclase, et leur inhibition par la caféine augmente la concentration cellulaire de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc active à son tour des enzymes comme la PKA (Protéine Kinase A) qui phosphoryle des protéines spécifiques ou des enzymes responsables de la lipolyse. Par conséquent, l'AMPc est un intermédiaire essentiel dans la cascade des voies de transduction intracellulaire. Il a de nombreuses fonctions dans les cellules, notamment la régulation du métabolisme de glycogène, des sucres et des lipides (Johnston *et al.*, 2003).

De plus, Sharp et Debnam (1994) ont montré que l'exposition luminale aiguë des entérocytes à la AMPc *in vivo* a des effets stimulateurs sur le transport du sucre à travers la bordure en brosse et la membrane basolatérale, et Debnam et al. a fourni des preuves d'un effet similaire de la AMPc dans la régulation du transport du glucose par le transporteur dépendant du sodium à travers la bordure en brosse rénale isolé du rat (Johnston *et al.*, 2003).

La caféine est également un antagoniste des récepteurs de l'adénosine et peut donc inhiber l'absorption du glucose musculaire (LeBlanc et Soucy, 1994).

Dans une étude réalisée par Jiang *et al.* (2011) sur le profil des protéines pendant le vieillissement des ovocytes porcins et les effets de la caféine sur les modes d'expression des protéines, les chercheurs ont trouvés que le vieillissement physiologique peut être prolongé par la caféine et la majeure partie de l'expression des protéines a été rétablie au niveau normal après le traitement à la caféine.

Les mécanismes par lesquels la caféine affecte les niveaux des glycoprotéines et des glucides au niveau de l'intestin restent obscurs. Des études plus approfondies sont nécessaires pour mieux comprendre ces mécanismes.

4. Effet de la caféine sur le statut oxydatif intestinal

Le stress oxydatif est caractérisé par la perturbation des niveaux des espèces réactives d'oxygène (ERO) dans le noyau cellulaire, soit par élévation, soit par réduction des ERO, perturbant ainsi les voies de signalisation et provoquant des changements oxydatifs des composants cellulaires. La mort cellulaire peut résulter d'une nécrose ou d'une apoptose (Lushchak, 2016).

De nombreux types de cellules dans la muqueuse du tube digestif produisent des ERO dans le cadre de la physiologie normale, mais la muqueuse intestinale est également une cible

de divers oxydants qui peuvent conduire à des conditions pathologiques (Bhattacharyya *et al.*, 2014). Des études ont suggéré que l'interaction de la muqueuse avec les microbes ou leur toxine déclenche un stress oxydatif conduisant à des dommages intestinaux (Ulluwishewa *et al.*, 2011).

Comme première ligne de défense contre le stress oxydatif, la muqueuse intestinale contient un vaste système de défense antioxydants comprenant des enzymes (CAT, SOD, ou GPX) et des charognards endogènes et exogènes non enzymatiques comme le glutathion, les ions transitoires (p. ex., Fe²⁺, Cu²⁺) ou des flavonoïdes (Circu et Aw, 2012 ; Djidel *et al.*, 2018). Le glutathion et le SOD sont des antioxydants intracellulaires, largement répandus dans l'intestin grêle, et leur abondance est plus élevée au cours du développement intestinal (Tang *et al.*, 2019 ; Mishra et Jha, 2019).

L'effet du citrate de caféine sur le stress oxydatif et le système antioxydant intestinal a également été étudié. Les niveaux de biomarqueurs du stress oxydatif mesurés dans les homogénats de l'iléon et du côlon sont présentés dans les tableaux 13, 14, 15 et 16.

4.1. Effet de la caféine sur la teneur en malondialdéhyde (MDA)

Les résultats ont montré que le traitement à la caféine diminuait légèrement les niveaux de la malondialdéhyde (MDA) au niveau de l'iléon et le colon (Tableau 13).

Les résultats de cette enquête ont montré que le traitement à la caféine n'a pas provoqué de dommages oxydatifs dans les lipides des tissus de l'iléon et du côlon. En effet, la production de composés MDA a été réduite dans les groupes traités (0,74 nmol/mg de tissu) par rapport aux groupes témoins (0,98 nmol/mg de tissu) (Tableau 13).

Tableau 13 : Effet de la caféine sur la teneur en MDA dans les homogénats d'iléon et de colon (GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine).

MDA (nmol/mg)	Iléon		P value	Colon		P value
	Moyenne	SD		Moyenne	SD	
S1 (15 J)	GC	0.98	0.75	1.93	1.27	0.85
	GT	0.74		1.73	1.2	
S2 (30 J)	GC	0.58	0.37	0.99	0.2	0.76
	GT	0.46		0.82	0.8	
S3 (60 J)	GC	0.79	0.84	0.73	0.34	0.92
	GT	0.41		0.75	0.09	

* $p < 0.05$ GC vs GT.

Plusieurs études ont montré que la caféine pourrait avoir un rôle protecteur contre les dommages cellulaires (Kamat *et al.*, 2000 ; Krisko *et al.*, 2005). Nikolic *et al.* (2003) ont signalé que la caféine est considérée comme une substance antioxydante ayant des effets bénéfiques en raison de ses métabolites, le 1-méthylxanthine et l'acide 1-méthylurique, qui sont des antioxydants extrêmement efficaces. Ainsi, ces études ont confirmé que la caféine avait des effets antioxydants qui protègent les tissus contre les dommages causés par les radicaux libres par la réduction ou l'élimination des ERO.

Aussi, La prolifération bactérienne intestinale peut également causer des dommages oxydatifs intestinaux (Pérez-Paramo *et al.*, 2000). Toutefois, dans notre étude, nous n'avons pas observé de différences significatives dans les niveaux de MDA intestinale entre les rats traités avec du citrate de caféine et les rats contrôles, ce qui suggère que ce phénomène ne semble pas être le principal mécanisme conduisant à l'augmentation des dommages oxydatifs intestinaux dans ce modèle expérimental.

4.2. Effet de la caféine sur les activités des enzymes Catalase et Superoxyde dismutase

Les résultats de l'effet de la caféine sur les activités de la catalase (CAT) et le superoxyde dismutase (SOD) dans l'iléon et le colon sont présentés dans les tableaux 14 et 15.

Le traitement à la caféine n'a entraîné aucune modification dans de l'activité de l'enzyme CAT dans les tissus de l'iléon et du côlon (Tableau 14 et 15).

Cependant, une augmentation de l'activité enzymatique a été observée dans l'iléon du groupe traité pendant 60 jours (10,12 mM/min/mg) par rapport au groupe témoin (8,73 mM/min/mg). En effet, l'augmentation de l'activité de la catalase était statistiquement significative ($p < 0.05$).

De plus, la SOD était significativement élevée dans l'iléon du groupe traité pendant 15 jours (S1) par rapport à son groupe témoin respectif. Dans le côlon, les taux de SOD ont augmenté dans les groupes traités durant 15 et 30 jours.

Tableau 14 : Effet de la caféine sur les activités des enzymes CAT et SOD dans l'iléon (GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine).

Iléon		CAT (mM/min/mg de protéine)		P value	SOD (U/min/mg de protéine)		P value
		Moyenne	SD		Moyenne	SD	
S1 (15 J)	GC	6.12	1.27	0.29	112	5.58	0.002*
	GT	7.17	0.54		145	5.4	
S2 (30 J)	GC	8.65	1.03	0.57	134	9	0.25
	GT	9.12	0.84		142	2.9	
S3 (60 J)	GC	8.73	0.01	0.0002*	186	31	0.88
	GT	10.12	0.5		183	0.28	

* $p < 0.05$ GC vs GT (CAT : S3 ; SOD : S1).

La dégradation du peroxyde d'hydrogène intracellulaire (H_2O_2) nécessite l'existence de CAT. Elle favorise la dégradation du H_2O_2 en eau (H_2O) et en oxygène tout en évitant la production de radicaux libres.

Alors que les radicaux superoxydes sont démultipliés en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire par l'enzyme SOD (Arslan *et al.*, 2014).

Tableau 15 : Effet de la caféine sur les activités des enzymes CAT et SOD dans le colon (GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine).

Colon		CAT (mM/min/mg de protéine)		P value	SOD (U/min/mg de protéine)		P value
		Moyenne	SD		Moyenne	SD	
S1 (15 J)	GC	6.07	1.02	0.05	203	4.65	0.01*
	GT	8.11	0.5		229	0.18	
S2 (30 J)	GC	7.98	1.14	0.26	146	0.8	0.0009*
	GT	8.99	0.04		152	0.5	
S3 (60 J)	GC	8.56	0.07	0.16	96	1.6	0.27
	GT	9.29	0.59		99	3.02	

* $p < 0.05$ GC vs GT (SOD : S1 et S2).

4.3. Effet de la caféine sur les taux de glutathion réduit tissulaire

Les niveaux de glutathion (GSH) étaient significativement plus élevés (tableau 16) dans les groupes traités par la caféine (75.12 ± 0.32 , 51.98 ± 1.12 U/mg ; $p < 0.05$) par rapport aux groupes témoins (40.82 ± 0.25 , 42.91 ± 0.27 U/mg ; $p < 0.05$) dans l'iléon et le colon, à 15, 30 et 60 jours de traitement, respectivement.

Tableau 16 : Effet de la caféine sur l'activité du GSH dans l'iléon et le colon (GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine).

GSH (U/mg)	Iléon		P value	Colon		P value	
	Moyenne	SD		Moyenne	SD		
S1 (15 J)	GC	40.82	0.25	<0.05*	42.91	0.27	0.003*
	GT	75.12	0.32		51.98	1.12	
S2 (30 J)	GC	39.79	0.68	0.0001*	34.73	4.14	0.04*
	GT	57.67	0.19		43.24	1.87	
S3 (60 J)	GC	51.70	0.49	0.0006*	50.16	0.62	0.008*
	GT	69.74	0.9		55.87	1.34	

* $p < 0.05$ GC vs GT (S1, S2 et S3).

Le glutathion réduit (GSH) est un antioxydant non enzymatique endogène important. Le tripeptide GSH agit comme cofacteur d'autres enzymes ou réagit directement avec les ERO. Il possède une activité antioxydante qui lui est propre. Après avoir réagi avec des ERO, il se transforme en glutathion oxydé (GSSG). Une valeur basse du rapport GSH/GSSG est considérée comme étant un excellent marqueur de la présence d'un stress oxydant (Jones *et al.*, 2002).

Dans le présent travail, nous avons observé que l'administration du citrate de caféine augmentait la concentration de glutathion (Tableau 16). Dans la même lignée, Abreu *et al.* (2011) ont démontré que l'ingestion de la caféine augmentait la concentration de GSH dans le cerveau du rat.

Devasagayam *et al.* (1996) ont étudié l'effet inhibiteur de la caféine en tant qu'antioxydant sur la peroxydation lipidique induite par les espèces réactives d'oxygène. Leur découverte révèle qu'à la concentration millimolaire, la caféine est capable d'inhiber l'effet des radicaux initiateurs de peroxydation lipidique tels que les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$), les radicaux peroxyliques ($\text{ROO}\cdot$) et l'oxygène simple ($^1\text{O}_2$) capables de causer des dommages *in vivo* à la membrane. Les chercheurs suggèrent donc que l'activité de la caféine dans les espèces réactives d'oxygène de récupération est plus élevée que l'acide ascorbique, mais semblable au glutathion (Devasagayam *et al.*, 1996).

Lee *et al.* (2000) ont révélé que la caféine avait une activité antioxydante dépendante de la dose avec une occurrence optimale à 0,16 mol/l et pas à des concentrations inférieures à 0,02 mol/l (concentrations physiologiques). Ils ont également constaté que les propriétés antioxydantes observées dans les concentrations physiologiques étaient liées aux principaux

métabolites de la caféine, comme la 1-méthylxanthine et l'acide 1-méthylurique, comme antioxydants efficaces et potentes (Jamali *et al.*, 2019).

Lv *et al.* (2010) ont signalé que l'administration de caféine chez des rats ayant subi des dommages au foie causés par l'alcool réduisait le niveau de MDA et augmentait la capacité antioxydante hépatique, y compris la superoxyde dismutase (SOD).

Alors que Afify *et al.* (2011) ont comparé l'activité antioxydante des extraits aqueux de différents produits contenant de la caféine. Ou ils ont utilisé l'extrait froid et chaud, et il a été signalé que l'extrait d'eau chaude a montré une activité antioxydante plus élevée en utilisant les méthodes DPPH et ABTS et la méthode de réduction de puissance à 50 et 100 µg/ml.

Demirtas *et al.* (2012) ont étudié l'effet de la caféine sur le mécanisme oxydant-antioxydant du foie de rat, et ont observé que l'administration de caféine à des doses de 30 et 100 mg/kg pendant 14 jours augmente considérablement l'activité de l'antioxydant enzymatique. (SOD, catalase, GPx et GST) tout en diminuant la concentration de malondialdéhyde. Dans une tentative de déterminer la propriété antioxydante des composants du café, Liang et Kitts (2014) ont signalé que le café infusé contient beaucoup de composants actifs incluant la caféine avec une caractéristique antioxydante capable de récupérer les radicaux libres, faire don d'hydrogène et d'électrons, agir comme chélateurs prooxydants à ions métalliques et réduire l'activité de puissance. Cela peut être vu dans la capacité de la caféine à déclencher des tissus et des antioxydants comme le SOD, le GSH et la catalase pendant l'expression des gènes avec la capacité de protéger contre le stress oxydatif (Liang et Kitts 2014).

Cakir *et al.* (2017) ont étudié l'effet protecteur de faibles doses de caféine sur les rats stressants. Le prétraitement et l'administration chronique de caféine a diminué de façon significative l'activité élevée de myéloperoxydase, tandis que l'administration chronique de caféine par réaction d'inhibition diminuait l'augmentation observée dans le malondialdéhyde, la lucigénine et les concentrations d'oxyde nitrique causées par un stress aigu, mais l'inverse a été observé pour le malondialdéhyde et l'oxyde nitrique avec la caféine aiguë (Cakir *et al.*, 2017). De plus, l'administration aiguë de caféine a également réduit l'activité du SOD et amélioré le taux de glutathion et de luminol, tandis que les dommages histologiques causés par l'exposition au stress ont été améliorés par la caféine chronique (Cakir *et al.* 2017).

Sans aucun doute, la caféine a des effets bénéfiques sur les propriétés antioxydantes dans le tractus gastro-intestinal. Il a été rapporté que la principale cible moléculaire des récepteurs de la caféine, l'adénosine qui est engagée dans le contrôle de la génération de ERO, influençant l'origine et l'effet des radicaux libres dans les systèmes neuronaux et autres systèmes biologiques (Abreu *et al.*, 2011 ; Amer *et al.*, 2017).

5. Effet de la caféine sur les niveaux de Nitrite (NO)

La figure 56 illustre l'effet de la caféine sur les niveaux du NO dans l'iléon et le colon des rats témoins et traités par le citrate de caféine sur trois période.

Le dosage du NO dans l'iléon et le colon des rats n'a montré aucune différence significative entre les groupes traités et les groupes contrôles.

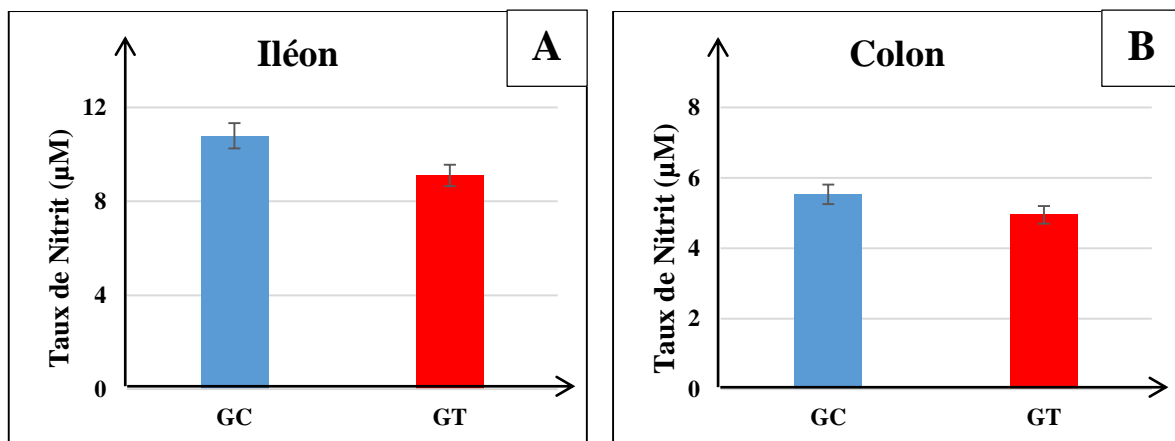


Figure 56 : Variations dans le taux de l'oxyde de nitrite dans l'iléon (A) et le colon (B) chez les rats témoins et traités. GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine.

NO est une importante molécule de signalisation intracellulaire et intercellulaire impliquée dans la régulation de divers mécanismes physiologiques et physiopathologiques. La production de NO basal maintient une perfusion adéquate, régule la perméabilité intestinale et minimise le dysfonctionnement de la barrière muqueuse et microvasculaire après une ischémie intestinale (Quirino *et al.*, 2013).

NO est une petite molécule synthétisée à partir d'arginine par une famille de synthases NO (NOSs) des isoformes endothéliaux et neuronaux (eNOS et nNOS), qui sont exprimés en

continu, et l'isoforme inducible (iNOS), qui est exprimée en réponse à des stimuli inflammatoires, telles cytokines et les lipopolysaccharides bactériens (LPS) (Quirino *et al.*, 2013).

De nombreux types de cellules dans l'intestin sont des sources potentielles de NO ; elles comprennent les cellules endothéliales vasculaires, les neurones myentériques, les cellules inflammatoires dans la sous-muqueuse (macrophages, leucocytes polymorphonucléaires) et les entérocytes (Wallace et Miller, 2000).

NO augmente la sécrétion du mucus gastro-intestinal, module le transport du chlorure épithélial et la sécrétion de liquide associée, maintient le flux sanguin, inhibe l'activité motrice musculaire intestinale, réduit la réactivité des mastocytes et la libération du médiateur, supprime l'agrégation et la séquestration des neutrophiles, récupère les métabolites réactifs de l'oxygène et est un important modulateur de la réparation des muqueuses. Tous ces mécanismes sont impliqués dans le maintien de la fonction de barrière intestinale (Weist et Rath, 2003).

Cependant, le NO, qui est produit en grande quantité sous l'action de la NO synthase inducible (iNOS), a des effets délétères sur les cellules épithéliales intestinales (Coquerel et Tamion, 2010). En revanche, la surproduction de NO s'est révélée nocive pour l'intégrité de l'épithélium intestinal. La perfusion de NO à fortes concentrations provoque des dommages à la muqueuse gastrique chez le rat et diminue la viabilité des cellules épithéliales du côlon du rat (Lopez-Belmonte *et al.*, 1993 ; Tepperman *et al.*, 1993). De plus, il a été démontré que le NO à des concentrations locales élevées dilate directement les jonctions serrées dans les monocouches épithéliales intestinales, perturbe le cytosquelette d'actine, inhibe la formation d'ATP et, par conséquent, augmente la perméabilité intestinale (Salzman *et al.*, 1995 ; Forsythe *et al.*, 2002).

Notre étude montre que l'administration de la caféine n'affecte pas l'activité de la molécule NO au niveau intestinal (Figure 56).

Dans une étude réalisée par Nakayama et Oishi (2013) sur l'influence du café (*Coffea arabica*) et de la consommation de galacto-oligosaccharide (GOS) sur le microbiote intestinal et les réponses de l'hôte, les chercheurs n'ont trouvé aucune différence significative dans l'expression de l'iNOS entre le GOS et le café, suggérant que l'intestin n'a pas généré de NO pendant le traitement du GOS ou du café.

Cependant, dans une autre étude menée par Brandt *et al.* (2019), les chercheurs ont trouvé que l'utilisation d'un régime riche en gras, fructose et cholestérol (FFC) et enrichi en café décaféiné atténué les altérations (perte de protéines de JS et des niveaux élevés d'endotoxine bactérienne dans le plasma) dans les tissus intestinaux associé à l'augmentation des concentrations de protéines iNOS et d'adduits protéiniques 3-NT (nitrotyrosine).

Bruce *et al.* (2002), ont démontré que la caféine entraîne une diminution significative de l'eNOS. Le mécanisme peut être par l'antagonisme des récepteurs de l'adénosine ou en modifiant les niveaux de cGMP (le monophosphate cyclique de guanosine). Aussi, le café décaféiné n'a eu aucun effet sur les concentrations d'eNOS, ce qui donne à penser que la caféine est le principal agent responsable de la diminution de l'eNOS.

6. Effet de la caféine sur la perméabilité intestinale

6.1. Effet de la caféine sur le taux de la D-lactate

La figure (57) représente les valeurs plasmatiques et tissulaires moyennes de la D-lactate dans les groupes témoins et traités par la caféine.

Une réduction des taux de D-lactate a également été observée dans les homogénats d'iléon et de côlon des nouveau-nés traités âgés de 15 et 30 jours. Cependant, aucun changement significatif dans les groupes traités pendant 60 jours n'a été noté (Figure 57.A).

De même, nos résultats ont révélé que le traitement à la caféine à un âge précoce diminuait les concentrations plasmatiques de D-lactate. En fait, les taux de D-lactate ont significativement diminués de 1.76 ± 0.19 à 0.61 ± 0.20 $\mu\text{g/ml}$ dans le sérum sanguin des rats traités âgés de 15 jours ($p < 0.05$) (Figure 57.B).

