

Université Lille Nord de France

Ecole Doctorale Biologie – Santé de Lille

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE

Discipline : Nutrition

Présentée et soutenue publiquement par :

Henry BERNARD

Le 06 Décembre 2011

Modulation nutritionnelle de la réponse à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* dans différents fonds génétiques murins

Composition du jury :

Président : Professeur Frédéric GOTTRAND (Lille)

Rapporteurs : Professeur Dominique DARMAUN (Nantes)
Professeur Jean-Louis GAILLARD (Paris)

Examineur : Docteur Nana BARTKE (Friedrichsdorf, Allemagne)

Directeur de Thèse : Docteur Marie-Odile HUSSON (Lille)

Je dédie cette thèse :

A toi mon amour qui m'a toujours soutenu, tu m'as donné la force de persévérer, de croire en moi, sans toi je n'y serai jamais arrivé, je ne pourrai jamais assez te remercier.

A toi mon fils, tu remplis mon cœur de bonheur chaque jour depuis bientôt 2 ans. N'oublie jamais que les sacrifices sont toujours récompensés.

A Alain, Monique, Sophie, David, vous m'avez tellement soutenu tout au long de mes études, tellement supporté aussi, je vous remercie de tout mon cœur.

Remerciements

- *Je remercie*
- *Le docteur Marie-Odile Husson qui m'a encadré pendant ces trois années de travail. Merci d'avoir accepté de m'encadrer au-delà de la 1^{ière} année prévu au départ de ce projet. Merci pour vos conseils, votre disponibilité, votre aide, votre dynamisme. Nous avons découvert ensemble un monde inconnu pour nous deux, celui des prébiotiques, et cette aventure fut très riche en de nombreux points.*
- *Le professeur Frédéric Gottrand pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci pour votre confiance, pour vos précieux conseils, votre disponibilité et votre soutien tout au long de ces trois années, je suis très fier d'avoir fait ma thèse dans votre laboratoire.*
- *Les professeurs Dominique Darmaun et Jean-Louis Gaillard pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci d'avoir pris sur votre temps précieux pour juger ce travail.*
- *Le Docteur Nana Bartke de « Danone Research – Centre for Specialised Nutrition, Milk Research & functional Innovations » en Allemagne pour son implication tout au long de ma thèse, pour vos conseils scientifiques et d'avoir accepté de juger ce travail. Grâce à ce projet vous avez fait naître en moi un profond intérêt pour ces mondes si complexes que sont les prébiotiques et la flore intestinale. Merci de m'avoir permis de voyager jusqu'en Slovaquie, de votre soutien financier. J'espère que nous pourrons encore travailler ensemble dans le futur.*
- *Le Docteur Jean Luc Desseyn de m'avoir proposé ce sujet de thèse, sans vous je n'aurai pas pu vivre ces trois années, dures, mais si intéressantes. Un immense merci. Merci aussi pour vos conseils, votre soutien.*
- *Les filles du laboratoire, le Docteur Valérie Gouyer, Hélène, Ségolène et Emilie pour votre soutien, vos conseils et votre bonne humeur de tous les jours.*
- *Le docteur Hélène Tiesset de m'avoir appris l'infection à Pseudomonas aeruginosa chez la souris et les différentes méthodologies utilisées dans le laboratoire.*

- *L'ensemble des personnes du laboratoire de biologie moléculaire qui m'ont donné l'accès à leur paillasse et leur matériel. Merci à Stéphanie pour ses conseils.*
- *Les associations ANTADIR, Vaincre la mucoviscidose de votre soutien financier et scientifique que vous avez accordés au cours de ce projet.*
- *La société BLEEDINA SA, également pour son soutien financier dans le cadre de mon contrat CIFRE.*
- *Merci aussi à toutes les personnes que j'ai oublié, je m'en excuse, je ne manquerai pas de vous remercier lorsque l'on se verra.*

Résumé

Certains composants nutritionnels sont capables de moduler la réaction inflammatoire et la réponse immune. Ils pourraient être très utiles dans l'augmentation de la résistance de l'hôte aux maladies infectieuses, en particulier dans l'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* qui est caractérisée par une réponse inflammatoire excessive et dont la sévérité est associée à une réponse immunitaire de type Th2.