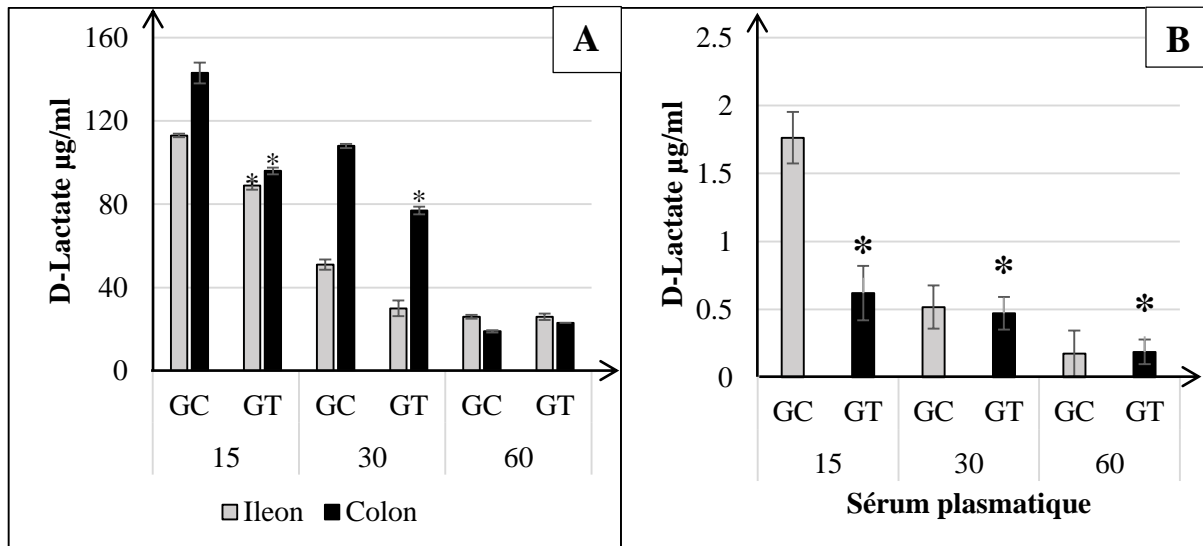


Figure 57 : Taux de la D-lactate dans les homogénats de l'iléon et le côlon (A), et le sérum (B) des rats (moyenne \pm SD) (GC : groupe contrôle ; GT : groupe traité à la caféine).

* $p < 0.05$ GC vs GT (Iléon : S1 ; Colon : S1 et S2 ; Sérum : S1, S2 et S3).

La D-lactate a été proposée comme marqueur circulatoire quantitatif et sensible pour surveiller l'étendue des lésions de la muqueuse intestinale.

Nous avons émis l'hypothèse que l'évaluation du D-lactate pourrait confirmer les phénomènes de translocation bactérienne chez les rats nouveau-nés pendant le traitement à la caféine.

Selon nos résultats, le D-lactate a considérablement diminué pendant l'exposition à la caféine. En fait, chez les nouveau-nés traités âgés de 15 jours, les concentrations de la D-lactate dans le plasma et les homogénats d'iléon et du côlon ont diminué de façon significative ($p < 0,05$) ($1,76 \pm 0,19$, $113 \pm 0,85$ et $143 \pm 5,01$ à $0,61 \pm 0,20$, $89 \pm 1,96$ et $96 \pm 1,65$ µg/ml, respectivement).

Le D (-)-lactate est synthétisé par de nombreuses espèces de bactéries aéro-anaérobies et anaérobies présentes dans le système gastro-intestinal (Murray *et al.*, 1993). La D-lactate plasmatique est le produit final des bactéries indigènes du tractus gastro-intestinal, dont *E. coli*, *Lactobacillus sp.*, *Klebsiella* et *Bacteriodes sp.* de sorte que presque tout le D-lactate apparaissant dans la circulation est dérivé du tractus intestinal. En plus, les mammifères n'ont pas les systèmes enzymatiques nécessaires pour métaboliser le D-lactate rapidement (Sobhian *et al.*, 2012 ; Ng, 2014).

L'augmentation de la concentration de D-lactate dans le sang est souvent causée par une prolifération bactérienne et une perméabilité intestinale élevée, ce qui permet au D-lactate de pénétrer dans la circulation systémique (Sobhian *et al.*, 2012 ; Ng, 2014). En effet, des études antérieures ont signalé une augmentation significative des taux de D-lactate dans le sang en raison de la colonisation bactérienne, d'infections systémiques ou de troubles gastro-intestinaux (Sun *et al.*, 2001).

Comme l'ischémie intestinale cause des lésions muqueuses précoces, les niveaux sériques de D-lactate augmentent à mesure que la barrière muqueuse est perturbée. Les mammifères n'ont pas le système enzymatique nécessaire pour métaboliser le D-lactate, par conséquent, il passe par le foie inchangé et entre dans la circulation périphérique au début du processus pathologique. Le taux plasmatique de D-lactate est donc un indicateur postopératoire utile de l'augmentation de la perméabilité intestinale et du dysfonctionnement de la barrière intestinale chez les patients (Murray *et al.*, 1993 ; Murray *et al.*, 1994).

Pris ensemble, ces résultats confirment l'hypothèse que le traitement à la caféine accélère la maturation intestinale et contrôle la translocation bactérienne chez les rats nouveau-nés, par conséquent la diminution des taux de la D-lactate dans la circulation sanguine.

6.2. Résultats de la mesure de l'expression des protéines des jonctions serrées

Nous avons émis l'hypothèse que le traitement avec la caféine en période néonatale conduirait à une réduction de l'expression des gènes des protéines des jonctions serrées. Pour étudier l'effet de l'administration de caféine, nous avons mesuré l'expression des gènes bien caractérisés ZO-1 et Claudine-1 dans deux segments différents, l'iléon et le côlon.

Comme le montre la figure 58, nous n'avons constaté aucune différence statistique dans l'expression relative du gène Claudine-1 ou du gène ZO-1 entre les groupes dans aucun des segments intestinaux (iléon et colon).

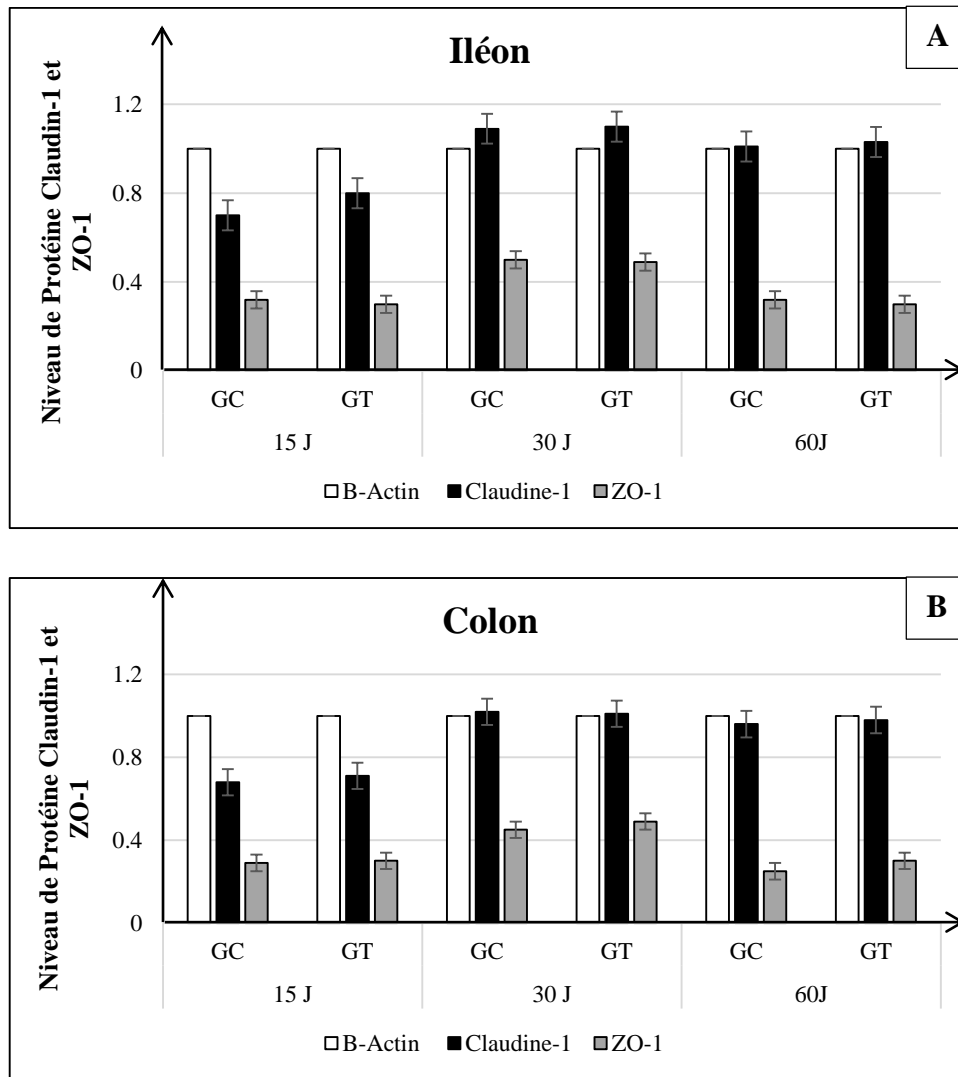


Figure 58 : Niveaux de protéines des jonctions serrées la zonula occludens-1 (ZO-1) et la claudine-1 dans l'iléon (A) et le colon (B) chez les rats témoins (GC) et traités à la caféine. Les taux de protéines ont été normalisés à la β -actine.

La couche épithéliale intestinale forme une barrière importante qui protège les tissus sous-jacents des bactéries dans la lumière intestinale. Cette monocouche est composée de cellules épithéliales qui sont reliées par des jonctions intercellulaires : des jonctions serrées, situées dans la partie apicale des cellules, sont ensuite suivies par des jonctions et desmosomes adhérents.

La perméabilité de l'épithélium intestinal varie le long de son tractus et dépend de la composition et de l'abondance des différents composants des jonctions serrées.

Les jonctions serrées sont constituées de protéines transmembranaires comme les occludines, les claudins, les molécules d'adhésion jonctionnelle, la tricelluline et les protéines

d'échafaudage intracellulaire, comme les protéines zonula occludens (ZO) ZO-1, -2 et -3 (Wells *et al.*, 2017). Les jonctions adhérentes assurent l'adhésion cellule-cellule principalement par E-cadhérine.

Ces structures sont très dynamiques, car elles répondent à des stimuli qui peuvent les stabiliser ou les déstabiliser (Wells *et al.*, 2017). Les cytokines pro-inflammatoires activent les voies de signalisation qui peuvent perturber les jonctions cellulaires par internalisation ou protéolyse des molécules de jonction. Les jonctions sont donc déconnectées du cytosquelette d'actine, ce qui augmente la perméabilité intestinale, la translocation des bactéries, des toxines et de l'antigène et, finalement, l'inflammation (Schnoor, 2015).

Dans la présente étude nous avons mesuré l'expression de deux gènes des jonctions serrées agissant sur la perméabilité intestinale, à savoir, Claudine-1 et Zonula Occludens-1.

Volynets *et al.* ont constatés que l'analyse d'une seule molécule de jonction serrée, comme ZO-1, pourrait être suffisante et représentative pour l'ensemble de la grappe de molécules de jonction serrée. En outre, ZO-1 est un type de joueur maître dans le complexe de jonction étroite, parce que la protéine cytoplasmique ZO-1 est exprimé de façon omniprésente dans toutes les jonctions serrées et se lie directement aux queues cytoplasmiques des claudines (Collas *et al.*, 1999) et de l'occludine (Furuse *et al.*, 1994 ; Kimura *et al.*, 1996 ; Volynets *et al.*, 2016).

En résumé, l'analyse n'a montré aucune différence significative dans l'expression relative de Claudine-1 ou ZO-1 dans l'intestin grêle (iléon) et le colon entre les groupes témoins et les groupes traités par la caféine. La caféine n'affecte pas l'expression des protéines des jonctions serrées et donc n'affecte pas négativement la perméabilité intestinale.

En consistance avec nos résultats, Chen *et al.* ont démontré dans leur étude que l'administration de la caféine empêche les niveaux d'expression des protéines de jonction serrée de diminuer dans un modèle de lapin atteint de la maladie d'Alzheimer, en fait la caféine protégé ces animaux contre la rupture de la barrière hématoencéphalique (Chen *et al.*, 2008).

Dans une autre étude menée par les mêmes chercheurs, ils ont trouvé que la caféine induit des diminutions des niveaux des protéines de jonction serrée l'occludine, la claudine-1 et la ZO-1 chez les lapins nourris au cholestérol (Chen *et al.*, 2007).

*Conclusion générale et
perspectives*

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué les effets gastro-intestinaux du citrate de caféine administré à des rats en période néonatale, à savoir : l'effet sur l'implantation du microbiote intestinal (dans l'iléon et le colon), sur la perméabilité intestinale (la translocation bactérienne, le taux de la D-lactate et l'expression des protéines des JS), l'effet sur la motilité gastro-intestinale et les différents marqueurs biochimiques, et enfin l'effet sur le stress oxydant intestinal.

Les résultats de cette recherche ont révélé un lien potentiel entre l'administration du citrate de caféine et les changements gastro-intestinaux chez les rats nouveau-nés.

Nous avons observé que l'administration du citrate de caféine n'a pas affecté la cinétique d'implantation du microbiote intestinal dans l'iléon et le colon. Néanmoins, une légère diminution dans le nombre des entérobactéries et des lactobacilles a été observée. Cependant, cette réduction n'était pas statistiquement significative.

De plus, le citrate de caféine a amélioré la perméabilité gastro-intestinale grâce à la maturation de la barrière intestinale des nouveau-nés dans cette période fragile. En effet, elle a pu diminuer la translocation bactérienne vers les organes systémiques (MLNs, foie, rate et thymus), et réduire les niveaux de la D-lactate dans le système sanguin et au niveau des intestins.

Aussi, l'administration de la caféine n'a pas modifié l'expression des protéines des jonctions serrées Claudine-1 et Zonula Occludens-1 (ZO-1) dans l'iléon et le colon des groupes traités. Par contre une légère augmentation de l'expression des gènes a été observée, confirmant ainsi que la caféine a contribué à la maturation de la barrière intestinale.

Ensuite, nous avons évalué l'effet de la caféine sur la motilité gastro-intestinale en utilisant un modèle impliquant du lait BaSO₄ (BSM). Nos résultats ont montré que la motilité n'a pas été influencée suite à l'administration de la caféine.

D'autres marqueurs biochimiques sanguins ont été mesurés durant cette étude. Les taux des paramètres lipidiques (triglycérides et le cholestérol total) sont réduits alors que les concentrations des enzymes hépatiques (AST et ALT) s'avèrent élevés dans les groupes traités.

De plus, Les activités de la phosphatase alcaline intestinale et le lactate déshydrogénase tissulaires (iléon) n'ont pas été modifiés suite à l'administration de la caféine.

Enfin, la caféine a présenté une propriété protectrice contre le stress oxydatif intestinal chez les rats nouveau-nés. En effet, caféine est considérée comme une substance antioxydante ayant des effets bénéfiques grâce à ses métabolites.

Pris ensemble, ces résultats confirment l'hypothèse que l'administration du citrate de caféine n'affecte pas négativement la fonction gastro-intestinale. Par contre, la caféine a amélioré la perméabilité gastro-intestinale, elle a accéléré la maturation et l'intégrité de la barrière intestinale en cette période fragile.

Ce travail nous a permis d'aboutir à une nouvelle information destinée principalement au cliniciens pédiatres sur l'absence de risque du traitement à la caféine à des doses précises pour les nouveau-nés souffrant de pathologies respiratoires.

Comme la caféine pour l'apnée de la prématurité (AOP) a été qualifiée de « réussite » dans la recherche néonatale, l'Organisation mondiale de la Santé a inclus le citrate de caféine dans sa liste de médicaments essentiels « administrés au nouveau-né ».

Cette molécule se présente encore comme une substance très intéressante pour la recherche pharmacologique et la chimie médicinale.

D'autres études sont nécessaires pour renforcer les résultats que nous avons obtenues et de fournir plus d'informations cliniques pertinentes.

L'étude du microbiote intestinal peut être renforcé par des techniques plus évolués : comme par exemple, le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S ou bien la spectrométrie de masse MALDI-TOF, car la microflore intestinale est difficile à étudier. Seul un nombre limité de bactéries peut être détecté à l'aide de techniques de culture conventionnelles utilisés dans notre étude.

De plus, d'autres biomarqueurs pourraient être mesurés. Par exemple, la diamine oxydase pour évaluer la quantité de lésions muqueuses et fournir donc une mesure indirecte de la perméabilité intestinale. La résistance électrique trans-épithéliale en utilisant la Chambre de Ussing, comme marqueur de la perméabilité intestinale.

Enfin, nos résultats préliminaires pourraient ouvrir de nouvelles perspectives en gastroentérologie pédiatrique et appuyer l'ajout du citrate de caféine aux unités de soins intensifs néonataux dans nos hôpitaux.

Références Bibliographiques

A

- Abdel-Hady, H., Nasef, N., & Abd Elazeez Shabaan, I. N. (2015). Caffeine therapy in preterm infants. *World journal of clinical pediatrics*, 4(4), 81.
- Abreu M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 10, 131-144.
- Abreu, M.T., Fukata, M., Arditi, M. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol*. 174: 4453–4460.
- Abreu, R. V., Silva-Oliveira, E. M., Moraes, M. F. D., Pereira, G. S., & Moraes-Santos, T. (2011). Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 99(4), 659-664.
- Abu-Shaweesh, J.M., Martin, R.J., 2017. Caffeine use in the neonatal intensive care unit. *Semin. Fetal Neonatal Med*. 22, 342–347.
- Aebi, Hugo. "[13] Catalase in vitro." *Methods in enzymology* 105 (1984): 121-126.
- Afify, A. E. M. M., Shalaby, E. A., & El-Beltagi, H. S. (2011). Antioxidant activity of aqueous extracts of different caffeine products. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(20), 5071-5078.
- Albenberg, L. G., & Wu, G. D. (2014). Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology*, 146(6), 1564-1572.
- Aldridge, A., Aranda, J. V., & Neims, A. H. (1979). Caffeine metabolism in the newborn. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 25(4), 447-453.
- Alfaro, T. M.; Monteiro, R. A.; Cunha, R. A.; Cordeiro, C. R. Chronic Coffee Consumption and Respiratory Disease: A Systematic Review. *Clin. Respir. J*. 2018, 12 (3), 1283-1294.
- Alhersh, E., Abushanab, D., Al-Shaibi, S., & Al-Badriyeh, D. (2020). Caffeine for the treatment of apnea in the neonatal intensive care unit: a systematic overview of meta-analyses. *Pediatric Drugs*, 22(4), 399-408.
- Alikaridis F (1987) Natural constituents of Ilex species. *J Ethnopharmacol* 20: 121–44.
- Al-Janabi, A. A. H. S. (2011). Potential activity of the purine compounds caffeine and aminophylline on bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(2), 133.
- Almeida AAP, Farah A, Silva DA, et al. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006; 54: (23), 8738-8743.
- Amadi BA, Agomuo EN, & Duru MKC. Toxicological studies of *Asmina triloba* leaves on haematology, liver, kidney using rat model. *International Science Research Journal*. 2013; 4(2): 11-17.
- American college of laboratory, laboratory Animal Medicine, third edition 2015.

- Anderson, J. & Van Itallie, C. (1995). Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 269 (4): G467-G475.
- Anderson, J. M. (2001). Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *Physiology*, 16(3), 126-130.
- Animal Research Review Panel, Guideline 20: Guidelines for the Housing of rats in Scientific Institutions, Janvier 2008.
- Aranda, J. V., & Beharry, K. D. (2020, December). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism of caffeine in newborns. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 25, No. 6, p. 101183). WB Saunders.
- Aranda, J. V., Beharry, K., Valencia, G. B., Natarajan, G., & Davis, J. (2010). Caffeine impact on neonatal morbidities. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 23(sup3), 20-23.
- Aranda, J. V., Collinge, J. M., Zinman, R., & Watters, G. (1979b). Maturation of caffeine elimination in infancy. *Archives of Disease in Childhood*, 54(12), 946-949.
- Aranda, J. V., Cook, C. E., Gorman, W., Collinge, J. M., Loughnan, P. M., Outerbridge, E. W., ... & Neims, A. H. (1979a). Pharmacokinetic profile of caffeine in the premature newborn infant with apnea. *The Journal of pediatrics*, 94(4), 663-668.
- Arnaud MJ (1976) Identification, kinetic and quantitative study of [2-14C] and [1- Me-14C] caffeine metabolites in rat's urine by chromatographic separations. *Biochem Med* 16:67-76.
- Arnaud MJ (1993) Metabolism of caffeine and other components of coffee, in *Caffeine, Coffee and Health* (Garattini S ed) pp 43-95, Raven Press, New York.
- Arnaud, M. J. (2011). Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. In *Methylxanthines* (pp. 33-91). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeke, J., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J. & Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504 (7480): 451-455.
- Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M., & Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in immunology*, 5, 427.
- Arslan A, Demir H, Ozbay M and Arslan H, "Evaluation of Lipid Peroxidation and Some Antioxidant Activities in Patients with Primary and Metastatic Liver Cancer," *Journal of Cancer Therapy*. 2014; 5 (2): 192-197.
- Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008 ; 8(6) :411-420.
- Astrup, A. (2000). Thermogenic drugs as a strategy for treatment of obesity. *Endocrine*, 13(2), 207-212.

B

- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenberg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920.
- Baird TM. Clinical correlates, natural history and outcome of neonatal apnoea. *Semin Neonatol.* 2004 ; 9: 205-11.
- Barandouzi ZA, Lee J, Maas K, Starkweather AR, & Cong XS. Altered Gut Microbiota in Irritable Bowel Syndrome and Its Association with Food Components. *Journal of personalized medicine.* 2021 ; 11(1), 35.
- Basso D., Fabris C., Plebani M., Del Favero G., Muraca M., Vilei M. T., Panozzo M. P., Meggiato T., Fogar P., Burlina A., Naccarato R., 1992. Alterations in bilirubin metabolism during extra-and intrahepatic cholestasis. *The clinical investigator*, 70(1): 49-54.
- Beharry, K. D., Cai, C. L., Soontarapornchai, K., Ahmad, T., Valencia, G. B., & Aranda, J. V. (2018). Intermittent hypoxia alters dose dependent caffeine effects on renal prostanoids and receptors in neonatal rats. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 134, 57-65.
- Bensakhria, A. (2018). Le stress oxydatif. *Toxicologie générale*, 70-86.
- Béraud M. The technician biological analyzes theoretical and practical guide. TeDc Lavoisier. 2001; 988-990.
- Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in microbiology.* 1995; 3(4): 149-154.
- Bernalier-Donadille, A. (2010). Activités métaboliques du microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34(4), 17-23.
- Besle, J. M., Pougheon, M., Bayle, E., & Thivend, P. (1983). Etude des glucides totaux et des glycoprotéines endogènes des contenus intestinaux chez le veau préruminant. *Reproduction Nutrition Développement*, 23(1), 25-39.
- Bhattacharjee, R., & Lava Kumar, P. (2007). Cacao. In *Technical crops* (pp. 127-142). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*, 94(2), 329-354.
- Biology of microorganisms, Brock, Pearson Eds (12ème édition, 2009), pp 817.
- Birkett DJ and Miners JO (1991) Caffeine renal clearance and urine caffeine concentrations during steady state dosing. Implications for monitoring caffeine intake during sports events. *Br J Clin Pharmacol* 31:405–408.
- Birkner E, Grucka-Mamczar E, Żwirska-Korczała K, et al. Influence of sodium fluoride and caffeine on the kidney function and free radical processes in that organ in adult rats. *Biological trace element research.* 2006; 109(1): 35-47.

- Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M., ... & Wells, J. M. (2014). Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. *BMC gastroenterology*, *14*(1), 1-25.
- Bjorksten, B., Naaber, P., Sepp, E., & Mikelsaar, M. (1999). The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and Experimental Allergy*, *29*(3), 342-346.
- Blakey, J. L., Lubitz, L., Barnes, G. L., Bishop, R. F., Campbell, N. T., & Gillam, G. L. (1982). Development of gut colonisation in pre-term neonates. *Journal of medical microbiology*, *15*(4), 519-529.
- Blanchard, J., & Sawers, S. J. A. (1983). The absolute bioavailability of caffeine in man. *European journal of clinical pharmacology*, *24*(1), 93-98.
- Bloemendaal, A. L. A., Buchs, N. C., George, B. D., & Guy, R. J. 2016. Intestinal stem cells and intestinal homeostasis in health and in inflammation: a review. *Surgery*.*159* (5): 1237-1248.
- Boekschoten MV, Schouten EG, Katan MB. Coffee bean extracts rich and poor in Kahweol both give rise to elevation of liver enzymes in healthy volunteers. *Nutr J*. 2004; *3*(1):7.
- Bode, A. M., & Dong, Z. (2007). The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer letters*, *247*(1), 26-39.
- Bonati M, Latini R, Galletti F, Young JF, Tognoni G, and Garattini S (1982) Caffeine disposition after oral doses. *Clin Pharmacol Ther* *32*:98–106.
- Bonati M, Latini R, Tognoni G, Young JF, and Garattini S (1984–1985). Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat, and mouse. *Drug Metab Rev* *15*:1355–1383.
- Bonati, M., & Garattini, S. (1988). Pharmacokinetics of caffeine. *ISI Atlas of Science: Pharmacology*, *2*(1), 33-39.
- Bonnemaison, E., Lanotte, P. H., Cantagrel, S., Thionois, S., Quentin, R., Chamboux, C., & Laugier, J. (2003). Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. *Neonatology*, *84*(4), 304-310.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry*. *7*: 248-254.
- Brandt, A., Nier, A., Jin, C. J., Baumann, A., Jung, F., Ribas, V., ... & Bergheim, I. (2019). Consumption of decaffeinated coffee protects against the development of early non-alcoholic steatohepatitis: Role of intestinal barrier function. *Redox biology*, *21*, 101092.
- Brown, N. J., Ryder, D., & Nadeau, J. (1993). Caffeine attenuates the renal vascular response to angiotensin II infusion. *Hypertension*, *22*(6), 847-852.
- Bruce, C., Yates, D. H., & Thomas, P. S. (2002). Caffeine decreases exhaled nitric oxide. *Thorax*, *57*(4), 361-363.

Bruschettini, M., Brattström, P., Russo, C., Onland, W., Davis, P. G., & Soll, R. (2021). Caffeine dosing regimens in preterm infants with or at risk for apnea of prematurity. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).

Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 25(3), 287-299.

Butel, M. J., Suau, A., Campeotto, F., Magne, F., Aires, J., Ferraris, L., ... & Dupont, C. (2007). Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 44(5), 577-582.

C

Caglayan F, Caglayan O, Gunel E, Elcuman Y, Cakmak M (2002) Intestinal ischemia reperfusion and plasma enzyme levels. *Pediatr Surg Int* 18:255–257

Cai W, Ran Y, Li Y, Wang B, & Zhou L. Intestinal microbiome and permeability in patients with autoimmune hepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2017; 31(6), 669-673.

Cakir, O. K., Ellek, N., Salehin, N., Hamamcı, R., Keleş, H., Kayalı, D. G., ... & Özbeyli, D. (2017). Protective effect of low dose caffeine on psychological stress and cognitive function. *Physiology & behavior*, 168, 1-10.

Caliborne AL. Assay of catalase. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of Oxygen Radical Research*. Florida: CRC Press; 1985: 196–201.

Callahan MM, Robertson RS, Arnaud MJ, Branfman AR, McComish MF, and Yesair DW (1982) Human metabolism of [1-methyl-14C]- and [2-14C]caffeine after oral administration. *Drug Metab Dispos* 10:417–423.

Caravan, I., Sevastre Berghian, A., Moldovan, R., Decea, N., Orasan, R., & Filip, G. A. (2016). Modulatory effects of caffeine on oxidative stress and anxiety-like behavior in ovariectomized rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(9), 961-972.

Carmody, J. B., Harer, M. W., Denotti, A. R., Swanson, J. R., & Charlton, J. R. (2016). Caffeine exposure and risk of acute kidney injury in a retrospective cohort of very low birth weight neonates. *The Journal of pediatrics*, 172, 63-68.

CCPA, manuel pour le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, vol.1 ,2^{ème} édition ,1993.

Cecek, A.A., Binek, M., 2017. Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. *Pol. J. Vet. Sci.* 17, 385–394.

Celi, P., Cowieson, A.J., Fru-Nji, F., Steinert, R.E., Klünter, A.M., Verlhac, V., 2017. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 234, 88–100.

Celi, P., Verlhac, V., Calvo, E. P., Schmeisser, J., & Klünter, A. M. (2019). Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology*, 250, 9-31.

- Cellai, L.; Carvalho, K.; Faivre, E.; Deleau, A.; Vieau, D.; Buée, L.; Blum, D.; Mériaux, C.; Gomez-Murcia, V. The Adenosinergic Signaling: A Complex but Promising Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 2018, 12, 520.
- Chen, X., Gawryluk, J. W., Wagener, J. F., Ghribi, O., & Geiger, J. D. (2008). Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*, 5(1), 1-14.
- Chen, X., Ghribi, O., & Geiger, J. D. (2007). Stabilization of blood-brain barrier by caffeine in cholesterol-fed rabbits.
- Chirido, F. G., Millington, O. R., Beacock-Sharp, H., & Mowat, A. M. (2005). Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *European journal of immunology*, 35(6), 1831-1840.
- Chiva M, Guarner C, Peralta C, et al. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *European journal of gastroenterology & hepatology.* 2003; 15(2): 145-150.
- Christl, S. U., Murgatroyd, P. R., Gibson, G. R., & Cummings, J. H. (1992). Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology*, 102(4), 1269-1277.
- Chu, F. F., Esworthy, R. S., & Doroshov, J. H. (2004). Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(12), 1481-1495.
- Chu, V. T., Beller, A., Rausch, S., Strandmark, J., Zänker, M., Arbach, O., Kruglov, A. & Berek, C. (2014). Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity*, 40 (4): 582-593.
- Chvasta TE and Cooke AR (1971) Emptying and absorption of caffeine from the human stomach. *Gastroenterology* 61:838–843.
- Cibik, R., Marcille, F., Corthier, G., & Dore, J. (2004). La flore intestinale: mise en place, description et influence du mode d'alimentation. *Archives de pédiatrie*, 6(11), 573-575.
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2012, September). Intestinal redox biology and oxidative stress. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 23, No. 7, pp. 729-737). Academic Press.
- Clément, B. J., Lebreton, C., Malamut, G., & Cerf-Bensussan, N. (2015). Perméabilité intestinale et maladie cœliaque. *Médecine des maladies Métaboliques*, 9(1), 19-26.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258-1270.
- Collas, P., Le Guellec, K., & Taskén, K. (1999). The A-kinase–anchoring protein AKAP95 is a multivalent protein with a key role in chromatin condensation at mitosis. *The Journal of cell biology*, 147(6), 1167-1180.
- Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 735-742.

Comer, A. M., Perry, C. M., & Figgitt, D. P. (2001). Caffeine citrate. *Paediatric drugs*, 3(1), 61-79.

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.

Coquerel, D., & Tamion, F. (2010). Impact intestinal du choc septique. *Réanimation*, 19(2), 134-141.

Corthier, G. (2007). Flore intestinale et santé: quels enjeux?. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21(2), 76-80.

Cristol, J. P., Guérin, M. C., & Torreilles, J. (1994). Mesure du monoxyde d'azote et systèmes biologiques. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie*, 317(6), 549-560.

Cui, W. Q., Wang, S. T., Pan, D., Chang, B., & Sang, L. X. (2020). Caffeine and its main targets of colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12(2), 149.

Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(6), 443-459.

D

da Silva, L. A., Wouk, J., Weber, V. M., Eltchechem, C. D. L., de Almeida, P., Martins, J. C. L., ... & Osiecki, R. (2017). Mechanisms and biological effects of caffeine on substrate metabolism homeostasis: a systematic review. *J Appl Pharm Sci*, 7(06), 215-21.d

Da Silva, R. S. Caffeine. In *Reproductive and Developmental Toxicology*; Gupta, R. C., Ed.; Elsevier Inc., 2011; pp 355-364.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 52(4), 601-623.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*, 329(1-2), 23-38.

Dani, C., Bertini, G., Reali, M. F., Tronchin, M., Wiechmann, L., Martelli, E., & Rubaltelli, F. F. (2000). Brain hemodynamic changes in preterm infants after maintenance dose caffeine and aminophylline treatment. *Neonatology*, 78(1), 27-32.

Davies-Strickleton, H., Cook, J., Hannam, S., Bennett, R., Gibbs, A., Edwards, D., ... & Cook, D. (2020). Assessment of the nail penetration of antifungal agents, with different physico-chemical properties. *Plos one*, 15(2), e0229414.

De Barboza, G. D., Guizzardi, S., Moine, L., & de Talamoni, N. T. (2017). Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption. *World journal of gastroenterology*, 23(16), 2841.

Debry, G. (1993). *Le café et la santé*. John Libbey Eurotext.

Deitch, E. A., Rutan, R., & Waymack, J. P. (1996). Trauma, shock, and gut translocation. *New horizons (Baltimore, Md.)*, 4(2), 289-299.

DEMİRTAŞ, C., OFLUOĞLU DEMİR, F. E., Hussein, A., & PAŞAOĞLU, H. (2012). Effects of caffeine on oxidant-antioxidant mechanisms in the rat liver. *Gazi Medical Journal*, 23(1), 13-18.

Deplancke, B. & Gaskins, H. R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American journal of clinical nutrition*, 73 (6): 1131S-1141S.

Derry, C. J.; Derry, S.; Moore, R. A. Caffeine as an Analgesic Adjuvant for Acute Pain in Adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014, 2017 (10), CD009281.

Détermination quantitative de lactate déshydrogénase (LDH). IVD SPINREACT,S.A./S.A.U Ctra.Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) Espagne.

Détermination quantitative de phosphatase alcaline (FAL). IVD SPINREACT,S.A./S.A.U Ctra.Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) Espagne.

Devasagayam, T. P. A., Kamat, J. P., Mohan, H., & Kesavan, P. C. (1996). Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1282(1), 63-70.

Dianzani MU, Muzio G, Biocca ME, et al. Lipid peroxidation in fatty liver induced by caffeine in rats. *International journal of tissue reactions*. 1991; 13(2) : 79.

Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005. The digestive system: challenges and opportunities. *J. Appl. Poult. Res.* 13, 86–93.

Dietert, R.R., Silbergeld, E.K., 2015. Biomarkers for the 21st century: listening to the microbiome. *Toxicol. Sci.* 144, 208–216.

Dillet Anne-Laure (2010). Des besoins d'usage quotidien au service de la cosmétologie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Nantes.

Ding J, & Zhang Y. Associations of coffee consumption with the circulating level of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. A meta-analysis of observational studies. *Journal of the American College of Nutrition*. 2021; 40(3), 261-272.

Djeffal Assia, 2013/2014. Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate « méthomyl » chez le rat Wistar : Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle. Option : biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar-Annaba

Djidel S, Bouaziz A, Bentehar A, et al. Effect of methanol extract prepared from leaf of Pistacia lentiscus on plasma antioxidant activity and biomarkers of oxidative stress in liver tissue of healthy rats. *Annual Research & Review in Biology*. 2018: 1-10.

Duangjai, A., Suphrom, N., Wungrath, J., Ontawong, A., Nuengchamnon, N., & Yosboonruang, A. (2016). Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integrative medicine research*, 5(4), 324-331.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

Duffy LC. Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine. *The Journal of nutrition*. 2000; 130(2): 432S-436S.

E

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., ... & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635-1638.

Eichenwald, E. C. Apnea of Prematurity. *Pediatrics* 2016, 137 (1), No. e20153757.

Emmanuel A, Majesty D, Benjamin A, et al. Effect of caffeine on some selected biochemical parameters using rat model. *Advances in Biology*. 2017.

Endesfelder, S., Strauß, E., Bendix, I., Schmitz, T., & Bühner, C. (2020). Prevention of oxygen-induced inflammatory lung injury by caffeine in neonatal rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.

Engelhardt, G. (1996). Effect of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and a combination of these substances on the renal prostaglandin E₂, 6-keto-prostaglandin F₁ alpha, water, creatinine and electrolyte excretion of the rat. *Arzneimittel-forschung*, 46(5), 509-512.

Eriksson, M., Bennett, R., Nord, C. E., & Zetterstrom, R. (1986). Fecal bacterial microflora of newborn infant during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 5, 533-539.

Eskelinen, M. H.; Ngandu, T.; Tuomilehto, J.; Soininen, H.; Kivipelto, M. Midlife Coffee and Tea Drinking and the Risk of LateLife Dementia: A Population-Based CAIDE Study. *J. Alzheimer's Dis*. 2009, 16 (1), 85-91.

Evans, J. C. (1992). *Tea in China: The history of China's national drink* (Vol. 33). Praeger.

F

Falcao, A. C., de Gatta, M. M., Iribarnegaray, M. F., Buelga, D. S., García, M. J., Dominguez-Gil, A., & Lanao, J. M. (1997). Population pharmacokinetics of caffeine in premature neonates. *European journal of clinical pharmacology*, 52(3), 211-217.

Farhana A, Lappin SL. Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. [Updated 2021 May 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/>

Faudone, G., Arifi, S., & Merk, D. (2021). The medicinal chemistry of caffeine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(11), 7156-7178.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.

- Favier, A. (2006, November). Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 390-396). Elsevier Masson.
- Fischer, E. (1895). Ber Dtsch. Chem. Ges. 1893, 26, 2400-2412.(b) Fischer, E. *Ber Dtsch. Chem. Ges*, 28, 1145-1167.
- Fischer, E. (1897). Ueber die Constitution des Caffeïns, Xanthins, Hypoxanthins und verwandter Basen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 30(1), 549-559.
- Fleming, A. M., & Burrows, C. J. (2020). On the irrelevancy of hydroxyl radical to DNA damage from oxidative stress and implications for epigenetics. *Chemical Society Reviews*, 49(18), 6524-6528.
- Fong, L., Hotson, A., Powderly, J. D., Sznol, M., Heist, R. S., Choueiri, T. K., ... & Miller, R. A. (2020). Adenosine 2A receptor blockade as an immunotherapy for treatment-refractory renal cell cancer. *Cancer discovery*, 10(1), 40-53.
- Forsythe, R. M., Xu, D. Z., Lu, Q., & Deitch, E. A. (2002). Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion. *Shock*, 17(3), 180-184.
- Franchi, J., Pellicier, F., André, P., & Schnebert, S. (2003). L'adipocyte dans une histoire d'amincissant. *Pathologie Biologie*, 51(5), 244-247.
- Franz Eugen Köhler, (1883 - 1914). Illustration de COFFEA arabica L. 106 (Coffea arabica L., café arabe) Plantes médicinales de Köhler en illustrations réalistes avec de brefs textes explicatifs : Atlas sur la Pharmacopoea germanica.
- Franz Eugen Köhler, Köhler's Medizinal-Pflanzen (1897).
- Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, and Zvartau EE (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51:83–133.
- Fried PA & O'Connell CM. A comparison of the effects of prenatal exposure to tobacco, alcohol, cannabis and caffeine on birth size and subsequent growth. *Neurotoxicology and teratology*. 1987 ; 9(2) : 79-85.
- Frischknecht, P. M., Ulmer-Dufek, J., & Baumann, T. W. (1986). Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: expression of an optimal defence strategy?. *Phytochemistry*, 25(3), 613-616.
- Fujino Y, Suzuki Y, Kakinoki K, Tanioka Y, Ku Y, Kuroda Y (2003) Protection against experimental small intestinal ischaemia–reperfusion injury with oxygenated perfluorochemical. *Br J Surg* 90:1015–1020
- 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. *The Journal of cell biology*, 127(6), 1617-1626.

G

- Garcia, Yngo J., Antonio J. Rodríguez-Malaver, and Nancy Peñaloza. "Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices." *Journal of neuroscience methods* 144.1 (2005): 127-135.
- Garriga, C., Hunter, R.R., Amat, C., Planas, J.M., Mitchell, M.A., 2006. Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. *Am. J. Reg. Inter. Comp. Physiol.* 290, R195–R201.
- Gaul, J., & Donegan, K. (2015). Caffeine and its effect on bacteria growth. *The Journal of Biological Sciences, 1*, 4-8.
- Genser, L., Poitou, C., Brot-Laroche, É., Rousset, M., Vaillant, J. C., Clément, K., ... & Leturque, A. (2016). L'altération de la perméabilité intestinale: chaînon manquant entre dysbiose et inflammation au cours de l'obésité?. *médecine/sciences*, 32(5), 461-469.
- Gewolb, I. H., Schwalbe, R. S., Taciak, V. L., Harrison, T. S., & Panigrahi, P. (1999). Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 80(3), F167-F173.
- Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature medicine*, 24(4), 392-400.
- Gillot, I., Gouyon, J. B., & Guignard, J. P. (1990). Renal effects of caffeine in preterm infants. *Neonatology*, 58(3), 133-136.
- Goldberg, R. F., Austen, W. G., Zhang, X., Munene, G., Mostafa, G., Biswas, S., ... & Hodin, R. A. (2008). Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9), 3551-3556.
- Gu L, Gonzalez FJ, Kalow W, and Tang BK (1992). Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics* 2:73–77.

H

- Ha HR, Chen J, Krahenbuhl S, and Follath F (1996). Biotransformation of caffeine by cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Eur J Clin Pharmacol* 49:309–315.
- Hadis U, Wahl B, Schulz O, et al. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 2011;34:237-46.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Haler, P. N. G. (2013). *Le café: les effets bénéfiques et néfastes sur la santé* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

Hall, J. A., Bouladoux, N., Sun, C. M., Wohlfert, E. A., Blank, R. B., Zhu, Q., Grigg, M. E., Berzofsky, J. A. & Belkaid, Y. (2008). Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity*, 29 (4): 637-649.

Hall, M. A., Cole, C. B., Smith, S. L., Fuller, R., & Rolles, C. J. (1990). Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Archives of Disease in Childhood*, 65(2), 185-188.

Halliwell, B. B., & Poulsen, H. E. (2006). Oxidative stress. In *Cigarette smoke and oxidative stress* (pp. 1-4). Springer, Berlin, Heidelberg.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford.

Handayani DR, Pratama AG N, & Putra IWA. Effect of Ethanol Extract of Robusta Coffee (*Coffea canephora*) on the Function of the Liver and Kidney of Wistar Rat. In 12th Annual Scientific Meeting, Medical Faculty, Universitas Jenderal Achmad Yani, International Symposium on "Emergency Preparedness and Disaster Response during COVID 19 Pandemic"(ASMC 2021)) (pp. 67-71). Atlantis Press.