Le premier objectif de ce travail a été de tester l'effet anti-inflammatoire d'un régime enrichi en acides gras polyinsaturés n-3 (EPA/DHA) au cours d'une infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa* sur des souris déficientes pour le gène *cftr*. Des résultats antérieurs suggérant que les souris femelles sont plus sensibles à l'infection que les souris mâles, les bénéfices de cette alimentation ont été analysés selon le sexe des souris. Le second objectif a été d'étudier l'effet des oligosaccharides acides dérivés de la pectine de *Citrus* (pAOS) au cours d'une infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa*. L'hypothèse testée était que les pAOS en favorisant le balancement de la réponse Th2 vers une réponse Th1 pourraient améliorer le pronostic de l'infection. Leur effet immunomodulateur a été évalué chez deux différents fonds génétiques murins : des souris BALB/c et C57BL/6 connues pour développer respectivement une réponse immune de type Th2 et Th1.

Ces 3 études sont basées sur l'administration endo-trachéale d'une suspension de *P. aeruginosa* pour l'infection aiguë ou de *P. aeruginosa* inclus dans des billes d'agar pour une infection chronique chez des souris nourries pendant 6 semaines (souris *cftr*^{-/-}) et 5 semaines (BALB/c et C57BL/6) par une diète contrôle ou d'une diète spécifique. Les paramètres cliniques mesurés sont la survie et la clairance bactérienne pulmonaire, et les paramètres biologiques sont, pour la réponse inflammatoire, le dénombrement des polynucléaires, des macrophages et le dosage de cytokines pro- et anti-inflammatoires et pour la réponse immune le dosage des cytokines Th1 et Th2, l'expression de marqueurs de différenciation des lymphocytes Th1, Th2 et de polarisation des macrophages M1 et M2. Les souris BALB/c et C57BL/6 survivant à une première infection ont été réinfectées et leur charge bactérienne pulmonaire a été mesurée.

Nos résultats démontrent que EPA/DHA améliorent le pronostic de l'infection à *P. aeruginosa* chez les souris *cftr*^{-/-}. Il diminue la réponse inflammatoire pulmonaire des souris mâles et diminue la mortalité et la lésion pulmonaire des souris femelles. Les pAOS

diminuent la charge bactérienne pulmonaire au cours de la 1^{ère} et de la 2^{ème} infection pour les souris BALB/c. Ce résultat est associé à un balancement de la réponse Th2 vers Th1 et M2 vers M1 ainsi qu'à une augmentation du recrutement des polynucléaires et des macrophages et des cytokines pro-inflammatoires au niveau du lavage broncho-alvéolaire, contrôlée par une augmentation de la réponse anti-inflammatoire en fin d'infection. Chez les souris C57BL/6, les pAOS diminuent la mortalité mais n'améliorent pas la clairance bactérienne pulmonaire lors d'une 1^{ère} infection. Ce bénéfice n'apparaît cependant pas lié à une augmentation de la réponse immune Th1, mais plutôt à une augmentation de la réponse anti-inflammatoire et une augmentation du recrutement des polynucléaires et des macrophages. Chez les C57BL/6, les pAOS améliorent également la clairance bactérienne lors d'une 2^{ème} infection.

En conclusion, en utilisant différents fonds génétiques de souris, nous démontrons qu'un régime enrichi en EPA/DHA ou en pAOS peut améliorer le pronostic de l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Le bénéfice observé avec l'EPA/DHA est associé à son activité anti-inflammatoire qui, chez des souris très sensibles comme les souris *cftr*^{-/-}, femelles diminue la mortalité et la lésion pulmonaire. Les pAOS semblent avoir un mécanisme d'action différent selon le type de souris. Leur propriété étant de balancer la réponse Th2 vers Th1, cet effet a surtout été observé chez les souris BALB/c. Le bénéfice clinique observé chez les souris C7BL/6 est plus dépendant d'une augmentation de la réponse anti-inflammatoire que d'une modulation de la réponse Th1. Ces résultats doivent maintenant être corrélés à l'analyse de la flore intestinale et des produits de fermentation des pAOS (acides gras à chaînes courtes).

Les pAOS, en diminuant la charge bactérienne au cours de la 1^{ère} et 2^{ème} infection, apparaissent très intéressants pour limiter les exacerbations pulmonaires à *P. aeruginosa* notamment dans la mucoviscidose. Ils doivent maintenant être étudiés chez les souris *cftr*^{-/-}. En outre, l'EPA/DHA et les pAOS ayant des mécanismes d'action complémentaires, il sera intéressant dans l'avenir d'étudier leur effet synergique.

Abstract

Some nutritional components are able to modulate the inflammatory response and the immune response. They could be very useful in increasing the host resistance to infectious diseases, particularly in the *P. aeruginosa* pulmonary infection which is characterized by an excessive inflammatory response and the severity of which is associated with a Th2 type immune response.

The first objective of this study was to test the anti-inflammatory effect of a diet enriched in n-3 polyunsaturated fatty acids (EPA/DHA) during an acute pulmonary infection with *P. aeruginosa* in mice deficient for the *cftr* gene. Because previous results suggested that female mice are more susceptible to infection than male mice, the benefits of this diet were analyzed according to the mice gender. The second objective was to study the effect of acidic oligosaccharides derived from *Citrus* pectin (pAOS) during a chronic lung infection with *P. aeruginosa*. The hypothesis was that pAOS by promoting the balancing of the Th2 response towards a Th1 response could improve the prognosis of the infection. Their immunomodulatory effect was evaluated in two different murine genetic backgrounds : BALB/c and C57BL/6, known to develop respectively a Th2 and a Th1 immune response.

These three studies are based on the endotracheal administration of a suspension of *P. aeruginosa* for the acute infection or *P. aeruginosa* embedded in agar beads for the chronic infection in mice fed a control diet or a specific diet for 6 weeks (*cftr*^{-/-} mice) or 5 weeks (BALB/c and C57BL/6). The clinical parameters measured were survival and pulmonary bacterial clearance. Biological parameters for the inflammatory response were the polymorphonuclear cells and macrophages counting and pro- and anti-inflammatory cytokines assay in the bronchoalveolar lavage, and for the immune response the Th1 and Th2 cytokines assay, the expression of differentiation markers of Th1 and Th2 cells and M1 and M2 macrophages. BALB/c and C57BL/6 surviving at the first infection were re-infected and the pulmonary bacterial load was measured.

Our results demonstrate that EPA/DHA improve the prognosis of infection with *P. aeruginosa* in *cftr*^{-/-} mice. They reduce the pulmonary inflammatory response in male mice and decrease mortality and lung injury in female mice. The pAOS reduce the pulmonary bacterial load in the first and second infection for BALB/c. This result is associated with a switch of the Th2 to Th1 response and of M2 to M1 macrophages polarization. The pAOS

increase neutrophils and macrophages recruitment and pro-inflammatory cytokines in the bronchoalveolar lavage, controlled by an increase in the anti-inflammatory cytokines at the end of the infection. In C57BL/6, pAOS reduce mortality but do not improve bacterial clearance during the 1st lung infection. This benefit is not however linked to an increase in the Th1 immune response, but rather to an increase in the anti-inflammatory response and in neutrophils and macrophages recruitment. In C57BL/6 mice, pAOS also enhance bacterial clearance during a second infection.

In conclusion, using mice with different genetic backgrounds, we demonstrate that a diet enriched with EPA/DHA or pAOS can improve the prognosis of *P. aeruginosa* pulmonary infection. The benefit observed with the EPA/DHA diet is associated with its anti-inflammatory properties in highly susceptible mice such as *cftr*^{-/-} females mice, thus decreasing the mortality and lung injury. The pAOS seem to have a different mechanism of action depending on the mouse. Their property is to balance the Th2 to Th1 response, this effect was mainly observed in BALB/c. The clinical benefit observed in C7BL/6 mice is more dependent of an increase of the anti-inflammatory response rather than a modulation of the Th1 response. These results must now be correlated to the analysis of the intestinal flora and fermentation products of pAOS (short-chain fatty acids).

The pAOS, decreasing the bacterial load in the 1st and 2nd infection, appear very attractive to reduce pulmonary exacerbations due to *P. aeruginosa* infection, particularly in cystic fibrosis. They are now being studied in *cftr*^{-/-} mice. In addition, EPA/DHA and pAOS having complementary mechanisms of action, it will be interesting in the future to study their synergistic effect.

Communications

Communications orales en français:

H. Bernard, F Gottrand, N. Bartke, B. Stahl, M.O. Husson. Effets immunomodulateurs d'oligosaccharides acides spécifiques sur l'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* (C57BL/6 et BALB/c). 8^{èmes} Journées Francophones de Nutrition, Lille Grand Palais, 8-10 Décembre 2010.