Harvei, S. (2016). *Coffee intake and the effects on intestinal inflammation, metabolic homeostasis and intestinal barrier function in mice* (Master's thesis, Norwegian University of Life Sciences, Ås).

Henderson-Smart, D. J.; De Paoli, A. G.; Haughton, D. Methylxanthine Treatment for Apnoea in Preterm Infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2010, 2010 (12), CD000140.

Hinds, T. S., West, W. L., Knight, E. M., & Harland, B. F. (1996). The effect of caffeine on pregnancy outcome variables. *Nutrition reviews*, 54(7), 203-207.

Honda, K. & Littman, D. R. (2012). The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annual review of immunology*, 30: 759.

Horrigan, L. A.; Kelly, J. P.; Connor, T. J. Immunomodulatory Effects of Caffeine: Friend or Foe? *Pharmacol. Ther.* 2006, 111 (3), 877-892.

Huang, R., O'Donnell, A. J., Barboline, J. J., & Barkman, T. J. (2016). Convergent evolution of caffeine in plants by co-option of exapted ancestral enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(38), 10613-10618.

Huyghe Adeline (2014). Bienfaits et limites de la consommation de caféine. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Lille 2.

I

Ibrahim, S. A., Salameh, M. M., Phetsomphou, S., Yang, H., & Seo, C. W. (2006). Application of caffeine, 1, 3, 7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157: H7. *Food Chemistry*, 99(4), 645-650.

Iriondo-DeHond, A., Uranga, J. A., Del Castillo, M. D., & Abalo, R. (2020). Effects of coffee and its components on the gastrointestinal tract and the brain-gut axis. *Nutrients*, 13(1), 88.

Ito, Y., OSA, T., & KURIYAMA, H. (1974). Topical differences of caffeine action on the smooth muscle cells of the guinea pig alimentary canal. *The Japanese journal of physiology*, 24(2), 217-232.

J

Jacobson, K. A.; Gao, Z. G.; Matricon, P.; Eddy, M. T.; Carlsson, J. Adenosine A2A Receptor Antagonists: From Caffeine to Selective Non-Xanthines. *Br. J. Pharmacol.* 2020, in press. DOI: 10.1111/bph.15103.

Jacqz-Aigrain, É. (2002). Traitement médicamenteux des apnées du prématuré. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 15(1), 37-42.

Jamali, N., Mostafavi-Pour, Z., Zal, F., Kasraeian, M., Poordast, T., Ramezani, F., & Zare, R. (2019). Combination effect of caffeine and caffeic acid treatment on the oxidant status of ectopic endometrial cells separated from patients with endometriosis. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 44(4), 315.

James J.E., 1991. Caffeine and health. London : Academic Press : 19-41.

Janda, C. Y.; Waghay, D.; Levin, A. M.; Thomas, C.; Garcia, K. C. Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. *Science* 2012, 337 (6090), 59-64.

Jaquet, M., Rochat, I., Moulin, J., Cavin, C., & Bibiloni, R. (2009). Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study. *International journal of food microbiology*, 130(2), 117-121.

Jarrar, S. F., & Obeid, O. A. (2014). Timing of caffeine ingestion alters postprandial metabolism in rats. *Nutrition*, 30(1), 107-111.

Jayakeerthana, S. (2016). Benefits of Green Tea: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(10), 1184.

Jean Bruneton, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, édition Technique et Documentation-Lavoisier, 3^e édition, 1999.

Jiang, G. J., Wang, K., Miao, D. Q., Guo, L., Hou, Y., Schatten, H., & Sun, Q. Y. (2011). Protein profile changes during porcine oocyte aging and effects of caffeine on protein expression patterns. *PloS one*, 6(12), e28996.

Jisette LETELIER (2020). LISTE NATIONALE DES MEDICAMENTS ESSENTIELS. 2^{ème} Edition. Conception et réalisation: Direction de la Pharmacie, du Médicament et de la Médecine Traditionnelle (DPM/MT).

Jobst, C. (1838). Thein identisch mit Caffein. *Annalen der Pharmacie*, 25(1), 63-66.

Johnston, K. L., Clifford, M. N., & Morgan, L. M. (2003). Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American journal of clinical nutrition*, 78(4), 728-733.

Jones, D. P., Mody Jr, V. C., Carlson, J. L., Lynn, M. J., & Sternberg Jr, P. (2002). Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(9), 1290-1300.

Juhel, C., Armand, M., Pafumi, Y., Rosier, C., Vandermander, J., & Lairon, D. (2000). Green tea extract (AR25®) inhibits lipolysis of triglycerides in gastric and duodenal medium in vitro. *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(1), 45-51.

K

Kairie, E., Romero, L.F., Nyachote, C.M., 2013. The role feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry. *Nutr. Res. Rev.* 26, 71–88.

Kalow W (1986) Ethnic differences in reactions to drugs and xenobiotics. Caffeine and other drugs. *Prog Clin Biol Res* 214:331–341.

Kamat P, Bloor KK, Devasagayam TPA, et al. Differential modification by caffeine of oxygen-dependent and independent effects of γ -irradiation on rat liver mitochondria. *International Journal of Radiation Biology*. 2000; 76(9): 1281-1288.

Khellou sabah (2009). Conformation moléculaire et calcul du potentiel intermoléculaire de la caféine (C₈H₁₀N₄O₂). Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine.

Khochapong, W., Ketnawa, S., Ogawa, Y., & Punbusayakul, N. (2021). Effect of in vitro digestion on bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extract. *Food Chemistry*, 348, 129094.

Kim W. Ray, Steven L. Flamm, Adrian M. Di Bisceglie, and Henry C. Bodenheimer, Jr., 2008. Serum Activity of Alanine Aminotransferase (ALT) as an Indicator of Health and Disease. *HEPATOLOGY*; 1363-1370

Kimura, M., Sawada, N., Kimura, H., Isomura, H., Hirata, K., & Mori, M. (1996). Comparison between the distribution of 7H6 tight junction-associated antigen and occludin during the development of chick intestine. *Cell structure and function*, 21(1), 91-96.

Kleber Silveira A, Moresco KS, Mautone Gomes H, da Silva Morrone M, Kich Grun L, Pens Gelain D, ... & Fonseca Moreira J C. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) alters gut microbiota and modulates redox status, partially via caffeine in Wistar rats. *Phytotherapy Research*. 2018; 32(12), 2466-2474.

Koralkar, R., Ambalavanan, N., Levitan, E. B., McGwin, G., Goldstein, S., & Askenazi, D. (2011). Acute kidney injury reduces survival in very low birth weight infants. *Pediatric research*, 69(4), 354-358.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, 27: 485-517.

Kovacs EM, Lejeune MP, Nijs I, et al. Effects of green tea on weight maintenance after body-weight loss. *British Journal of Nutrition*. 2004; 91(3): 431-437.

Kraus TA, Brimnes J, Muong C, et al. Induction of mucosal tolerance in Peyer's patch-deficient, ligated small bowel loops. *J Clin Invest* 2005;115:2234-43.

Kriško A, Kveder M, & Pifat G. Effect of caffeine on oxidation susceptibility of human plasma low density lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 2005; 355(1-2): 47-53.

Kudva, A. K., Shay, A. E., & Prabhu, K. S. (2015). Selenium and inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(2), G71-G77.

L

Lallès, J. P. (2013). Fonction de barrière et protection cellulaire de l'épithélium intestinal. Application au porcelet au sevrage. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.

Lallès, J.-P., 2010. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.* 68, 323–332.

Lallès, J.-P., 2014. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr. Rev.* 72, 82–94.

Lallès, J.-P., 2015. Intestinal alkaline phosphatase in stool: a novel biomarker for metabolic diseases. *EBioMedicine* 2 1866–1866.

Landi MT, Sinha R, Lang NP, and Kadlubar FF (1999) Human cytochrome P4501A2. *IARC Sci Publ* 148:173–195.

Landman, C., & Quévrain, E. (2016). Le microbiote intestinal: description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de médecine interne*, 37(6), 418-423.

Langhendries, J. P. (2006). Colonisation bactérienne de l'intestin dans l'enfance: pourquoi y accorder autant d'importance?. *Archives de pédiatrie*, 13(12), 1526-1534.

Lathrop, S. K., Bloom, S. M., Rao, S. M., Nutsch, K., Lio, C.-W., Santacruz, N., Peterson, D. A., Stappenbeck, T. S. & Hsieh, C.-S. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 478 (7368): 250-254.

Le Floc'H, N., & Sève, B. (2000). Le devenir des protéines et des acides aminés dans l'intestin du porc: de la digestion à l'apparition dans la veine porte. *Productions animales*, 13(5), 303-314.

Le Guennec, J. C., Billon, B., & Paré, C. (1985). Maturation changes of caffeine concentrations and disposition in infancy during maintenance therapy for apnea of prematurity: influence of gestational age, hepatic disease, and breast-feeding. *Pediatrics*, 76(5), 834-840.

Le Marchand L, Sivaraman L, Franke AA, Custer LJ, Wilkens LR, Lau AF, and Cooney RV (1996). Predictors of N-acetyltransferase activity: should caffeine phenotyping and NAT2 genotyping be used interchangeably in epidemiological studies? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:449–455.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C., 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microb Mol Biol Rev.* 72: 728–764.

LeBlanc, J., & Soucy, J. (1994). Hormonal dose–response to an adenosine receptor agonist. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 72(2), 113-116.

- Lécuyer, E. (2012). Impact of the microbiota on maturation of the host immune system: analysis of the strong immunoproperties of segmented filamentous bacteria in gnotobiotic mice.
- Lee, C. (2000). Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta*, 295(1-2), 141-154.
- Lee, J. J., Jacobsen, E. A., McGarry, M. P., Schleimer, R. P. & Lee, N. A. (2010). Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. *Clinical & Experimental Allergy*, 40 (4): 563-575.
- Lee, W.-J., Hase, K., 2014. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol.* 10, 416–424.
- Lei Q, Bi J, Chen H, et al. Glucagon-like peptide-2 improves intestinal immune function and diminishes bacterial translocation in a mouse model of parenteral nutrition. *Nutrition Research*. 2018; 49: 56-66.
- Léké, A., Mullié, C., Krim, G., Canarelli, J. P., & Meddah, B. (2012). Establishment of the intestinal microflora and regulation of bacterial translocation after caffeine citrate treatment during postnatal period in rat. *Archives de Pédiatrie: Organe Officiel de la Société Française de Pédiatrie*, 19(10), 1015-1020.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837-848.
- Li Y, Chen Y, Zhang J, et al. Protective effect of glutamine-enriched early enteral nutrition on intestinal mucosal barrier injury after liver transplantation in rats. *The American journal of surgery*. 2010; 199(1): 35-42.
- Li, Y., Innocentin, S., Withers, D. R., Roberts, N. A., Gallagher, A. R., Grigorieva, E. F., Wilhelm, C. & Veldhoen, M. (2011). Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell*, 147 (3): 629-640.
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11), 19180-19208.
- Lichtman SM. Bacterial translocation in humans. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2001; 33(1): 1-10.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25.
- Lipton, R. B.; Diener, H. C.; Robbins, M. S.; Garas, S. Y.; Patel, K. Caffeine in the Management of Patients with Headache. *J. Headache Pain* 2017, 18 (1), 107.
- Liu, H., Zhou, Y., & Tang, L. (2017). Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 16(3), 2445-2454.
- Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Chu, Y., Perin, J., Zhu, J., Lawn, J.E., Cousens, S., Mathers, C., Black, R.E., 2016. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an

updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet* 388, 3027–3035.

Liu, S., Zhang, X., Liu, Y., Yuan, X., Yang, L., Zhang, R., ... & Zhu, C. (2020). Early application of caffeine improves white matter development in very preterm infants. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 281, 103495.

Ljungdahl, M. (2000). Bacterial translocation in experimental shock is dependent on the strains in the intestinal flora. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 35(4), 389-397.

Loïc Girre, 2001. Les plantes et les médicaments. Edition Nathalie Rachline, Delachaux et Niestlé S.A., Lausanne (Switzerland)-Paris. ISBN : 2-603-01209-6, p44-46 ; 52-53 ; 81-86.

Loïc Girre, Infusions et plantes de sante en France, éditions Ouest-France, 2000.

Loïc Girre, Traditions et propriétés des plantes médicinales. Histoire de la pharmacopée, édition Privat, 1997.

Lopez-Belmonte, J., Whittle, B. J., & Moncada, S. (1993). The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. *British journal of pharmacology*, 108(1), 73-78.

Lushchak VI. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish physiology and biochemistry*. 2016 ; 42(2): 711-747.

Lv, X., Chen, Z., Li, J., Zhang, L., Liu, H., Huang, C., & Zhu, P. (2010). Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress. *Inflammation Research*, 59(8), 635-645.

M

Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A .2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* 6(4): 666-77.

Mallegol J, Van Niel G, Lebreton C, et al. T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology* 2007;132:1866-76.

Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM (2005) Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine. *Br J Surg* 92:1169–1176

Maloy, K. J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N. J. & Powrie, F. (2003). CD4+ CD25+ TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *The Journal of experimental medicine*, 197 (1): 111-119.

Manne V & Saab S. Coffee as modulator of liver injury: Fact and fiction. *Clinical Liver Disease*. 2015; 6(6): 139.

Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* 2011;4:603-11.

- Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D.A., Hirschfield, G.M., Hold, G., Quraishi, M.N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K.M., Thomas, L.V., Zoetendal, E.G., Hart, A., 2015. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65, 330–339.
- Marklund S, & Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*. 1974; 47(3): 469-474.
- Martínez-López, S., Sarriá, B., Baeza, G., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2014). Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy subjects. *Food research international*, 64, 125-133.
- Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, et al. Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 2003;125:696-707.
- McCord, J. M., Keele, B. B., & Fridovich, I. (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(5), 1024-1027.
- McDole, J. R., Wheeler, L. W., McDonald, K. G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K. A., Newberry, R. D. & Miller, M. J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 483 (7389): 345-349.
- McFarlene, G., & Gibson, G. (1994). Metabolic activities of the normal colonic microflora. *Human health: contribution of microorganisms*. Springer, Frankfurt, Germany, 17-38.
- Ménard S, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol* 2010;3:247-59.
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
- Mishra, B., & Jha, R. (2019). Oxidative stress in the poultry gut: Potential challenges and interventions. *Frontiers in veterinary science*, 6, 60.
- Mishra, S., Agarwal, R., Jeevasankar, M., Aggarwal, R., Deorari, A. K., & Paul, V. K. (2008). Apnea in the newborn. *The Indian Journal of Pediatrics*, 75(1), 57-61.
- Mohamed M., Abdellatif M.D., Sabar A., Elglammal M.D. (2003). Sodium fluoride ion and renal function after prolonged sevoflurane or isoflurane anaesthesia. *Eng. J. Anaesth.* 19: 79-83.
- Morini, F., Di Crosta, I., Ronchetti, M. P., Dituri, F., Nahom, A., Corchia, C., & Bagolan, P. (2008). Lactate dehydrogenase activity is increased in plasma of infants with advanced necrotizing enterocolitis. *Pediatric surgery international*, 24(6), 705-709.
- Morisot C, Simoens C, Trublin F, Lhermitte M, Gremillet C, Robert MH, and Lequien P (1990) [Efficacy of percutaneous caffeine in the treatment of apnea in the premature infant]. *Arch Fr Pédiatr* 47:221–224.

Moron MS, Depierre JW, & Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects*. 1979; 582(1): 67-78.

Moschino, L., Zivanovic, S., Hartley, C., Trevisanuto, D., Baraldi, E., & Roehr, C. C. (2020). Caffeine in preterm infants: where are we in 2020?. *ERJ open research*, 6(1).

Moumen WC., Tir Touil A, Léké A, et al. Establishment of the intestinal microflora and regulation of bacterial translocation after caffeine citrate treatment during postnatal period in rat. *Archives de pédiatrie : organe officiel de la Société française de pédiatrie*. 2012 ; 19(10) : 1015-1020.

Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 331-341.

Mulder, G. J. (1838). Ueber Thein und Caffein. *Journal für Praktische Chemie*, 15(1), 280-284.

Murray MJ, Barbose JJ, & Cobb CF. Serum D (-)-lactate levels as a predictor of acute intestinal ischemia in a rat model. *Journal of Surgical Research*. 1993; 54(5): 507-509.

Murray, M. J., Gonze, M. D., Nowak, L. R., & Cobb, C. F. (1994). Serum D (-)-lactate levels as an aid to diagnosing acute intestinal ischemia. *The American journal of surgery*, 167(6), 575-578.

Myatt, L. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*, 31, S66-S69.

N

Nagatomo, T., Jiménez, J., Richter, J., De Baere, S., Vanoirbeek, J., Naulaers, G., ... & Toelen, J. (2016). Caffeine prevents hyperoxia-induced functional and structural lung damage in preterm rabbits. *Neonatology*, 109(4), 274-281.

Nakayama, T., & Oishi, K. (2013). Influence of coffee (*Coffea arabica*) and galacto-oligosaccharide consumption on intestinal microbiota and the host responses. *FEMS microbiology letters*, 343(2), 161-168.

Nathanson, J. A. (1984). Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Science*, 226(4671), 184-187.

Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additives & Contaminants*, 20(1), 1-30.

Nehlig, A. (2018). Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacological reviews*, 70(2), 384-411.

Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136 (1): 65-80.

Nelson, K. K., Ranganathan, A. C., Mansouri, J., Rodriguez, A. M., Providence, K. M., Rutter, J. L., ... & Melendez, J. A. (2003). Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase

expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clinical cancer research*, 9(1), 424-432.

Ng PC. Biomarkers of necrotising enterocolitis. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2014: 33-38.

Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *Journal of investigative dermatology*, 127(11), 2525-2532.

Nieuwdorp M, Gilijamse PW, Pai N, Kaplan LM (2014) Role of the microbiome in energy regulation and metabolism. *Gastroenterology* 146:1525–33

Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 503-515.

Nikolic J, Bjelakovic G, & Stojanovic I. Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. In *Guanidino Compounds in Biology and Medicine*. 2003: 125-128.

Niles, R. M. (2004). Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555(1-2), 97-105.

Nishikawa, M., Tamada, A., Kumai, H., Yamashita, F., & Hashida, M. (2002). Inhibition of experimental pulmonary metastasis by controlling biodistribution of catalase in mice. *International journal of cancer*, 99(3), 474-479.

Nonthakaew, A., Matan, N., Aewsiri, T., & Matan, N. (2015). Caffeine in foods and its antimicrobial activity. *International Food Research Journal*, 22(1).

Norizan, S. N. M., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2013). Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor. *Sensors*, 13(4), 5117-5129.

Norte, A. C., Costantini, D., Araújo, P. M., Eens, M., Ramos, J. A., & Heylen, D. (2018). Experimental infection by microparasites affects the oxidative balance in their avian reservoir host the blackbird *Turdus merula*. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(3), 720-729.

Nyblom H, Björnsson E, Simrén M, et al. The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC. *Liver International*. 2006; 26(7) : 840-845.

O

O'Boyle, C. J., MacFie, J., Mitchell, C. J., Johnstone, D., Sagar, P. M., & Sedman, P. C. (1998). Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut*, 42(1), 29-35.

Oakley, B., Kogut, M.H., 2016. Spatial and temporal changes in the broiler chicken cecal and fecal microbiomes and correlations of bacterial taxa with cytokine gene expression. *Front. Vet. Sci.* 3, 11.

Oakley, B.B., Lillehoj, H.S., Kogut, M.H., Kim, W.K., Maurer, J.J., Pedroso, A., Lee, M.D., Collett, S.R., Johnson, T.J., Cox, N.A., 2014. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.* 360, 100–112.

- Oakley, B.B., Morales, C.A., Line, J., Berrang, M., Meinersmann, R.J., Tillman, G.E., Wise, M.G., Siragusa, G.R., Heitt, K.L., seal, B.S., 2013. The poultry-associated microbiome: network analysis and farm-to-fork characterizations. *PLoS One* 8, e57190.
- Oh M, Han M, Kim M, Park C, Kim Y, Lee J. Coffee consumption is associated with lower serum aminotransferases in the general Korean population and in those at high risk for hepatic disease. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2016; 25(4):767–75.
- Oh, J. K., Sandin, S., Ström, P., Löf, M., Adami, H. O., & Weiderpass, E. (2015). Prospective study of breast cancer in relation to coffee, tea and caffeine in Sweden. *International journal of cancer*, 137(8), 1979-1989.
- Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Chemistry.* 1979;95:351-358.
- Onuegbu AJ, Olisekodiaka JM, Adebolu OE, Adesiyun A, Ayodele OE. Coffee consumption could affect the activity of some liver enzymes and other biochemical parameters in healthy drinkers. *Med Princ Pract.* 2011; 20(6):514–18.
- Ouwerkerk, J. P., De Vos, W. M., & Belzer, C. (2013). Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 27(1), 25-38.

P

- P. Allain, Les médicaments 3ème édition, CdM Editions (2000-2008).
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., ... & Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.
- Pérez-Paramo, M., Muñoz, J., Albillos, A., Freile, I., Portero, F., Santos, M., & Ortiz-Berrocal, J. (2000). Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology*, 31(1), 43-48.
- Pesce, A. (1984). Lactate dehydrogenase. Kaplan A et al. *Clin Chem The CV Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*, 1124-1117.
- Pinzone, M. R., Celesia, B. M., Di Rosa, M., Cacopardo, B., & Nunnari, G. (2012). Microbial translocation in chronic liver diseases. *International journal of microbiology*, 2012.
- Plantefève, G., & Bleichner, G. (2001). Translocation bactérienne: mythe ou réalité?. *Réanimation*, 10(6), 550-561.
- Polansky, O., Sekelova, Z., Faldynova, M., Sbkova, A., Sisak, F., Rychik, F., 2016. Important metabolic pathways and biological processes engineered by chicken cecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1568–1576.
- Preedy, V. R., & Zibadi, S. (2013). Chocolate in health and nutrition. R. R. Watson (Ed.). London, UK:: Humana Press.