H. Bernard, F Gottrand, N. Bartke, B. Stahl, M.O. Husson. Effet immunomodulateur des oligosaccharides acides spécifiques dans un modèle murin d'infection pulmonaire chronique à *Pseudomonas aeruginosa* (BALB/c). 32e congrès GFHGNP - Palais des Congrès (Liège-Belgique) - 31 mars au 2 avril 2011

Communications orales en anglais:

H. Bernard, F Gottrand, N. Bartke, B. Stahl, M.O. Husson. Immunomodulatory effects of acidic oligosaccharides on *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. 4th European CF Young Investigator Meeting, Faculty of Medicine of Lille, France, 24th-27th August 2010.

H. Bernard, F Gottrand, N. Bartke, B. Stahl, M.O. Husson. Dietary Supplementation of Specific Acidic Oligosaccharides Improve the Immune Response in BALB/c Mice with *Pseudomonas Aeruginosa* Chronic Pulmonary Infection. International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics - IPC2011, 14th - 16th June 2011, Kosice, Slovakia.

Communications affichées:

H. Bernard, F. Gottrand, M.O. Husson. Influence des acides gras poly insaturés n-3 à longue chaîne sur la réponse inflammatoire et la résistance des souris *cftr*^{-/-} vis-à-vis de l'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*. Les Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive, Palais des Congrès, Paris, 25-28 Mars 2010.

H. Bernard, F Gottrand, N. Bartke, B. Stahl, M.O. Husson. Immunomodulatory effects of acidic oligosaccharides on *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. 4th European CF Young Investigator Meeting, Faculty of Medicine of Lille, France, 24th-27th August 2010.

H. Bernard, F Gottrand, N. Bartke, B. Stahl, M.O. Husson. Immunomodulatory effects of acidic oligosaccharides on *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. 10^{ième} Journée André VERBERT, colloque annuel des doctorants, Faculté de Médecine, pôle recherche, Lille, 15 Septembre 2010.

H. Bernard, F Gottrand, N. Bartke, B. Stahl, M.O. Husson. Dietary supplementation of specific acidic oligosaccharides improve the immune response in BALB/c mice with *Pseudomonas aeruginosa* chronic pulmonary infection. 44th ESPGHAN Annual Meeting, Sorrento, Italy, 25th -28th May 2011.

Publications en rapport avec le travail

Tiesset H*, **Bernard H***, Bartke N, Beermann C, Flachaire E, Desseyn JL, Gottrand F, Husson MO. (n-3) Long-Chain PUFA Differentially Affect Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Infection of Male and Female *cftr*^{-/-} Mice. *J. Nutr*, 141(6):1101-7 (2011)

* co-auteurs

Bernard H, Gottrand F, Bartke N, Stahl B, Husson M.O. Pectin derived acidic oligosaccharides improve the outcome of *Pseudomonas aeruginosa* chronic pulmonary infection in BALB/c mice by polarizing M1 and Th1 response (en rédaction).

Table des matières

Table des illustrations	16
Liste des abréviations	18
INTRODUCTION.....	22
I. L'infection pulmonaire à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
A. Mécanisme de défense mécanique.....	25
B. Mécanisme de défense innée.....	25
1. Les peptides cationiques.....	26
2. Interaction de composés bactériens sur des récepteurs cellulaires spécifiques	26
3. Les neutrophiles	27
4. Les macrophages.....	28
5. Le complément.....	28
C. Mécanisme de défense adaptative spécifique à <i>P. aeruginosa</i>	29
1. Bref rappel de la différenciation des lymphocytes Th et Treg	29
2. Action de <i>P. aeruginosa</i> sur la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2	41
II. Particularités de l'infection à <i>P. aeruginosa</i> dans la mucoviscidose.....	45
A. Manifestations cliniques observées dans la mucoviscidose.....	46
1. Manifestations pulmonaires.....	46
2. Manifestations digestives	46
B. Particularités de l'infection pulmonaire dans la mucoviscidose	47
1. Réaction inflammatoire liée à une dérégulation de la production de cytokines et à une dérégulation du métabolisme des lipides	48
2. Anomalies des défenses mécaniques.....	49

3.	Anomalies de la réponse innée	49
4.	Anomalies de la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2 et des macrophages M1 et M2	50
III.	Les acides gras polyinsaturés à longues chaînes	51
A.	Métabolisme des acides gras poly-insaturés essentiels.....	52
B.	Métabolisme de l'acide arachidonique et principales propriétés de ses métabolites.....	53
C.	Métabolisme de l'EPA et principales propriétés de ses métabolites	55
IV.	Les oligosaccharides	56
A.	Origines et structure.....	56
1.	Les oligosaccharides du lait humain	56
2.	Les oligosaccharides dérivés des végétaux	57
B.	Définition des prébiotiques	59
C.	Actions immunomodulatrices des oligosaccharides.....	59
1.	Effets immunomodulateurs des oligosaccharides indépendants de la flore intestinale	59
2.	Action des oligosaccharides sur la flore intestinale	62
3.	Propriétés immunomodulatrices des oligosaccharides dépendantes de leur action sur la flore intestinale	63
V.	Rôle de la flore intestinale sur le développement de la réponse immune	65
A.	Le tissu lymphoïde associés au tube digestif	66
1.	Structure des principaux organes lymphoïdes du GALT	67
2.	Différenciation des lymphocytes Thelpers au niveau intestinal	68
B.	Mise en évidence du rôle de la flore intestinale dans le développement du système immunitaire	69
1.	Les animaux axéniques.....	69
2.	Les animaux gnotobiotiques	71

3.	Déséquilibre de la flore intestinale et désordres immunologiques	71
C.	Les principales bactéries impliquées dans le développement du système immunitaire.....	72
1.	Définition des probiotiques.....	72
2.	Les lactobacilles.....	73
3.	Les bifidobactéries	74
D.	Mécanismes d'action de la flore intestinale dans le développement du système immunitaire.....	76
1.	Interaction des cellules dendritiques avec la flore intestinale	76
2.	Interaction des cellules épithéliales intestinales avec la flore intestinale	80
3.	Les acides gras à chaînes courtes et le développement du système immunitaire	81
4.	Principales propriétés des bifidobactéries et des lactobacilles	82
	OBJECTIFS DE TRAVAIL	88
	RESULTATS	91
I.	Impact du régime enrichi en EDA+DHA dans la résistance à l'infection pulmonaire des souris <i>cftr</i> ^{-/-} mâles et femelles	92
II.	Impact des pAOS dans l'infection pulmonaire chronique à <i>P. aeruginosa</i> chez les souris BALB/c.....	103
III.	Impact des pAOS dans l'infection pulmonaire chronique à <i>P. aeruginosa</i> chez les souris C57BL/6	121
	ANALYSE DES RESULTATS ET DISCUSSION.....	134
I.	Impact du régime enrichi en EDA+DHA dans la résistance à l'infection pulmonaire des souris <i>cftr</i> ^{-/-} mâles et femelles	135
A.	Concentration initiale des acides gras et de leurs dérivés dans les membranes cellulaires des poumons et du foie et modification de ces concentrations par le régime	136
B.	Mesure de la prise de poids avant l'infection.....	137

C.	Influence du régime EPA/DHA sur la résistance à l'infection	137
II.	Impact du régime enrichi en pAOS dans la résistance à l'infection pulmonaire des souris BALB/c.....	140
III.	Impact du régime enrichi en pAOS dans la résistance à l'infection pulmonaire des souris C57BL/6	142
A.	Analyse de la susceptibilité des souris nourries par la diète contrôle.....	142
B.	Comparaison de la susceptibilité des souris C57BL/6 et BALB/c nourries par la diète contrôle.....	143
C.	Effet de pAOS chez les souris C57BL/6.....	144
IV.	Mécanismes d'action des pAOS.....	145
A.	Les pAOS ont des propriétés immunomodulatrices et peuvent réduire une réponse Th2 préexistante.....	145
B.	Les pAOS prolongent le recrutement des neutrophiles et des macrophages	146
C.	Les pAOS renforcent l'immunité anti-infectieuse.....	146
	CONCLUSION.....	150
	BIBLIOGRAPHIE.....	152

Table des illustrations

Figure 1 : Régulation du mécanisme de quorum-sensing chez *P. aeruginosa*

Figure 2 : Les cellules dendritiques et la régulation de la réponse immune Thelper

Figure 3 : Les différentes sous populations de macrophages et leurs marqueurs

Figure 4 : Utilisation de la L-arginine par les macrophages activés

Figure 5 : La synapse immunologique entre une cellule présentatrice d'antigènes et un lymphocyte T naïf