Q

Qi, H.; Li, S. Dose-Response Meta-Analysis on Coffee, Tea and Caffeine Consumption with Risk of Parkinson's Disease. *Geriatr. Gerontol. Int.* 2014, 14 (2), 430-439.

Qiao, Z., Li, Z., Li, J., Lu, L., Lv, Y., & Li, J. (2009). Bacterial translocation and change in intestinal permeability in patients after abdominal surgery. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 29(4), 486-491.

Quirino, I. E. P., Cardoso, V. N., Santos, R. D. G. C. D., Evangelista, W. P., Arantes, R. M. E., Fiúza, J. A., ... & Correia, M. I. T. D. (2013). The role of L-arginine and inducible nitric oxide synthase in intestinal permeability and bacterial translocation. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 37(3), 392-400.

R

Rahman M.F., Siddiqui M.K., Jamil K. (2000). Acid and alkaline phosphatase activities in a novel phosphorothionate (RPR-11) treated male and female rats. Evidence of dose and timedependent response. *Drug Chem. Toxicol.* 23: 497-509.

Rasmussen BB, Brix TH, Kyvik KO, and Brøsen K (2002) The interindividual differences in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. *Pharmacogenetics* 12:473–478.

Rayalam, S., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2008). Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *The Journal of nutritional biochemistry*, 19(11), 717-726.

Rehman, H., Hellweg, P., Taras, D., Zentek, J., 2008. Effects of dietary inulin on the intestinal short chain fatty acids and microbial ecology in broiler chickens as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Poult. Sci.* 87, 783–789.

Riaz Rajoka, M. S., Thirumdas, R., Mehwish, H. M., Umair, M., Khurshid, M., Hayat, H. F., ... & Barba, F. J. (2021). Role of food antioxidants in modulating gut microbial communities: Novel understandings in intestinal oxidative stress damage and their impact on host health. *Antioxidants*, 10(10), 1563.

Rinttila, T., Apajalahti, J., 2013. Intestinal microbiota and metabolites – implications for broiler chicken health and performance. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 647–658.

Roberts, A. (2021). Caffeine: an evaluation of the safety database. In *Nutraceuticals* (pp. 501-518). Academic Press.

Roberts, T., Wilson, J., Guthrie, A., Cookson, K., Vancraenest, D., Schaeffer, J., Moody, R., Clark, S., 2015. New issues and science in broiler chicken intestinal health: emerging technology and alternative interventions. *J. Appl. Poult. Res.* 24, 257–266.

Rosalki S et al. *Clin Chem* 1993; 39/4: 648-652.

Roto, S.M., Rubinelli, P.M., Ricke, S.C., 2015. An introduction to the avian gut microbiota and the effects of yeast-based prebiotic-type compounds as potential feed additives. *Front. Vet. Sci.* 2, 28.

Rougé, C. (2008). *L'intestin du prématuré: modulation du microbiote intestinal par une supplémentation orale en probiotiques, impact digestif et nutritionnel et recherche de marqueurs non invasifs de fonction intestinale* (Doctoral dissertation, Nantes).

Round, J. L. & Mazmanian, S. K. (2010). Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (27): 12204-12209.

Roy, J., & Gatt, M. (2012). Causes of surgical sepsis including bacterial translocation. *Surgery (Oxford)*, 30(12), 645-650.

Runge, F. (1821). *Neueste phytochemische Entdeckungen zur Begründung einer wissenschaftlichen Phytochemie*. Reimer.

Ryu, S., Choi, S. K., JoUNG, S. S., Suh, H., Cha, Y. S., Lee, S., & Lim, K. (2001). Caffeine as a lipolytic food component increases endurance performance in rats and athletes. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 47(2), 139-146.

S

Sacks, L. E., & Thompson, P. A. (1977). Increased spore yields of *Clostridium perfringens* in the presence of methylxanthines. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(2), 189-193.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133 (5): 775-787.

Salim SY, Soderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011 ; 17(1) :362-381.

Salzman, A. L., Menconi, M. J., Unno, N. A. O. K. I., Ezzell, R. M., Casey, D. M., Gonzalez, P. K., & Fink, M. P. (1995). Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2BBE intestinal epithelial monolayers. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 268(2), G361-G373.

Sandlie, I., Solberg, K., & Kleppe, K. (1980). The effect of caffeine on cell growth and metabolism of thymidine in *Escherichia coli*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 73(1), 29-41.

Sargis, R. M., & Subbaiah, P. V. (2006). Protection of membrane cholesterol by sphingomyelin against free radical-mediated oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(12), 2092-2102.

Saruwatari J, Nakagawa K, Shindo J, Tajiri T, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T, and Ishizaki T (2002). A population phenotyping study of three drug-metabolizing enzymes in Kyushu, Japan, with use of the caffeine test. *Clin Pharmacol Ther* 72:200–208.

Schmidt, B. (2020, December). Caffeine editorial. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 25, No. 6). Elsevier.

Schmidt, B.; Roberts, R. S.; Davis, P.; Doyle, L. W.; Barrington, K. J.; Ohlsson, A.; Solimano, A.; Tin, W. Caffeine Therapy for Apnea of Prematurity. *N. Engl. J. Med.* 2006, 354 (20), 2112-2121.

- Schmitt GC, Arbo MD, Lorensi AL, et al. Gender differences in biochemical markers and oxidative stress of rats after 28 days oral exposure to a mixture used for weight loss containing p-syneprine, ephedrine, salicin, and caffeine. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 52(1): 59-68.
- Schnoor, M., 2015. E-cadherin is important for the maintenance of intestinal epithelial homeostasis under basal and inflammatory conditions. *Dig. Dis. Sci.* 60, 816–818.
- Schwartz, A., Gruhl, B., Löbnitz, M., Michel, P., Radke, M., & Blaut, M. (2003). Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatric research*, 54(3), 393-399.
- Selby, C. P., & Sancar, A. (1990). Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9), 3522-3525.
- Sergeant, M.J., Constantinidou, C., Cogan, T.A., Beford, M.R., Penn, C.W., Pallen, M.J., 2014. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PLoS One* 9, e91941.
- Shapiro, R. E. Caffeine and Headaches. *Curr. Pain Headache Rep.* 2008, 12 (4), 311-315.
- Sharp, P. A., & Debnam, E. S. (1994). The role of cyclic AMP in the control of sugar transport across the brush-border and basolateral membranes of rat jejunal enterocytes. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 79(2), 203-214.
- Shimoda, H., Seki, E., & Aitani, M. (2006). Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 6(1), 1-9.
- Siekmann, L., Bonora, R., Burtis, C. A., Ceriotti, F., Clerc-Renaud, P., Féraud, G., ... & Schumann, G. (2002). International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 7. Certification of four reference materials for the determination of enzymatic activity of gamma-glutamyltransferase, lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase and creatine kinase accord. *Clin Chem Lab Med*, 40(7), 739-745.
- Sies H (1985). Introductory remarks. In: Sies H (ed) *Oxidative stress*. Academic, London, pp 1-8.
- Sies H (1986). *Biochemistry of oxidative stress*. *Angew Chem Int Ed Eng* 25:1058–1071.
- Silva, A. C.; Lemos, C.; Goncalves, F. Q.; Pliássova, A. V.; Machado, N. J.; Silva, H. B.; Canas, P. M.; Cunha, R. A.; Lopes, J. P.; Agostinho, P. Blockade of Adenosine A2A Receptors Recovers Early Deficits of Memory and Plasticity in the Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Dis.* 2018, 117, 72-81.
- Skinner, C., Thompson, A. J., Thursz, M. R., Marchesi, J. R., & Vergis, N. (2020). Intestinal permeability and bacterial translocation in patients with liver disease, focusing on alcoholic aetiology: methods of assessment and therapeutic intervention. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 13, 1756284820942616.

Smith, A.L., Powers, C., Beal, R.K., 2014. The avian enteric immune system in health and disease. In: Shat, K.A., Kaspers, B., Kaiser, P. (Eds.), *Avian Immunology*, 2nd edition. Academic Press, London, UK, pp. 227–250.

Smith, P., Smythies, L., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M. & Wahl, S. (2011). Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal immunology*, 4 (1): 31-42.

Sobhian B, Kröpfl A, Hölzenbein T, et al. Increased circulating D-lactate levels predict risk of mortality after hemorrhage and surgical trauma in baboons. *Shock*. 2012; 37(5): 473-477.

Sokol, H. (2014). Microbiote, ce qu'il faut savoir. *Côlon & rectum*, 8(3), 136-140.

Sola A, De Oca J, Gonzalez R, Prats N, Rosello-Catafau J, Gelpi E, Jaurrieta E, Hotter G (2001) Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation. *Ann Surg* 234:98–106

Solanki R, Nagori BP. 2012. Physicochemical and phytochemical investigation of whole plant of *Cynodon dactylon*. *Int J Comp Pharm*. 3: 1-4.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. & Mebius, R. E. (2013). Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, 13 (2): 145-149.

Steffen, E. K., Berg, R. D., & Deitch, E. A. (1988). Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *Journal of Infectious Diseases*, 157(5), 1032-1038.

Stéphane M. Schneider. Les enjeux du microbiote. Formation CIPE 2018. « Prévention et nutrition : les nouvelles stratégies » Nice, France.

Sulemanji, M., & Vakili, K. (2013, November). Neonatal renal physiology. In *Seminars in pediatric surgery* (Vol. 22, No. 4, pp. 195-198). WB Saunders.

Sun XQ, Fu XB, Rong-Zhang YL, et al. Relationship between plasma D (-)-lactate and intestinal damage after severe injuries in rats. *World journal of gastroenterology*. 2001; 7(4): 555.

Szalay L, Umar F, Khadem A, et al. Increased plasma D-lactate is associated with the severity of hemorrhagic/traumatic shock in rats. *Shock*. 2003; 20(3): 245-250.

T

Taguchi, M., Kawasaki, Y., Katsuma, A., Mito, A., Tamura, K., Makimoto, M., & Yoshida, T. (2020). Pharmacokinetic variability of caffeine in routinely treated preterm infants: preliminary considerations on developmental changes of systemic clearance. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, b20-00616.

Talha, M., Mir, A. R., Habib, S., Abidi, M., Warsi, M. S., & Islam, S. (2021). Hydroxyl radical induced structural perturbations make insulin highly immunogenic and generate an auto-immune response in type 2 diabetes mellitus. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 255, 119640.

- Tang, D., Wu, J., Jiao, H., Wang, X., Zhao, J., & Lin, H. (2019). The development of antioxidant system in the intestinal tract of broiler chickens. *Poultry science*, 98(2), 664-678.
- Tang-Liu DD, Williams RL, and Riegelman S (1983) Disposition of caffeine and its metabolites in man. *J Pharmacol Exp Ther* 224:180–185.
- Tang-Liu, D. D., Williams, R. L., & Riegelman, S. (1983). Disposition of caffeine and its metabolites in man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 224(1), 180-185.
- Tarnopolsky, M. A., Atkinson, S. A., MacDougall, J. D., Sale, D. G., & Sutton, J. R. (1989). Physiological responses to caffeine during endurance running in habitual caffeine users. *Medicine and science in sports and exercise*, 21(4), 418-424.
- Tavagnacco, L., Corucci, G., & Gerelli, Y. (2021). Interaction of Caffeine with Model Lipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125(36), 10174-10181.
- Tepperman, B. L., Brown, J. F., & Whittle, B. J. (1993). Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 265(2), G214-G218.
- Thomas, D.W., Henton, D.H., 1985. The use of fecal alkaline phosphatase as an indicator of intestinal damage. *Digestion* 31, 82–88.
- Thomas, M., Wrzosek, L., Rul, F., & Langella, P. (2013). Les animaux gnotobiotiques: pour mieux comprendre le microbiote intestinal. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 166(1), 19-23.
- Tofovic SP, Salah EM., Jackson EK, et al. Early renal injury induced by caffeine consumption in obese, diabetic ZSF1 rats. *Renal failure*. 2007; 29(7): 891-902.
- Tofovic, S. P., Kost Jr, C. K., Jackson, E. K., & Bastacky, S. I. (2002). Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, ZSF1 (fa-facp) rats. *Kidney international*, 61(4), 1433-1444.
- Torok, V.A., Opei, K., Loo, M., Hughes, R.J., 2008. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 783–791.
- Touil-Boukoffa, C., Bauvois, B., Sancéau, J., Hamrioui, B., & Wietzerbin, J. (1998). Production of nitric oxide (NO) in human hydatidosis: relationship between nitrite production and interferon- γ levels. *Biochimie*, 80(8-9), 739-744.
- Toussain-Samat M. History of food. Blackwell Publishing Ltd. États-Unis, (1994).
- Turmen, T., Davis, J., & Aranda, J. V. (1981, October). Relationship of dose and plasma concentrations of caffeine and ventilation in neonatal apnea. In *Seminars in perinatology* (Vol. 5, No. 4, pp. 326-331).
- Turmen, T., Louridas, T. A., & Aranda, J. V. (1979). Relationship of plasma and CSF concentrations of caffeine in neonates with apnea. *The Journal of pediatrics*, 95(4), 644-646.

Turner, J.R., 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 799–809.

U

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(5), 769-776.

Urgert R, Meyboom S, Kuilman M, Rexwinkel H, Vissers MN, Klerk M, Katan MB. Comparison of effect of cafetiere and filtered coffee on serum concentrations of liver aminotransferases and lipids: six month randomised controlled trial. *BMJ.* 1996; 313(7069):1362–6.

V

Vamanu, E., Gatea, F., & Pelinescu, D. R. (2020). Bioavailability and Bioactivities of Polyphenols Eco Extracts from Coffee Grounds after In Vitro Digestion. *Foods*, 9(9), 1281.

Van Dam, R. M., Hu, F. B., & Willett, W. C. (2020). Coffee, caffeine, and health. *New England Journal of Medicine*, 383(4), 369-378.

Vighi, G., Marcucci, F., Sensi, L., Di Cara, G., Frati, F., 2008. Allergy and the gastrointestinal system. *Clin. Exp. Immunol.* 153, 3–6.

Vistisen K, Poulsen HE, and Loft S (1992). Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis* 13:1561–1568.

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(3), e1208468.

W

Wallace, J. L., & Miller, M. J. (2000). Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology*, 119(2), 512-520.

Walsh, C. J., Guinane, C. M., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2014). Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS letters*, 588(22), 4120-4130.

Walton, K., Dorne, J. L., & Renwick, A. G. (2001). Uncertainty factors for chemical risk assessment: interspecies differences in the in vivo pharmacokinetics and metabolism of human CYP1A2 substrates. *Food and Chemical Toxicology*, 39(7), 667-680.

Wang, G., Bhoopalan, V., Wang, D., Wang, L., & Xu, X. (2015). The effect of caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. *Experimental hematology & oncology*, 4(1), 1-9.

Wang H, Zhang W, Zuo L, et al. Bifidobacteria may be beneficial to intestinal microbiota and reduction of bacterial translocation in mice following ischaemia and reperfusion injury. *British journal of nutrition.* 2013; 109(11): 1990-1998.

- Wang, L., Du, L. D., & Du, G. H. (2018). Caffeine. In *Natural Small Molecule Drugs from Plants* (pp. 199-204). Springer, Singapore.
- Wang, Y., Chen, Y., Zhang, X., Lu, Y., & Chen, H. (2020). New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. *Journal of Functional Foods*, 75, 104248.
- Watson D., 2003. Performance functional foods. Wood Head Publishing edition. 2003 :169.
- Weinberg, B. A., & Bealer, B. K. (2004). *The world of caffeine: the science and culture of the world's most popular drug*. Routledge.
- Weiser, T.; Weigmann, H. Effect of Caffeine on the Bioavailability and Pharmacokinetics of an Acetylsalicylic AcidParacetamol Combination: Results of a Phase I Study. *Adv. Ther.* 2019, 36 (3), 597-607.
- Wells, J.M., Brummer, R.J., Derrien, M., MacDonald, T.T., Troost, F., Cani, P.D., Theodorou, V., Dekker, J., Méheust, A., de Vos, W.M., Mercenier, A., Nauta, A., GarciaRodenas, C.L., 2017. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 312, G171.
- Welsh, E. J.; Bara, A.; Barley, E.; Cates, C. J. Caffeine for Asthma. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2010, 2010 (1), CD001112.
- Wenger C. et al. Alkaline phosphatase. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* 1984; 1094-1098.
- Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*, 5(1), 51-66.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Wiest R, Lawson M, & Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of hepatology.* 2014; 60(1), 197-209.
- Wiest, R., & Rath, H. C. (2003). Bacterial translocation in the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(3), 397-425.
- Wigley, P., 2013. Immunity to bacterial infection in the chicken. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 413–417.
- Wilkinson, S. C., Maas, W. J., Nielsen, J. B., Greaves, L. C., van de Sandt, J. J., & Williams, F. M. (2006). Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. *International archives of occupational and environmental health*, 79(5), 405-413.
- Willing, B.P., Van Kessel, A.G., 2010. Host pathways for recognition: establishing gastrointestinal microbiota as relevant in animal health and nutrition. *Livest. Sci.* 133, 82–91.
- Wu, B. H. (2014). Dose effects of caffeine ingestion on acute hormonal responses to resistance exercise. *The Journal of sports medicine and physical fitness*, 55(10), 1242-1251.

X

Xu, K., Xu, Y. H., Chen, J. F., & Schwarzschild, M. A. (2010). Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 167(2), 475-481.

Y

Yamaoka-Yano, D. M., & Mazzafera, P. (1999). Catabolism of caffeine and purification of a xanthine oxidase responsible for methyluric acids production in *Pseudomonas putida* L. *Revista de microbiologia*, 30(1), 62-70.

Yegani, M., Korver, D.R., 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult. Sci.* 87, 2052–2063.

Yoshikawa, T. (Ed.). (2000). *Free radicals in chemistry, biology and medicine*. Oica International.

Z

Zaharieva, D. P., & Riddell, M. C. (2013). Caffeine and glucose homeostasis during rest and exercise in diabetes mellitus. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 38(8), 813-822.

Zandvliet AS, Huitema AD, de Jonge ME, den Hoed R, Sparidans RW, Hendriks VM, van den Brink W, van Ree JM, and Beijnen JH (2005) Population pharmacokinetics of caffeine and its metabolites theobromine, paraxanthine and theophylline after inhalation in combination with diacetylmorphine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96:71–79.

Zheng G, Sayama K, Okubo T, et al. Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. *In vivo*. 2004; 18(1): 55-62.

Zheng, Y. & Rudensky, A. Y. (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature immunology*, 8 (5): 457-462.

Les Annexes

Annexe 01 : Diluants et milieux de cultures

PBS

Composant	Quantité
Chlorure de sodium NaCl	8 g/L
Phosphate disodique Na ₂ HPO ₄	1,42 g/L
Phosphate monopotassique KH ₂ PO ₄	0,24 g/L
Chlorure de potassium KCl	0,2 g/L

Solution Ringer

Composant	Quantité
Chlorure de sodium	2,25 g
Chlorure de potassium	0,105 g
Chlorure de calcium	0,12 g
Bicarbonate de sodium	0,05 g
Eau distillée	500 mL
pH = 7	

Gélose Columbia

Composant	Quantité
Peptone de caséine	12 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Extrait de viande	3 g
Extrait de levure	3 g
Comstarch	1 g
Agar	15 g
pH final : 7,3 ± 0,2	

Gélose EMB (éosine bleu de méthylène)

Composant	Quantité
Gélatine peptone	10 g
Lactose	10 g
Phosphate dipotassique	2 g
Eosine Y	0,4 g
Bleu de méthylène	65 mg
Agar	15 g
pH final : 7,2 ± 0,2	

Gélose MRS

Composant	Quantité
Peptone protéase	10 g
Extrait de viande	8 g
Extrait de levure	4 g
D(+)-Glucose	20 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	0,05 g
Phosphate dipotassique	2 g
Polysprbate 80	1 g
Agar	14 g
pH final à 25°C : 6.5 ± 0,2	

Gélose Schaedler

Composant	Quantité
Peptone de caséine	8,2 g
Dextrose	5,8 g
Extrait de levure	5 g
Tris Aminomethane	3 g
Peptone de viande	2,5 g
Chlorure de sodium	1,7 g
Peptone de soja	1 g
Phosphate dipotassique	0,8 g
L-Cystine	0,4 g
Hémine	0,01 g
Vitamine K	0,01 g
Agar	13,5 g
pH final : 7.6 ± 0.2 à 25 °C.	