Figure 6 : Les différents Lc T helper, leurs fonctions, leurs cytokines spécifiques, leurs facteurs de transcription caractéristiques, et les cytokines essentielles pour leur différenciation

Figure 7 : Les différents mécanismes impliqués dans la différenciation des Lc Th1 et Th2

Figure 8 : La réponse immunitaire adaptative observée au cours d'une infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa*

Figure 9 : Importance du 3-oxo-C12-HSL dans la pathogénèse de l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa*

Figure 10 : Structure et nomenclature des principales familles d'acides gras poly-insaturés

Figure 11 : Voies de biosynthèse des AGPI-LC à partir des AGPI précurseurs essentiels et voies métaboliques des eicosanoïdes

Figure 12 : Biosynthèse des eicosanoïdes à partir des AGPI-LC

Figure 13 : Structure biochimique des lcFOS

Figure 14 : Structure biochimique des scGOS

Figure 15 : Structure biochimique des pAOS

Figure 16 : Structure des principaux organes lymphoïdes du GALT

Figure 17 : Schéma de la recirculation des Lc à partir de l'intestin et de la peau

Figure 18 : Coupe histologique de rate et de colon de souris C57BL/6 axéniques et de souris colonisées par des bactéries intestinales

Figure 19 : Arbre phylogénétique des lactobacilles

Figure 20 : Arbre phylogénétique des bifidobactéries

Figure 21 : La réponse immune locale intestinale induite par l'interaction des bactéries probiotiques avec les cellules épithéliales et les cellules immunitaires

Tableau I : Les différents composés bactériens de *P. aeruginosa* capables de se fixer sur les TLR

Tableau II : Effets de différentes espèces de probiotiques sur les cellules dendritiques

Tableau III : Effets des probiotiques dans les phénomènes allergiques : exemple de modèles ex vivo d'allergie et de différentes études cliniques

Tableau IV : Effets des probiotiques dans les infections extra-intestinales, exemples d'études expérimentales *in vivo* et clinique

Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

AGCC : Acides gras à chaînes courtes

AGPI : Acides gras poly-insaturés

AGPI-LC : Acides gras poly-insaturés à longues chaînes

AHL : Acylhomosérine lactone

Arg1 : Arginase 1

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messagers

ARNr 16S : ARN ribosomales 16S

BPCO : Broncho-pneumopathies chroniques obstructive

C12-HSL : N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone ; 3-oxo-C12-HSL

C4-HSL : N-butyryl-L-homoserine lactone

CCL : Chemokine (C-C motif) ligand

CCR : C-C chemokine receptor

CD : Cellules dendritiques

CD11b : Cluster of Differentiation 11b

CEI : cellules épithéliales intestinales

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CFU : Colony forming unit

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

COX : Cyclooxygenase

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand

CXCR : CXC chemokine receptors

DA : Dermatite atopique

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

DHA : Acide docosahexaénoïque

EET : Acide epoxyeicosatriénoïque

eNOS ou NOS1 : NOS endothéliale

EPA : Acide eicosapenténoïque

FAO : Food and Agriculture Organisation

FOS : Fructooligosaccharides

Foxp3 : Forkhead box P3

Fuc : Fucose

G+C : Guanine et Cytosine

Gal : Galactose

GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue

GATA3 : GATA binding protein 3

G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor

Glc : Glucose

GlcNAc : N-acetylglucosamine

GM-CSF : Granulocytes Monocytes Colony Stimulating Factor

GOS : Galactooligosaccharides

HETE : Acide hydroxyeicosatétraénoïque

HLA-DR : Human leukocyte antigen

HOCL : Acide hypochloreux

ICAM-1 : Inter-Cellular Adhesion Molecule 1

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline E

IL : Interleukine

iNOS ou NOS2 : NOS inducible

KC : Keratinocyte-derived chemokine

KO : Knockout

LBA : Lavage bronchoalvéolaire

Lc : Lymphocytes

Lc Th : Lymphocyte T facilitateur ou helper

Lc Th0 : Lc T naïfs

Lc Treg : Lymphocytes T régulateur

lcFOS : FOS à chaînes longues

Le^X : Lewis x

LOX : Lipoxygénase

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Leucotriènes

LT- α : Lymphotoxine- α

LTA : Acide lipotéichoïque

M : Microfold

M1 : Macrophages classiques

M2 : Macrophages à activation alternative

MLN : Ganglions mésentériques lymphoïdes

mM : millimolaire

mmol : millimole

MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88

NaCl : Chlorure de sodium

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

Neu5Ac : Acide sialique, acide N-acetylneuraminique

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

NF κ B : Nuclear factor kappa B

nNOS ou NOS3 : NOS neuronale

NO : Oxyde nitrique

NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domains

NOS : NO synthase

OMS : Organisation mondiale de la Santé

OS : Oligosaccharides

PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns

pAOS : Oligosaccharides acides dérivés de la pectine

PBMC : Cellules mononuclées collectées du sang périphérique

PG : Prostaglandines

PP : Plaques de Peyer

PPARs : Peroxisome proliferator-activated receptors

PRRs : Pattern Recognition Receptors

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

QS : Quorum sensing

REG3 γ : Regenerating islet-derived protein 3 gamma

RNI : Intermédiaires réactifs nitrés

ROI : Intermédiaires réactifs oxygénés

ROR- γ : RAR-related orphan receptor

scFOS : Fructooligosaccharides à chaînes courtes

Siglec : Sialic acid binding Ig-like lectins

scGOS : Galactooligosaccharides à chaînes courtes

Smad3 : Mothers against decapentaplegic homolog 3

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

T-bet : T-box transcription factor 21, tbx21

TCR : T cell receptor

TGF- β : Transforming growth factor- β

Th : T helper

TLR : Toll like receptor

TNF- α : Tumor necrosis factor α

TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin

TX : Thromboxanes

INTRODUCTION

I. L'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est un bacille à Gram-négatif, ubiquitaire présent dans l'environnement (eau, sol, plantes). Il peut être responsable d'infections sévères, notamment chez les patients immunodéprimés (septicémies, pneumopathie, infections urinaires,...). Il est également le principal agent infectieux impliqué dans les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO), les pneumopathies nosocomiales et les infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose. Chez ces patients, les infections broncho-pulmonaires à *P. aeruginosa* représentent la première cause de mortalité et de morbidité.

P. aeruginosa produit un grand nombre de facteurs de virulence qui lui permettent :

- d'adhérer au tissu pulmonaire (grâce au pili et au lipopolysaccharide (LPS)) et aux mucines, en particulier aux mucines bronchiques (flagelle) ;
- de se multiplier en captant les éléments nécessaires comme le fer (sidérophores) ;
- de lyser les cellules (phospholipases, exotoxine U, ...) ;
- de détruire le surfactant pulmonaire (phospholipase) ou le tissu pulmonaire (élastase) ;
- de dégrader les protéines comme le fibrinogène, le plasminogène, les composants du complément, les immunoglobulines (protéases, protéase alcaline) ou d'inhiber leur synthèse (exotoxine A) ;
- de résister à la phagocytose et d'induire l'apoptose des leucocytes (exotoxine S) ;
- de former des microcolonies et de s'entourer de polysaccharides pour former un biofilm à la surface des muqueuses.

La majorité de ces facteurs de virulence ne s'expriment que selon l'environnement de la bactérie. Cette adaptation est contrôlée par un système de communication entre les bactéries appelé quorum sensing (QS) permettant de coordonner la sécrétion des facteurs de virulence (1). Ce système est basé sur la production de molécules diffusibles. Chez les bactéries à Gram-négatif, ces molécules sont majoritairement des acylhomosérine lactones

(AHL).

Deux grands systèmes de QS sont présents chez *P. aeruginosa* :

- **Le système LasI/LasR.** Ce système intervient dans la synthèse d'élastase. LasI code une enzyme intervenant dans la synthèse d'une AHL appelée N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL ou C12-HSL). C12-HSL se fixe sur un activateur transcriptionnel lasR et le complexe formé active la transcription de nombreux gènes (*lasA*, *lasB*, *aprA*...);
- **Le système RhII/RhIR.** Ce système intervient dans la synthèse de rhamnolipides. RhII code une enzyme intervenant dans la synthèse d'une autre AHL appelée N-butyryl-L-homoserine lactone (C4-HSL). C4-HSL se fixe sur l'activateur transcriptionnel RhIR et le complexe active la transcription de nombreux gènes (*rhII*, *psl*, *pel*,...).