Annexe 02 : la coloration de Gram

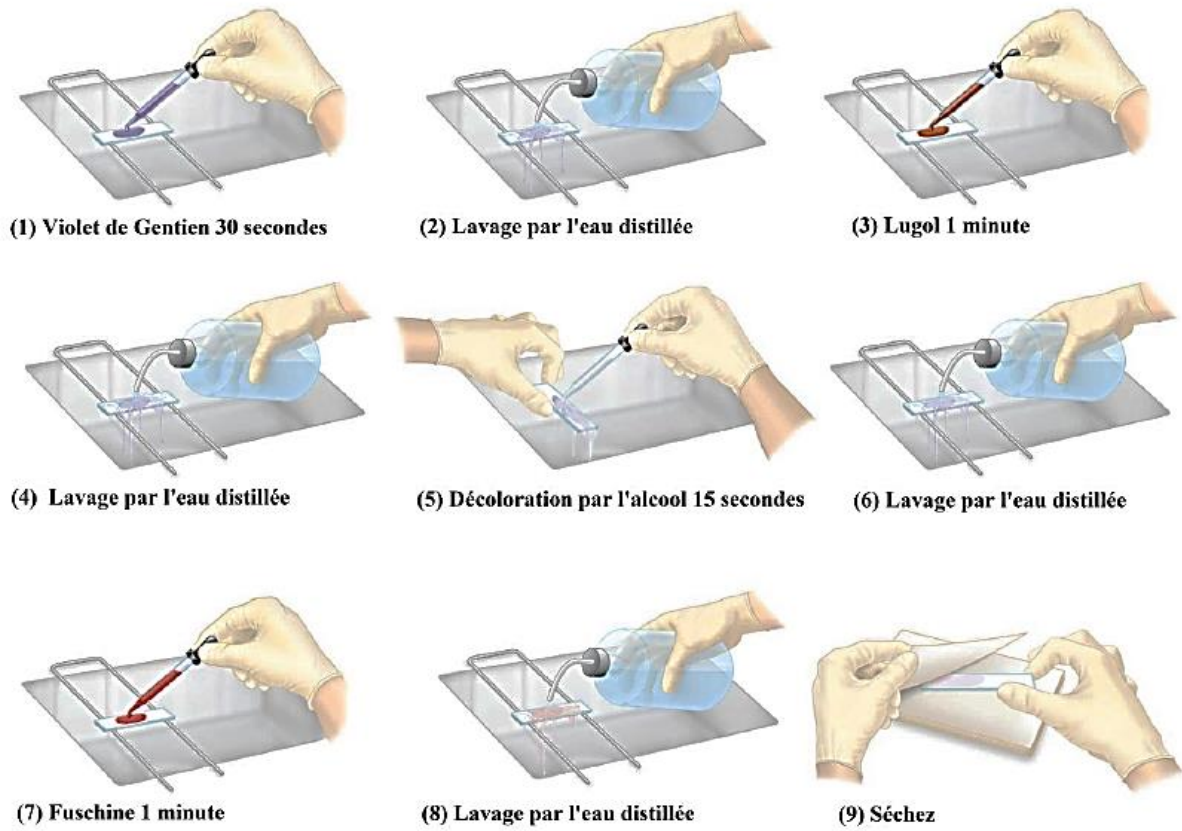


Figure : Les étapes de la coloration de Gram.

Annexe 03 : Identification biochimique

-
- (1) Sélectionnez une colonie bien isolée pour faire une suspension saline de l'organisme inconnu. La suspension doit être bien dispersé avec un mélangeur Vortex
- 0,85%
Saline 5 ml
- (2) Déposez une suspension bactérienne dans chaque des tubules de la galerie, remplissez les tubules CIT, VP et GEL par la suspension bactérienne jusqu'à la cupule
- Tubule Cupule
- (3) Distribuer environ 5 ml d'eau du robinet au fond du plateau
- (4) Placer la galerie API 20 dans le fond humidifié
- (5) Crée un microenvironnement anaérobie on remplir les cupules des caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H₂S, URE par l'huile de paraffine
- MINERAL OIL
- | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H ₂ S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN |
|------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 |
| + | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | + | + |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
- 5 1
- (6) Après 24 h à 37 ° C, ajoutés des réactifs et enregistré un code à 7 chiffres pour l'identification de l'organisme à l'aide d'un catalogue ou d'un logiciel *apiweb*TM

Figure : Manipulation de la galerie miniaturisée API.

Annexe 04 : Résultat de l'identification biochimique

Api	Code	Photo	Souche
			Avant incubation
			<i>Escherichia coli</i>
	« 5315773 »		<i>Enterobacter aerogenes</i>
Api 20 E	« 5364573 »		<i>Kluyvecoc spp.</i>
	« 7307573 »		<i>Serratia liquefaciens</i>
	« 7325673 »		<i>Enterobacter cloacae</i>
	« 1364572 »		<i>Citrobacter koseri</i>
	« 7275773 »		<i>Klebsiella oxytoca</i>

Annexe 05 : Antibiotogramme

La réalisation de l'antibiogramme est très importante lors de l'identification bactérienne. Ce test permet de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques.

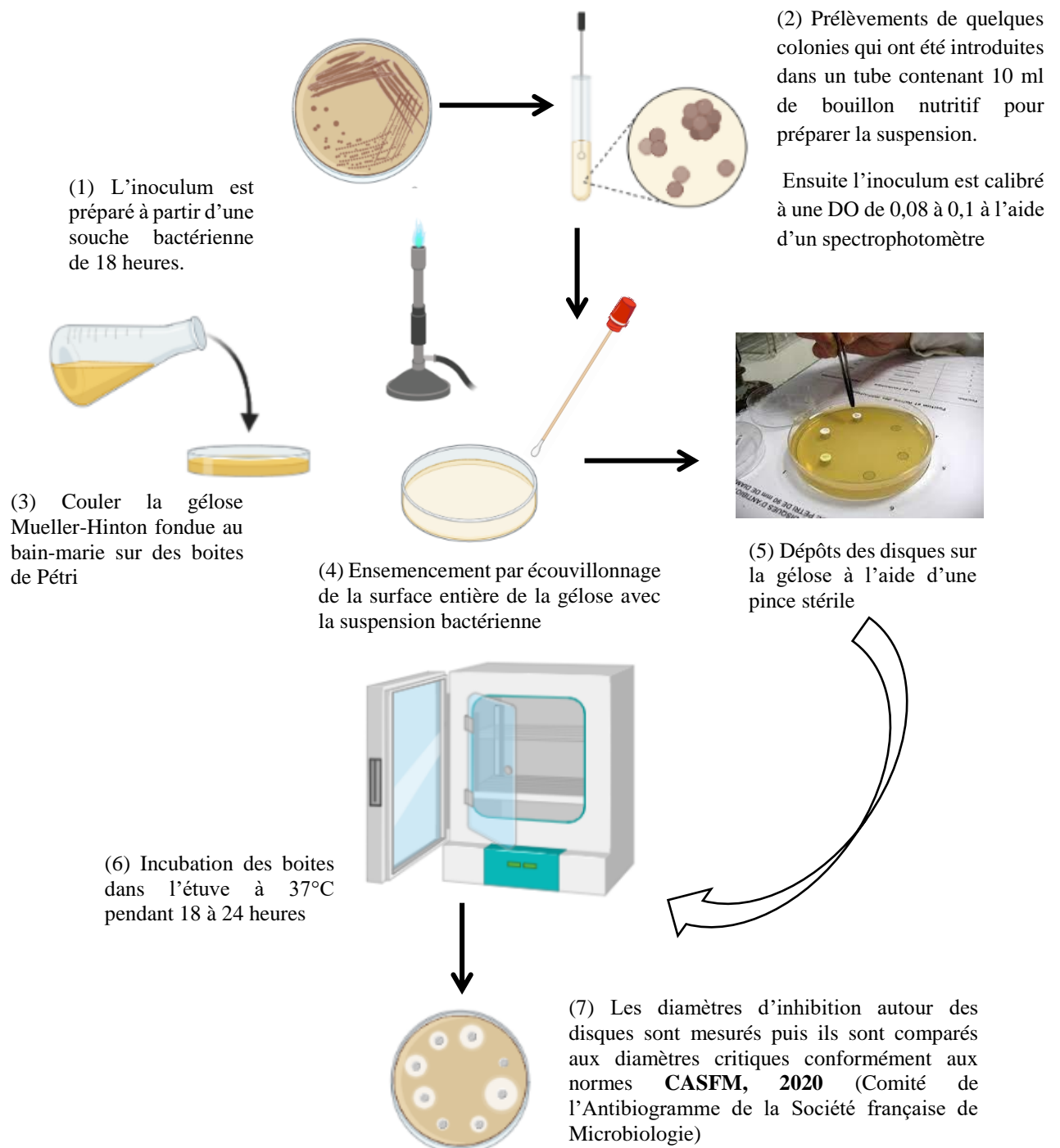


Figure : Les étapes de la réalisation de l'antibiogramme.

Annexe 06 : Profil de résistance/sensibilité des bactéries isolées (Antibiogrammes)

Tableau 1 : Liste des antibiotiques utilisés (CASFM Recommandations Vétérinaires, 2019).

Famille bactérienne	Famille d'antibiotique	Antibiotique utilisé	Abréviation
<i>Enterobacteriaceae</i>	Pénicillines	Ampicilline	AMP
		Amoxicilline-acide clavulanique	AMC
	Céphalosporines	Céfalexine	CL
		Céfépime	FEP
	Fluoroquinolones	Acide nalidixique	NA
	Aminosides	Gentamicine	CN
	Macrolides	Erythromycine	E
	Phénicolés	Chloramphénicol	COL
	Polymyxines	Colistine	CT
	Autres	Nitroxoline	NTX

Tableau 2 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne (mm).

Bactérie présumé	AMC	CL	NA	E	CN	COL	CT	NTX
<i>Escherichia coli</i>	10 R	08 R	16 S	08	14 S	08 R	20 S	10 R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12 R	10 R	35 S	10	21 S	10 R	36 S	30 S
<i>Kluyveco spp.</i>	22 S	11 R	20 S	16	24 S	16 R	30 S	40 S
<i>Serratia liquefaciens</i>	08 R	12 R	20 S	08	22 S	08 R	22 S	25 R
<i>Enterobacter cloacae</i>	14 S	14 S	30 S	16	20 S	10 R	35 S	35 S
<i>Citrobacter koseri</i>	24 S	12 S	24 S	11	18 S	12 R	30 S	18 R
<i>Klebsiella oxytoca</i>	11 R	06 R	18 S	10	16 S	11 R	20 S	11 R

S : sensible ; **R** : résistante

Les diamètres d'inhibition autour des disques mesurés sont comparés aux diamètres critiques conformément aux normes CASFM, 2019 (Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie, Recommandations Vétérinaires).

Annexe 07 : Conservation des souches bactériennes

Les bactéries peuvent être stockées pendant des années. L'ajout du glycérol stabilise les bactéries gelées, empêchant les dommages aux membranes cellulaires et gardant les cellules vivantes. Un stock de glycérol de bactéries peut être stocké de façon stable à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant de nombreuses années.

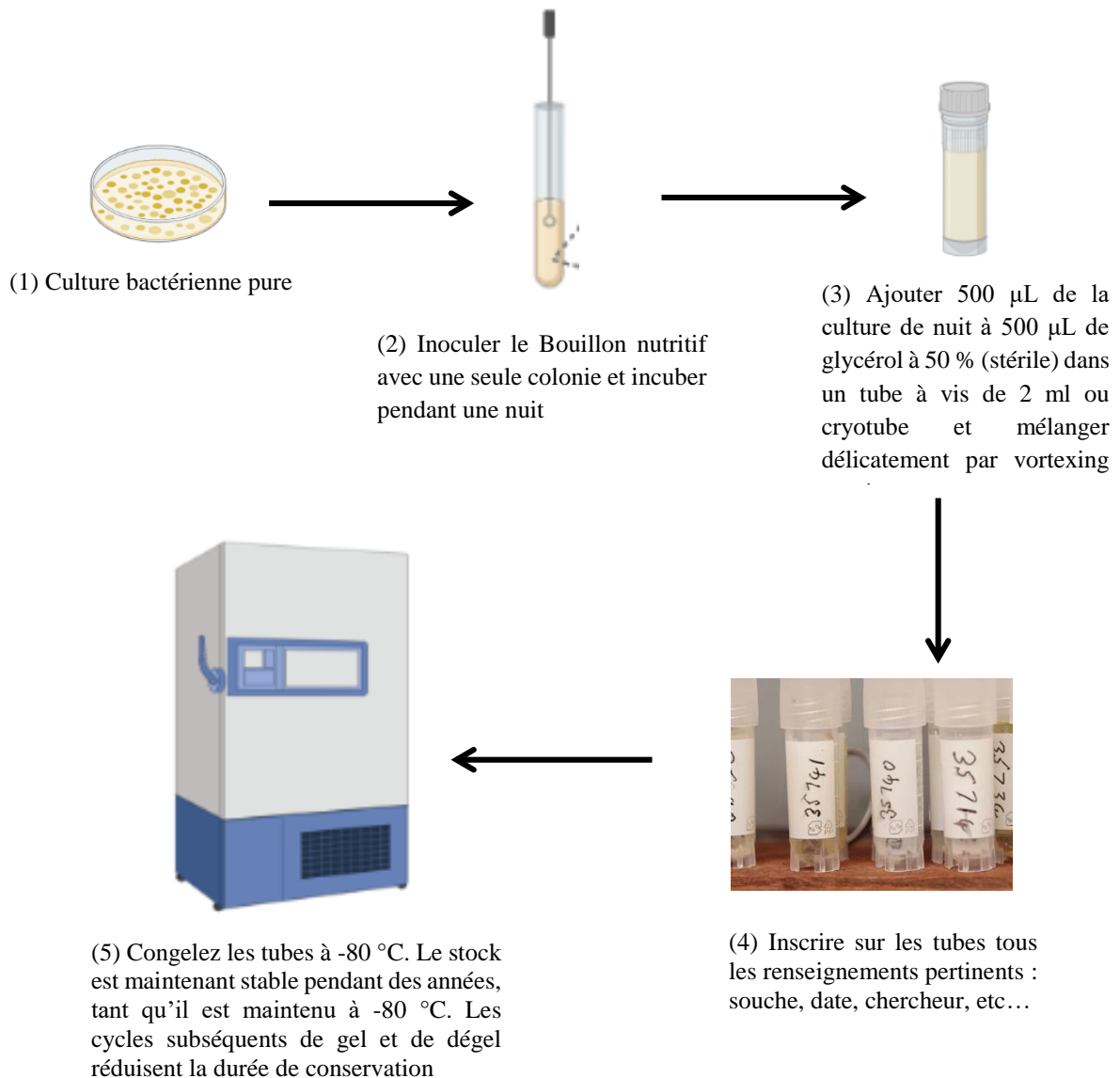


Figure : Les étapes de la conservation microbienne.

Annexe 08 : Laboratoires d'analyses médicales

Laboratoire d'analyses médicales Dr Boudchiche Mohamed

Adresse : N8, boulevard Djamel Abdennaser, Zone 08 Mascara-Algérie (à côté du stade DNC).

Téléphone : 0795 71 28 97 / 0561 12 54 89

Email : labomed.z8@gmail.com

Laboratoire d'analyses médicales Clinique Meliani

Adresse : Avenue Bahloul Beldjillali, Mascara-Algérie, située à proximité de Mosquée Ali ibn Ali Taleb et Mairie de Mascara.

Téléphone : 045 72 15 89

Fax : 045 72 15 90

Publications scientifiques

Caffeine citrate effects on gastrointestinal permeability, bacterial translocation and biochemical parameters in newborn rats after long-term oral administration

Foufa Bouabssa^{a,*}, Aicha Tir Touil^a, Mazhar Salim Al Zoubi^b, Nadia Chelli^a, André Leke^c and Boumediene Meddah^a

^a*Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety Laboratory (LBGMSS), Nature and Life Sciences Faculty, Mustapha Stambouli University, Mascara, Algeria*

^b*Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Yarmouk University, Irbid, Jordan*

^c*Pediatric Neonatal Department, CHU Nord-Amiens, France*

Received 26 August 2021

Accepted 29 January 2022

Pre-press 15 February 2022

Published 15 September 2022

Abstract.

BACKGROUND: Caffeine is a potent central and respiratory acting agent used in neonatology to treat apnea in premature newborns.

OBJECTIVE: This study investigates the effects of caffeine orally administered to newborn rats on gastrointestinal permeability, bacterial translocation and different biochemical parameters.

METHODS: Newborn rats were divided into different groups ($N=06$). The treated newborn rats were orally administered with standard caffeine doses (12 mg/kg per day), and the control groups received a placebo. The animals were weighed daily until sacrifice. Blood samples, mesenteric lymph nodes (MLN) and organs were aseptically collected. Furthermore, different biochemical (D-Lactate) and oxidative stress biomarkers (MDA, CAT, SOD and GSH) were examined. Microbiological analyses were performed to assess microbiota alterations and bacterial translocation.

RESULTS: Preliminary results showed that caffeine administration decreased the level of bacterial translocation over time. The treatment reduced plasma D-lactate levels ($p < 0.05$). Additionally, caffeine induced a disturbance in the concentrations of biochemical parameters and oxidative stress biomarkers. Indeed, liver enzymes (AST and ALT) were significantly ($p < 0.05$) risen after caffeine treatment. Glutathione (GSH) levels were significantly higher in caffeine treated groups (75.12 ± 0.32 ;

*Corresponding author: Foufa Bouabssa, Ph.D student, Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety Laboratory (LBGMSS), Nature and Life Sciences Faculty, Mustapha Stambouli University, Mascara, 29000, Algeria. E-mail: foufa.bouabssa@univ-mascara.dz.

51.98 ± 1.12 U/mg; $p < 0.05$) comparing to control ones (40.82 ± 0.25; 42.91 ± 0.27 U/mg; $p < 0.05$) in the ileum and the colon, respectively.

CONCLUSIONS: Thus, besides improving gastrointestinal permeability, our data show that caffeine has beneficial effects on the intestinal antioxidant system.

Keywords: Caffeine, neonatal life, intestinal permeability, bacterial translocation, oxidative stress parameters

1. Introduction

The gastrointestinal tract, besides its obvious functions such as digestion and absorption of nutrients into the body, constitutes an effective mucosal barrier and a complex immune organ [1]; protecting the host against the passage of potentially harmful macromolecules and translocation of pathogenic microorganisms. A large population of microorganisms, called microbiota, colonize the gut. The commensal colonization promotes the maturation of mucosal barrier and intestinal immune system, both of which are necessary for maintaining homeostasis [2]. Although the gut acts as a barrier between these microorganisms and the host, gastrointestinal bacteria might translocate under several circumstances, including increased intestinal barrier permeability, deficiencies in the host immune system, and overgrowth of intestinal bacteria [3].

During fetal and neonatal periods, macromolecules are highly transferred through the immature intestinal epithelium. The significant endocytic potential of immature (fetal-type) enterocytes causes increased intestinal permeability at these periods. These cells internalize macromolecules in the luminal content by fluid-phase or receptor-mediated endocytosis. Macromolecules are either digested in digestive vacuoles or transported to the basolateral side of the cell by vesicles [1]. In fetuses and neonates, this property is mainly lost as development and maturation advance, until macromolecular transepithelial transport stops at the moment of so-called “gut closure”.

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is a liposoluble drug with 100% bioavailability that is absorbed rapidly and efficiently through the gastrointestinal system [4, 5]. It's a naturally occurring alkaloid found in the leaves, seeds, and fruits of a variety of plants [6]. Caffeine can be synthesized artificially and used in dietary supplements and medications with different forms of administration [7]. This substance has a variety of physiological effects on different organisms at micromolar levels with a wide therapeutic window [8]. Caffeine is used to treat and prevent apnea of prematurity, a common complication in neonates with a gestational age of 28–33 weeks that is observed in the region of 90% of premature infants weighing less than 1 kg and in 25% of premature infants weighing less than 2.5 kg [9]. The first treatment for apnea of premature newborns was the theophylline used by Kuzenko and Poala [10]. In 1977, it was demonstrated that caffeine is highly effective than theophylline in the stimulation of the central nervous and respiratory systems [11] and has fewer adverse effects [12]. Currently, caffeine citrate represents the drug of choice for premature apnea treatment and prevention of bronchopulmonary dysplasia and respiratory distress syndrome [13].

Several studies have evaluated both short and long-term effects of caffeine in neonates, and primarily described neurodevelopment and cardiovascular outcomes. However, the caffeine effect on newborn gastrointestinal functions and gut microbiota is not clear [14]. This might be because caffeine is absorbed and degraded quickly and completely in the upper gastrointestinal system [15]. Additionally, animal studies have shown that caffeine can cause microbiota dysbiosis, which is likely caused by its antimicrobial properties [16, 17]. Thus, we hypothesized that caffeine, may affect gastrointestinal homeostasis at an early age.

The objective of our study was to investigate the effects of caffeine orally administered to newborn rats on gastrointestinal permeability, bacterial translocation and different biochemical parameters.

2. Material and methods

2.1. Animals

Wistar rats of the opposite sex were used during this study; animals were purchased from the Animal House (Mascara, Algeria). They were housed three to a cage under well hygienic conditions. Temperature and light were controlled (23 ± 2 °C; 12h light/12h dark cycles). Animals were fed *ad libitum*. The experimental protocol was designed to use the minimum number of animals ($N=06$) as well as to keep them from suffering.

2.2. Ethical considerations

The animal experiments were conducted following the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (protocol n°408, 25 June 2018), and approved by the Ethics committee for animal research of Mustapha Stambouli University (N/Réf: 04/CSF/SNV/2016, 08 November 2016).

2.3. Study design

Females were caged with males for 10 days and after 14 days gestation was detected by abdominal palpation. Neonate's birth happened after 22 days of mating. On the first day of life (day 1), three series of newborn rats were formed (S1 = 15 days, S2 = 30 days and S3 = 60 days). Each series was divided into 2 groups ($N=06$), the first group was treated orally with standard caffeine citrate dose of 12 mg/kg/day (as caffeine base) (CITRATE DE CAFFEINE COOPER, Renaudin Laboratory- France), control groups received saline placebo. The animals were weighed daily until the day of sacrifice. A laparotomy was performed; blood and organs samples were aseptically collected from each rat.

2.4. Microbiota assessment

Colon and ileum samples (1g) were aseptically dissected, homogenized and diluted serially to make 10^{-3} , 10^{-5} and 10^{-7} concentrations. 0.1 mL of each dilution was plated on the appropriate medium plates (Columbia agar, for total aerobes; Eosin Methylene agar, for Enterobacteria; Schaedler agar, for strict anaerobes and MRS agar for *Lactobacillus*). Aerobic and anaerobic cultures were incubated at 37°C for 24 h and 72 h, respectively. The colonies counts on the agar plates were represented as colony-forming units per gram of tissue.

2.5. Assessment of bacterial translocation

The existence of a positive culture from the mesenteric lymph nodes (MLNs) and external organs was considered as bacterial translocation [18]. To evaluate the degree of bacterial translocation, MLNs (from the ileum), liver, spleen and thymus specimens were removed aseptically. The tissue samples were rinsed in sterile saline solution to remove any blood. For bacteriological cultures, 0.1 g of each sample was immediately homogenized in 0.9 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS). 0.1 mL aliquot of each sample was cultured on Columbia agar, Eosin Methylene Blue agar (EMB agar) and Schaedler agar for total aerobic bacteria, Enterobacteria and strictly anaerobic bacteria detection, respectively. The cultures were incubated at 37°C for 48 hours. Anaerobic jars were used for anaerobic cultures [19]. Bacterial translocation was considered positive when the count was higher than 100 colonies forming units/g of tissue [20].

2.6. Analysis of intestinal permeability

The d-lactic acid level was measured to assess the changes in intestinal permeability. Using a spectrophotometric assay [21], plasma samples, ileum and colon homogenates were deproteinized and neutralized with perchloric acid and potassium hydroxide, respectively. D-lactate level was then quantified using D-lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase in a series of linked enzymatic processes.

2.7. Serum biochemical parameters assays

After each period of the experiment, newborn rats were sacrificed by Chloroform inhalation. Blood was collected through the aorta vein from control and caffeine-treated rats. Blood was centrifuged at 1500g for 15 min to collect the serum.

Serum total cholesterol(TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), the concentrations of serum triacylglycerol (TG), aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), urea, creatinine (CREA), bilirubin (BL), Lactate dehydrogenase (LDH) and phosphatase alkaline (PAL) levels were determined using the Respens 920- DiaSys Diagnostic Systems GmbH analyzer (65558 Holzheim, Germany).

2.8. Measurement of malondialdehyde (MDA) content, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) activities in the ileum the and colon

The ileum and colon tissues were thawed and homogenized on ice in the ratio of 2 g tissue for 8 mL of phosphate buffer saline. The homogenates were then centrifuged for 15 min at 10000 rpm at 4°C and supernatants were used for the different analyses.

The MDA content was assessed by the thiobarbiturate reaction using the method of Chiva and et al. [3]. The enzymatic activity of SOD (superoxide dismutase) was evaluated utilizing the spectrophotometric method developed by Marklund and Marklund [22]. Catalase was assessed calorimetrically (at 240 nm) as described by Caliborne [23]. Glutathione (GSH) was assessed as per Moron et al. [24]. The total protein level was measured at 540 nm using the Biuret reagent and bovine serum albumin as the standard, as reported by Gornall et al. [25].

2.9. Statistical analysis

Data of the present study were expressed as means \pm standard deviation (SD). To compare between the treated and control groups, a statistical analysis was done using the Student's *t*-test. A *p* value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Effect of caffeine on body weight

The main results of body weight are illustrated in Fig. 1. The body weight increased in both treated and non-treated groups in a time-dependent manner. Animals receiving caffeine treatment did not differ in weight

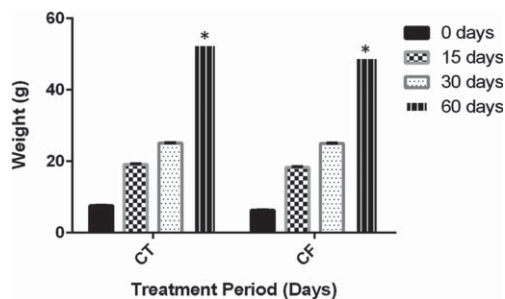


Fig. 1. Effect of caffeine administration on rats weight (g) ($n=06$). CT: control group; CF: caffeine treated group; *Significant difference between CT and CF ($p < 0.05$).

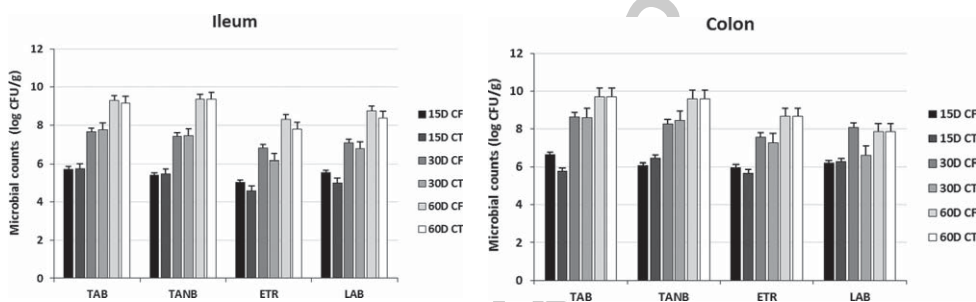


Fig. 2. Effect of caffeine administration on microbial counts in the ileum and colon. CT: control group; CF: caffeine treated group; TAB: total aerobic bacteria; TANB: total anaerobic bacteria; ETR: Enterobacteria; LAB: Lactobacillus. 15D, 30D, 60D: days of treatment. CFU/g: colony-forming unit per gram of tissue.

from controls. However, a significant ($p < 0.05$) decrease in body weight was noticed in the last treated group (60 days of treatment).

3.2. Effect of caffeine on the microbiota

As shown in Fig. 2, and compared to the control groups, the ileum and colon colonies counts of total aerobes and strict anaerobes exhibited no changes after caffeine administration. However, the counts of Enterobacteria and *Lactobacillus* were slightly lower in treated newborns compared to controls but the differences were not significant.

3.3. Effect of caffeine on bacterial translocation

Our data (Table 1) revealed that bacteria were observed in mesenteric lymph nodes (MLNs), Liver and spleen of the 15 days control rats. However, we noticed that BT had decreased in the treated groups. Treatment with caffeine reduced BT in MLNs and distant organs. Moreover, a total absence of translocation was observed in caffeine-treated group at 30 days of life compared to controls. No BT was pronounced in the 60 days treated and untreated groups.

Table 1
Bacterial translocation to MLNs, liver, spleen and thymus in treated and control groups

Groups		MLNs	Liver	Spleen	Thymus
15 D	CT	4/6	2/6	2/6	0/6
	CF	2/6	1/6	0/6	0/6
30 D	CT	2/6	2/6	1/6	0/6
	CF	1/6	0/6	0/6	0/6
60 D	CT	0/6	0/6	0/6	0/6
	CF	0/6	0/6	0/6	0/6

CT: control group, CF: caffeine treated group. Data are given as (d/e) = positive culture/total rat of group.

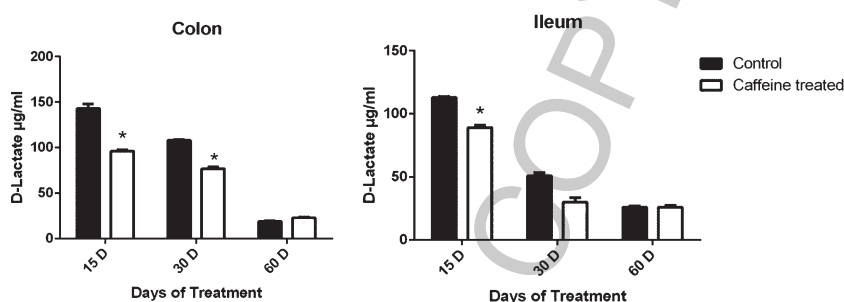


Fig. 3. D-lactate levels in the ileum and colon homogenates of control and caffeine treated newborn rats (mean \pm SD) (CT: control group; CF: caffeine treated group). * Significant differences between CT and CF ($p < 0.005$).

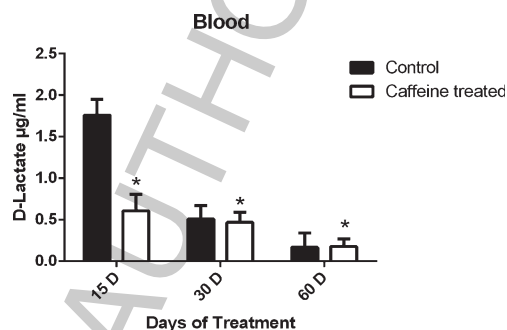


Fig. 4. D-lactate levels in the blood serum of control and caffeine treated newborn rats (mean \pm SD) (CT: control group; CF: caffeine treated group). * Significant differences between CT and CF ($p < 0.05$).

3.4. Effect of caffeine on intestinal permeability

Figures 3 and 4 show the mean values of D-lactate levels in control and caffeine-treated groups. Our data revealed that treatment with caffeine at an early age decreased plasma D-lactate concentrations compared to controls. Actually, levels of D-lactate were significantly lowered from 1.76 ± 0.19 to 0.61 ± 0.20 $\mu\text{g/ml}$ in the blood serum of the 15 days old treated rats ($p < 0.05$). Likewise, reduction in D-lactate levels was also observed

Table 2
Caffeine effects on serum biochemical parameters levels ($n=6$)

Parameters and groups	15D		30D		60D	
	CT	CF	CT	CF	CT	CF
AST (U/l)	148.60 ± 6.08	143.33 ± 2.16	162 ± 5.15	184 ± 34.2	165 ± 6.30	198.5 ± 24.80
<i>p</i> value	0.087		0.177		0.019*	
ALT (U/l)	53.33 ± 3.26	61.83 ± 18.17	49 ± 11.66	79.5 ± 36.76	60.5 ± 2.16	107.16 ± 42.10
<i>p</i> value	0.307		0.100		0.042*	
ALP (U/l)	493 ± 52.30	301 ± 48.30	355.66 ± 37.47	251 ± 32.02	289 ± 38.75	281 ± 71.21
<i>p</i> value	0.00006*		0.0004*		0.811	
LDH (U/l)	1316 ± 5.83	1349.33 ± 7.89	1134.66 ± 265.71	880.66 ± 30.45	783.83 ± 236.41	982.16 ± 68.57
<i>p</i> value	0.00001*		0.066		0.097	
TG (g/l)	0.39 ± 0.05	0.35 ± 0.07	0.67 ± 0.07	0.65 ± 0.09	0.94 ± 0.10	0.57 ± 0.22
<i>p</i> value	0.358		0.751		0.007*	
TC (g/l)	0.42 ± 0.03	0.451 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.61 ± 0.12	0.51 ± 0.08
<i>p</i> value	0.225		0.017*		0.107	
HDL (g/l)	87.83 ± 4.53	83.16 ± 8.47	93.16 ± 7.30	81 ± 6.92	107.33 ± 15.50	84.83 ± 10.45
<i>p</i> value	0.269		0.831		0.161	
LDL (g/l)	0.84 ± 0.05	0.73 ± 0.14	0.87 ± 0.36	0.93 ± 0.10	0.85 ± 0.50	0.91 ± 0.20
<i>p</i> value	0.137		0.728		0.804	
Urea (g/l)	0.21 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.34 ± 0.06	0.30 ± 0.06
<i>p</i> value	0.001*		0.0002*		0.276	
Creatinine (mg/l)	5.18 ± 0.16	5.55 ± 0.28	6.56 ± 0.17	6.13 ± 0.24	7.41 ± 0.14	6.61 ± 0.35
<i>p</i> value	0.024*		0.006*		0.001*	
TB (mg/ml)	10.46 ± 0.45	9.71 ± 0.54	9.40 ± 0.34	7.78 ± 0.42	7.48 ± 0.78	7.26 ± 0.94
<i>p</i> value	0.024		0.00003*		0.673	
DB (mg/ml)	2.26 ± 0.07	1.95 ± 0.49	2.35 ± 0.16	1.54 ± 0.27	1.73 ± 0.37	1.62 ± 0.14
<i>p</i> value	0.189		0.0002*		0.507	

CT: control group, CF: caffeine treated group, AST: Aspartate Transaminase, ALT: Alanine Transaminase, LDH: Lactate Dehydrogenase, ALP: Alkaline Phosphatase, TG: Triglycerides, TC: Total Cholesterol, HDL: high-density lipoprotein cholesterol, LDL: low-density lipoprotein cholesterol, TB: total bilirubin, DB: direct bilirubin. All values are expressed as mean ± SD ($n=6$). *Significant differences between CT and CF ($p<0.05$).

in ileum and colon homogenates of 15 days and 30 days old treated pups. However, no significant changes in the 60 days treated groups were noticed.

3.5. Effect of caffeine on serum biochemical parameters

Mean biochemical parameters concentrations of treated and non-treated newborns are summarized in Table 2. We observed that administration of caffeine exhibit changes on most of the serum parameters levels in comparison to control groups. Triglycerides levels were considerably lowered in the 60 days treated rats when compared with controls (from 0.94 ± 0.10 to 0.57 ± 0.22 g/l). Likewise, a significant reduction in total cholesterol level was obtained in 30 days treated group. In fact, total cholesterol level declined from 0.57 ± 0.02 to 0.53 ± 0.02 g/l. In addition, low-density lipoprotein cholesterol (LDL) levels did not differ statistically between the treated and untreated groups (Table 2). Although treated rats had lower levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL) than controls, the difference was not statistically significant. Compared to controls, caffeine raised significantly ($p<0.05$) liver enzymes (AST and ALT) in the 60 days treated group. While AST and ALT levels remained

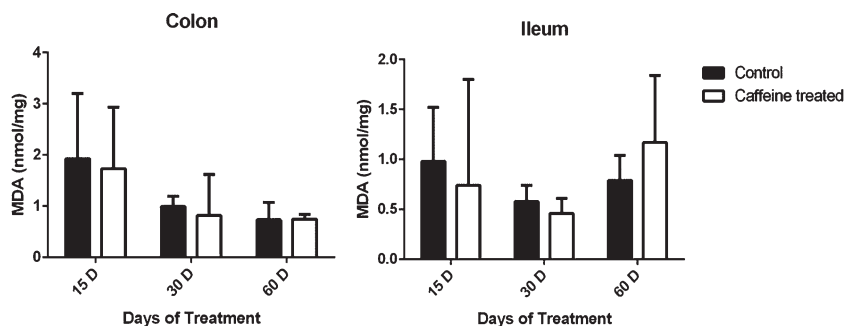


Fig. 5. Caffeine Effect on the content of MDA in the ileum and colon homogenates (CT: control group; CF: caffeine treated group). * Significant differences between CT and CF ($p < 0.05$).

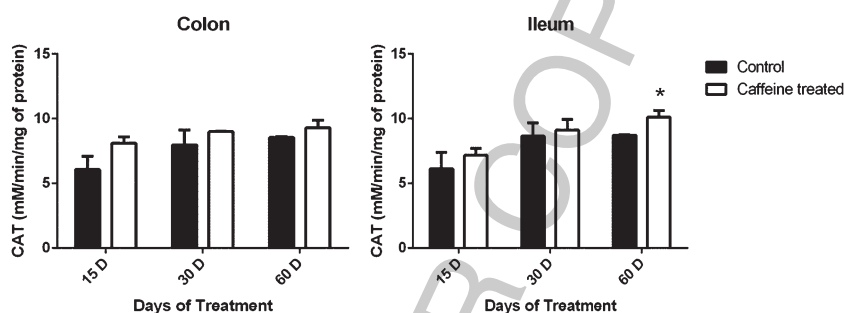


Fig. 6. Caffeine effect on the activities of CAT enzyme in the ileum (CT: control group; CF: caffeine treated group). * Significant differences between CT and CF ($p < 0.05$).

unchanged in the other groups. Caffeine also reduced urea and creatinine levels in all treated groups as compared to controls. Moreover, administration of caffeine resulted in 301 ± 48.30 , 251 ± 32.02 and 281 ± 71.21 reduction of alkaline phosphatase (ALP) levels after 15, 30 and 60 days, respectively. Compared to controls, lactate dehydrogenase (LDH) levels enhanced significantly after 15 days of treatment. Furthermore, a significant decrease ($p < 0.05$) in the level of total bilirubin was observed in 15 days and 30 days treated groups. Additionally, caffeine altered direct bilirubin levels in the 30 days treated group.

3.6. Effect of caffeine on CAT, SOD, GSH activities and MDA content in the ileum and the colon

Caffeine citrate's effect on the gut antioxidant system was also investigated. Levels of oxidative stress biomarkers measured in the ileum and the colon homogenates are presented in Figs. 5, 6, 7 and 8. The results showed that treatment with caffeine slightly decreased Malondialdehyde (MDA) levels (Fig. 5), increased Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD) levels in treated groups as compared to control groups in both intestine fragments. Indeed, catalase enhancement was statistically significant in the ileum after 60 days of treatment. Moreover, SOD levels were statistically significant in the ileum (15 days) and the colon (15 and 30 days).

Glutathione (GSH) levels were significantly higher (Fig. 8) in caffeine treated groups (75.12 ± 0.32 ; 51.98 ± 1.12 U/mg; $p < 0.05$) comparing to control ones (40.82 ± 0.25 ; 42.91 ± 0.27 U/mg; $p < 0.05$) in the ileum and the colon, respectively, at 15, 30 and 60 days of treatment.

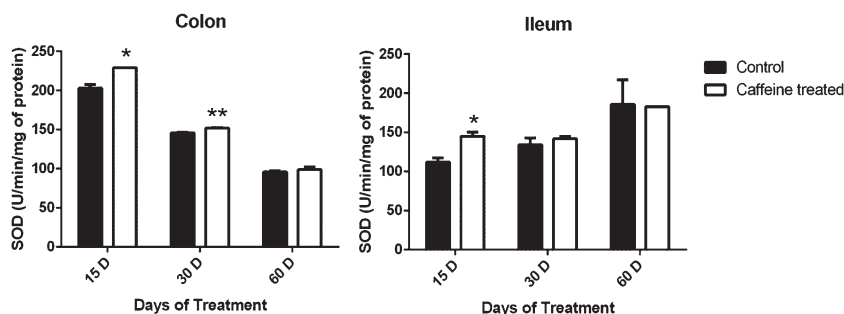


Fig. 7. Caffeine effect on the activities of SOD enzyme in the colon (CT: control group; CF: caffeine treated group). * ($p < 0.01$) ** ($p < 0.0005$) Significant differences between CT and CF.

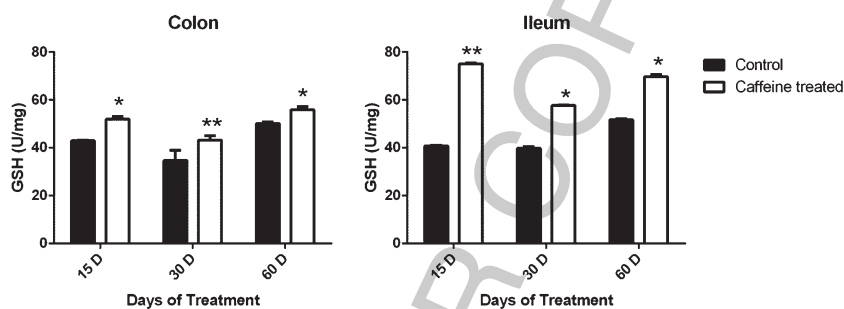


Fig. 8. Caffeine effect on the activity GSH in the ileum and colon (CT: control group; CF: caffeine treated group). * ($p < 0.05$) ** ($p < 0.005$) Significant differences between CT and CF.

4. Discussion

Caffeine has raised many health concerns over the past decade. Many reports have investigated the various impacts of caffeine. It is a stimulant for the central nervous system. After oral intake, caffeine plasma level reached its maximum after 30–120 min. Caffeine may cross all biological membranes due to its hydrophobic characteristics [26]. Furthermore, it is an adenosine-receptor antagonist [27], and can affect all tissue expressing adenosine receptors. The current study was designed to determine the effects of caffeine administration on gastrointestinal permeability, bacterial translocation (BT) and different biochemical and oxidative stress parameters in newborn rats.

Changes in the weight of rodents after exposure to caffeine have been reported in several studies. Our results showed that body weight increase was not significantly suppressed in neonate rats after 15 and 30 days (Fig. 1) of treatment. This finding corroborate the results of Kovacs et al. [28], who reported no significant difference in body weight between subjects receiving caffeine with green tea and those ingesting only placebo after 13 weeks with a very-low energy diet. Moreover, Schmitt et al. [29] did not report any significant changes in weight during the 28-day exposure to *p-synephrine*, *ephedrine*, *salicin* and *caffeine* mixture used as an anti-obesity. However, a previous study demonstrated that treatment with caffeine citrate appears to cause temporary suppression of body weight gain in newborn rats. The difference in weight loss between treated and control groups rose and became highly significant on the 30th day of life [17]. Furthermore, many researchers have shown that long-term intake

of caffeine lowered body weight in rodents [30–32]. Those results are in agreement with our findings showing a significant decrease in weight after 60 days of treatment.

The integrity of intestinal barriers, which include mechanical, chemical, biological, and immunological barriers, determines intestinal permeability. When a barrier is breached, the gut's permeability increases. The microbiota is a component of the biological barrier, which has both positive and negative impacts on intestinal permeability [33]. Anaerobes (Firmicutes and Bacteroidetes), are the main bacteria found in the gastrointestinal tract and account for around 90% of all microbiota [34]. No differences among anaerobic counts between caffeine-treated rats and controls were observed in our study (Fig. 2). In the same line, Kleber Silveira et al. [16] found no significant changes in anaerobic bacteria abundance in caffeine-treated groups when compared to the Guarana-treated and control groups. Our data showed that caffeine treatment decreased the number of intestinal Enterobacteria and *Lactobacillus* in the treated groups compared to controls. This decrease may be related to the antibacterial properties of caffeine [35]. In a previous study, our team showed that caffeine treatment during postnatal period in newborn rats, did not drastically alter the kinetics of establishment of the intestinal microbiota, only Enterobacteria were significantly lower in different intestinal segments of the treated groups ($p < 0.05$) [17]. Moreover, caffeine may affect negatively the microbiota and reduce the levels of *Lactobacillus*, according to Kleber Silveira et al. [16].

The mechanism by which caffeine altered gut aerobic and anaerobic bacterium concentrations was not explored in this investigation. More research on the impact of caffeine on the microbiota communities in the gut is required.

The translocation of bacteria (BT) from the intestinal lumen to the blood stream and systemic organs is due to damages in the intestinal barrier, alteration in the normal flora or the immaturity of the gastrointestinal tract. Indeed, the gut immune system's immaturity enhance the danger of systemic infections [36]. Bacteria with a high potential for pathogenicity have can cross through the gut barrier [37]. In the current study, we showed that bacterial translocation occurred at an early age, representing a natural phenomenon in neonates. Actually, we observed the presence of bacteria (especially Enterobacteria) in MLNs and distant organs such as the liver and spleen of newborn rats after 15 days of life. Supporting our results, Berg R.D. [38] showed that viable bacteria detected in the MLNs indicate bacterial translocation from the gut lumen. Wiest et al. [39] revealed that Gram-negative aerobes translocate easily than anaerobes across the intestinal epithelium. However, the incidence of BT was lower in caffeine-treated rats. Coffee components such as caffeine, caffeic acid, and trigonelline, according to Almeida et al. [35] have antibacterial effects against pathogenic microorganisms. Indeed, coffee inhibited the growth of Enterobacteria the most commonly bacteria found in the gut [35]. The decrease in BT is explained, at least in part, by alterations in intestinal microbiota found following caffeine administration in the current investigation.

We hypothesized that D-lactate assessment could confirm the bacterial translocation phenomena in newborn rats during the treatment with caffeine. According to our results, D-lactate decreased remarkably during exposure to caffeine. In fact, in the 15 days old treated neonates, levels D-lactate in plasma, ileum and colon homogenates decreased significantly ($p < 0.05$) (1.76 ± 0.19 , 113 ± 0.85 and 143 ± 5.01 to 0.61 ± 0.20 , 89 ± 1.96 and 96 ± 1.65 $\mu\text{g/ml}$, respectively). D (-)-lactate is synthesized by numerous species of anaerobic bacteria present in the gastrointestinal system [40]. The elevation of D-lactate concentration in the blood is commonly caused by bacterial over growth and elevated intestinal permeability, thereby allowing D-lactate to enter the systemic circulation [41, 42]. Indeed, earlier studies have reported a significant increase in blood D-lactate levels as consequence of bacterial colonization, systemic infections, or gastrointestinal disorders [43].

Taken together, those results confirms the hypothesis that treatment with caffeine accelerates intestinal maturation and controls bacterial translocation in newborn rats.

In the present study, we determined different biochemical parameters levels in plasma of treated and control newborn rats using the Respos 920- DiaSys Diagnostic Systems GmbH analyzer (65558 Holzheim, Germany). The considerable reduction in serum lipid profile is consistent with a precedent study reporting that caffeine treatment decreased triglyceride levels in rats [44]. In fact, our results showed that caffeine treatment suppressed triglycerides levels in the 60 days treated rats (from 0.94 ± 0.10 to 0.57 ± 0.22 g/l). Similarly, a significant reduc-

tion in serum total cholesterol levels was obtained in the 30D treated group (from 0.57 ± 0.02 to 0.53 ± 0.02 g/l). In addition, there were no significant changes in HDL-C and LDL-C values between the treated and untreated groups (Table 2).

Aminotransferase levels in the blood are used as a clinical measure of liver health. The alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) are two well-known enzymes involved in liver metabolism. Chronic liver disease is frequently detected when ALT and AST levels are increased. Furthermore, several studies demonstrated that ALT and AST are linked to metabolism disorders [45]. Caffeine itself is a bioactive compound related to metabolic features in humans [46]. Our data showed that the enzymes (ALT and AST) rose significantly after 60 days of caffeine administration. Supporting our results and according to Boekschoten et al., coffee bean extracts can raise ALT and AST levels regardless of kahweol concentration [47]. In addition, Urgert et al. discovered that drinking strong coffee regularly might directly enhance the level of circulating ALT [48]. Moreover, Onuegbu et al. found that coffee intake can increase ALT and AST levels depending on gender [49]. In the same line, Handayani et al. showed that administration of ethanol extract of Robusta coffee enhanced the levels of ALT and AST in Wistar albino rats [50]. As a result, the connection between coffee intake and ALT and AST levels may be influenced by the research design. In contrast to epidemiological studies, participants in these randomized controlled trials (RCTs) always drank coffee for a brief period (around only 1 month) [46]. Caffeine administration may cause various acute responses in the liver/body, which might explain the momentarily raised levels of ALT and AST. Dianzani et al. [51] reported that the caffeine peroxidative effect in fatty liver tissue could be the origin of the enzymes leakage. Observations of Manne and Saab [52] support our results. To fully understand the issues at hand, several long-term RCTs are required.

Alkaline phosphatase levels (ALP) were decreased significantly ($p < 0.05$) in treated rats when compared to the controls. Confirming our results, previous works have found a similar reduction in rats given filtered and unfiltered caffeine [53]. Thus, Nyblom et al. [54] suggested that caffeine or other components of coffee target liver enzymes.

Our results demonstrated that caffeine administration to the newborn rats slightly decreased the levels of urea and creatinine compared to the controls. In all groups, the differences were statistically significant ($p < 0.05$). Protein catabolism produces urea, whereas creatine metabolism produces creatinine, which is a waste product of muscle. Its presence in the blood is a sign of renal disease [55]. The rise in urea and creatinine levels shows that caffeine intake may affect renal function.

Total and direct bilirubin levels of test groups were reduced ($p < 0.05$) compared to the controls (30 days). Our results are in line with the observations of Emmanuel et al. [56]. They reported that the intake of caffeine at different doses decreases bilirubin levels.

Oxidative stress is characterized by the disturbance of reactive oxygen species (ROS) levels in the cell nucleus either by elevation or by reduction of ROS, thereby disturbing signaling pathways and causing oxidative changes of cellular components. Cell death can occur as a result of necrosis or apoptosis [57]. Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) prevent a state of oxidative stress by decomposing ROS [58].

Findings of this investigation showed that caffeine treatment did not generate oxidative damage in lipids of ileum and colon tissues. Indeed, MDA compounds production (Fig. 5) was reduced in treated groups (0.74 nmol/mg of tissue) compared to the control groups (0.98 nmol/mg of tissue). Several studies have shown that caffeine could have a protective role against cellular damage [59, 60]. Nikolic et al. [61] reported that caffeine is considered an antioxidant substance with beneficial effects due to its metabolites, 1-methylxanthine and 1-methyluric acid, which are extremely effective antioxidants. Thus, these studies confirmed that caffeine had antioxidant effects that protect tissue from free radical damage through the reduction or elimination of ROS.

Furthermore, the treatment with caffeine caused no-significant enhancement in CAT activity in ileum and colon tissues (Fig. 6). However, a significant increase of the enzyme activity was observed in the ileum tissue of 60 days treated group (10.12 mM/min/mg) compared to the control group (8.73 mM/min/mg) ($p < 0.05$). The degradation of intracellular hydrogen peroxide (H_2O_2) requires the existence of CAT. It promotes the breakdown

of H₂O₂ into water (H₂O) and oxygen while avoiding the production of free radicals. Moreover, SOD was significantly elevated in the ileum in the 15 days treated group compared to its respective control group. In the colon, SOD levels rose in the 15 and 30 days treated groups. Superoxide radicals are dismutated into hydrogen peroxide and molecular oxygen by the SOD enzyme [62].

Reduced glutathione (GSH) is an important endogenous non-enzymatic antioxidant. The tripeptide GSH act as a cofactor for other enzymes or reacts directly with ROS. In the present work, we observed that caffeine administration enhanced the concentration of glutathione (Fig. 8). In the same line, Renata V.A. et al. demonstrated that caffeine ingestion raised the concentration of GSH in rat brains [63].

Undoubtedly, caffeine has beneficial effects on the antioxidant properties in the gastrointestinal tract. It has been reported that the major molecular target of caffeine, adenosine receptors, are engaged in the control of ROS generation, influencing the origin and effect of free radicals in neuronal and other biological systems [5, 63].

Our study has several limitations. Other intestinal permeability biomarkers could be measured. For example, Diamine oxidase assesses the amount of mucosal injury and hence provides an indirect measure of intestinal permeability. Trans-epithelial electrical resistance for intestinal permeability measure. Additionally, tight junction proteins (TJ) assays to assess intestinal barrier function.

In conclusion, the results of this research revealed a potential association between caffeine administration and gastrointestinal changes in newborn rats. Caffeine improved gastrointestinal permeability through the maturation of the intestinal barrier. Indeed, it was able to decrease bacterial translocation to systemic organs and reduce D-Lactate levels in the blood system. Moreover, caffeine exhibited a protective property against intestinal oxidative stress in neonate rats. Despite the limitations, our preliminary results could open new perspectives in pediatric gastroenterology and support the addition of caffeine to Neonatal Intensive Care Units in our Hospitals. Further studies are needed to confirm caffeine effects at a micro-scale and provide relevant clinical information.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Ministry of High Education and Scientific Research of Algeria and Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety (LBGMSS) of Mustapha Stambouli (Mascara) for supporting this work.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest to report.

Funding

The Ministry of High Education and Scientific Research of Algeria and Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety (LBGMSS) of Mustapha Stambouli (Mascara).

References

- [1] Weström B, Arévalo Sureda E, Pierzynowska K, Pierzynowski SG, Pérez-Cano FJ. The immature gut barrier and its importance in establishing immunity in newborn mammals. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1153.
- [2] Hayes CL, Dong J, Galipeau HJ, Jury J, McCarville J, Huang X,... & Verdu EF. Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1-14.

- [3] Chiva M, Guarner C, Peralta C, et al. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2003;15(2):145-50.
- [4] Paluska SA. Caffeine and exercise. *Current Sports Medicine Reports*. 2003;2(4):213-9.
- [5] Amer MG, et al. Caffeine intake decreases oxidative stress and inflammatory biomarkers in experimental liver diseases induced by thioacetamide: Biochemical and histological study. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2017;30(1):13-24.
- [6] Banerjee P, et al. Fatal caffeine intoxication: a series of eight cases from 1999 to 2009. *Journal of Forensic Sciences*. 2014;59(3):865-8.
- [7] Ruiz-Moreno C, Lara B, Salinero JJ, de Souza DB, Ordovás JM, Del Coso J. Time course of tolerance to adverse effects associated with the ingestion of a moderate dose of caffeine. *European Journal of Nutrition*. 2020:1-10.
- [8] Santos-Silva TG, et al. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;58:237-42.
- [9] Rigatto H. Control of ventilation in the newborn. *Annual Review of Physiology*. 1984;46(1):661-74.
- [10] Kuzenko JA, Poala J. Apneic attacks in the newborn treated with aminophylline. *Arch Dis Child*. 1973;48:404-6.
- [11] Zulqarnain A, Hussain M, Suleri KM, et al. Comparison of Caffeine versus Theophylline for apnea of prematurity. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2019;35(1):113.
- [12] Nakaoka S, Kawasaki Y, Inomata S, Makimoto M, Yoshida T. Caffeine toxicity in a preterm neonate. *Pediatrics & Neonatology*. 2017;58(4):380-1.
- [13] Henderson-Smart DJ, Steer PA. Caffeine versus theophylline for apnea in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010 (1).
- [14] Schmidt B, Roberts RS, Davis P, et al. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(19):1893-902.
- [15] Gao X, Xie Q, Kong P, Liu L, Sun S, Xiong B,... & Xiang H. Polyphenol-and caffeine-rich postfermented pu-erh tea improves diet-induced metabolic syndrome by remodeling intestinal homeostasis in mice. *Infection and Immunity*. 2018;86(1):e00601-17.
- [16] Kleber Silveira A, Moresco KS, Mautone Gomes H, da Silva Morrone M, Kich Grun L, Pens Gelain D,... & Fonseca Moreira JC. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) alters gut microbiota and modulates redox status, partially via caffeine in Wistar rats. *Phytotherapy Research*. 2018;32(12):2466-74.
- [17] Moumen WC., Tir Touil A, Léké A, et al. Establishment of the intestinal microflora and regulation of bacterial translocation after caffeine citrate treatment during postnatal period in rat. *Archives de pédiatrie : organe officiel de la Société française de pédiatrie*. 2012;19(10):1015-20.
- [18] Wang H, Zhang W, Zuo L, et al. Bifidobacteria may be beneficial to intestinal microbiota and reduction of bacterial translocation in mice following ischaemia and reperfusion injury. *British Journal of Nutrition*. 2013;109(11):1990-8.
- [19] Lei Q, Bi J, Chen H, et al. Glucagon-like peptide-2 improves intestinal immune function and diminishes bacterial translocation in a mouse model of parenteral nutrition. *Nutrition Research*. 2018;49:56-66.
- [20] Li Y, Chen Y, Zhang J, et al. Protective effect of glutamine-enriched early enteral nutrition on intestinal mucosal barrier injury after liver transplantation in rats. *The American Journal of Surgery*. 2010;199(1):35-42.
- [21] Szalay L, Umar F, Khadem A, et al. Increased plasma D-lactate is associated with the severity of hemorrhagic/traumatic shock in rats. *Shock*. 2003;20(3):245-50.
- [22] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 1974;47(3):469-74.
- [23] Caliborne AL. Assay of catalase. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of Oxygen Radical Research*. Florida: CRC Press; 1985:196-201.
- [24] Moron MS, Depierre JW, Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects*. 1979;582(1):67-78.
- [25] Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 1949;177(2):751-66.
- [26] Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*. 1999;51(1):83-133.
- [27] Van Soeren MH, Graham TE. Effect of caffeine on metabolism, exercise endurance, and catecholamine responses after withdrawal. *Journal of Applied Physiology*. 1998;85(4):1493-501.
- [28] Kovacs EM, Lejeune MP, Nijs I, et al. Effects of green tea on weight maintenance after body-weight loss. *British Journal of Nutrition*. 2004;91(3):431-7.
- [29] Schmitt GC, Arbo MD, Lorensi AL, et al. Gender differences in biochemical markers and oxidative stress of rats after 28 days oral exposure to a mixture used for weight loss containing p-synephrine, ephedrine, salicin, and caffeine. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;52(1):59-68.

- [30] Zheng G, Sayama K, Okubo T, et al. Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. *In vivo*. 2004;18(1):55-62.
- [31] Shimoda H, Seki E, Aitani M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006;6(1):9.
- [32] Tofovic SP, Salah EM., Jackson EK, et al. Early renal injury induced by caffeine consumption in obese, diabetic ZSF1 rats. *Renal Failure*. 2007;29(7):891-902.
- [33] Cai W, Ran Y, Li Y, Wang B, Zhou L. Intestinal microbiome and permeability in patients with autoimmune hepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2017;31(6):669-73.
- [34] Barandouzi ZA, Lee J, Maas K, Starkweather AR, Cong XS. Altered Gut Microbiota in Irritable Bowel Syndrome and Its Association with Food Components. *Journal of Personalized Medicine*. 2021;11(1):35.
- [35] Almeida AAP, Farah A, Silva DA, et al. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(23):8738-43.
- [36] Duffy LC. Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine. *The Journal of Nutrition*. 2000;130(2):432S-436S.
- [37] Lichtman SM. Bacterial translocation in humans. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2001;33(1):1-10.
- [38] Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in Microbiology*. 1995;3(4):149-54.
- [39] Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2014;60(1):197-209.
- [40] Murray MJ, Barbose JJ, Cobb CF. Serum D (-)-lactate levels as a predictor of acute intestinal ischemia in a rat model. *Journal of Surgical Research*. 1993;54(5):507-9.
- [41] Sobhian B, Kröpfel A, Hölzenbein T, et al. Increased circulating D-lactate levels predict risk of mortality after hemorrhage and surgical trauma in baboons. *Shock*. 2012;37(5):473-7.
- [42] Ng PC. Biomarkers of necrotising enterocolitis. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2014:33-8.
- [43] Sun XQ, Fu XB, Rong-Zhang YL, et al. Relationship between plasma D (-)-lactate and intestinal damage after severe injuries in rats. *World Journal of Gastroenterology*. 2001;7(4):555.
- [44] Birkner E, Grucka-Mamczar E, Żwirska-Korczala K, et al. Influence of sodium fluoride and caffeine on the kidney function and free radical processes in that organ in adult rats. *Biological Trace Element Research*. 2006;109(1):35-47.
- [45] Oh M, Han M, Kim M, Park C, Kim Y, Lee J. Coffee consumption is associated with lower serum aminotransferases in the general Korean population and in those at high risk for hepatic disease. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2016;25(4):767-75.
- [46] Ding J, Zhang Y. Associations of coffee consumption with the circulating level of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. A meta-analysis of observational studies. *Journal of the American College of Nutrition*. 2021;40(3):261-72.
- [47] Boekschoten MV, Schouten EG, Katan MB. Coffee bean extracts rich and poor in Kahweol both give rise to elevation of liver enzymes in healthy volunteers. *Nutr J*. 2004;3(1):7.
- [48] Urgert R, Meyboom S, Kuilman M, Rexwinkel H, Vissers MN, Klerk M, Katan MB. Comparison of effect of cafetière and filtered coffee on serum concentrations of liver aminotransferases and lipids: six month randomised controlled trial. *BMJ*. 1996;313(7069):1362-6.
- [49] Onuegbu AJ, Olisekodiaka JM, Adebolu OE, Adesiyun A, Ayodele OE. Coffee consumption could affect the activity of some liver enzymes and other biochemical parameters in healthy drinkers. *Med Princ Pract*. 2011;20(6):514-18.
- [50] Handayani DR, Pratama AGN, Putra IWA. Effect of Ethanol Extract of Robusta Coffee (*Coffea canephora*) on the Function of the Liver and Kidney of Wistar Rat. In 12th Annual Scientific Meeting, Medical Faculty, Universitas Jenderal Achmad Yani, International Symposium on "Emergency Preparedness and Disaster Response during COVID 19 Pandemic" (ASMC 2021) (pp. 67-71). Atlantis Press.
- [51] Dianzani MU, Muzio G, Biocca ME, et al. Lipid peroxidation in fatty liver induced by caffeine in rats. *International Journal of Tissue Reactions*. 1991;13(2):79.
- [52] Manne V, Saab S. Coffee as modulator of liver injury: Fact and fiction. *Clinical Liver Disease*. 2015;6(6):139.
- [53] Fried PA, O'Connell CM. A comparison of the effects of prenatal exposure to tobacco, alcohol, cannabis and caffeine on birth size and subsequent growth. *Neurotoxicology and Teratology*. 1987;9(2):79-85.
- [54] Nyblom H, Björnsson E, Simrén M, et al. The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC. *Liver International*. 2006;26(7):840-5.
- [55] Amadi BA, Agomuo EN, Duru MKC. Toxicological studies of *Asmina triloba* leaves on haematology, liver, kidney using rat model. *International Science Research Journal*. 2013;4(2):11-7.
- [56] Emmanuel A, Majesty D, Benjamin A, et al. Effect of caffeine on some selected biochemical parameters using rat model. *Advances in Biology*. 2017.
- [57] Lushchak VI. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2016;42(2):711-47.

- [58] Djidel S, Bouaziz A, Bentehar A, et al. Effect of methanol extract prepared from leaf of *Pistacia lentiscus* on plasma antioxidant activity and biomarkers of oxidative stress in liver tissue of healthy rats. *Annual Research & Review in Biology*. 2018;1-10.
- [59] Kamat P, Bolor KK, Devasagayam TPA, et al. Differential modification by caffeine of oxygen-dependent and independent effects of γ -irradiation on rat liver mitochondria. *International Journal of Radiation Biology*. 2000;76(9):1281-8.
- [60] Kriško A, Kveder M, Pifat G. Effect of caffeine on oxidation susceptibility of human plasma low density lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 2005;355(1-2):47-53.
- [61] Nikolic J, Bjelakovic G, Stojanovic I. Effect of caffeine on metabolism of L-arginine in the brain. In *Guanidino Compounds in Biology and Medicine*. 2003:125-8.
- [62] Arslan A, Demir H, Ozbay M and Arslan H. Evaluation of Lipid Peroxidation and Some Antioxidant Activities in Patients with Primary and Metastatic Liver Cancer. *Journal of Cancer Therapy*. 2014;5(2):192-7.
- [63] Abreu RV, Silva-Oliveira EM, Moraes MFD, Pereira GS, Moraes-Santos T. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2011;99(4):659-64.

AUTHOR COPY