Ce mécanisme est résumé à la **Figure 1**.

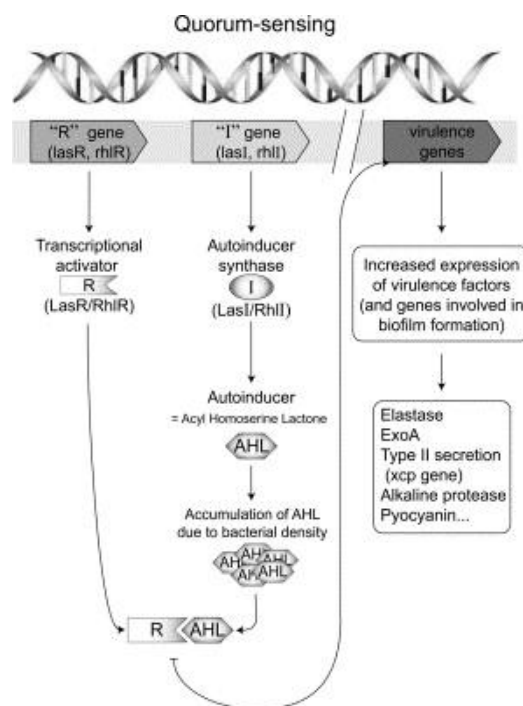


Figure 1 : Régulation du mécanisme de quorum-sensing chez *P. aeruginosa*. Les gènes I (*lasI* et *rhII*) codent des autoinducteurs synthèses qui synthétisent des autoinducteurs (AHL). Ces derniers diffusent dans l'environnement et s'accumulent suite à l'augmentation de la densité bactérienne au cours de l'infection. A partir d'un certain seuil, les AHL se fixent sur des activateurs transcriptionnels (LasR, RhIR) formant des complexes qui activent l'expression de gènes de virulence (2).

Trois mécanismes sont impliqués dans la réponse de l'hôte à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Ils correspondent à :

- un mécanisme de défense mécanique ;
- un mécanisme d'immunité innée ;
- un mécanisme d'immunité adaptative comprenant une phase cellulaire avec la différenciation de lymphocytes (Lc) T et une phase humorale avec la production d'anticorps (Ac).

A. Mécanisme de défense mécanique

Le mécanisme de défense mécanique des infections pulmonaires à *P. aeruginosa* repose essentiellement sur son piégeage par les mucines bronchiques qui sont ensuite rejetées par « l'ascenseur mucociliaire ».

B. Mécanisme de défense innée

La réponse innée met en jeu des mécanismes de protection non spécifiques contre les pathogènes (3). Elle repose principalement :

- sur la sécrétion au niveau de l'arbre respiratoire de substances microbicides notamment les peptides cationiques ;
- sur l'interaction de motifs moléculaires liés aux pathogènes ou « *Pathogen-Associated Molecular Patterns* » (PAMPs) avec des récepteurs de motifs ou « *Pattern Recognition Receptors* » (PRRs) qui conduit à l'activation du « *Nuclear Factor Kappa B* » (NFkB) ;
- sur l'intervention des neutrophiles, des macrophages et du complément.

1. Les peptides cationiques

Les **peptides cationiques** sont des peptides de plus de 20 à 50 acides aminés aux propriétés amphiphiles (4). Ils sont divisés en 3 grands groupes : les peptides linéaires formant des hélices α (cécropines, magainines), les peptides riches en cystéine avec un ou plusieurs ponts disulfure (α - et β -défensines) et les peptides contenant un fort pourcentage d'un type d'acide aminé (histidine, tryptophane, proline, glycine). Ils présentent un large spectre d'activité anti-bactérienne, anti-fongique, voire anti-virale. Leur action anti-bactérienne repose essentiellement sur la perméabilisation des membranes bactériennes. Ils sont synthétisés par les cellules de l'épithélium, les glandes sous-muqueuses des bronches et les polynucléaires neutrophiles (5). Ils peuvent également participer au recrutement des cellules phagocytaires et des Lc au site d'infection en agissant comme chimiokines. Leur expression peut être modulée par des cytokines spécifiques de la réponse T helper 2 (Th 2). L'exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines à des cytokines telles que l'interleukine 4 (IL-4) et l'IL-13 supprime l'expression de la β -défensine 2 humaine et diminue l'activité antimicrobienne de ces cellules.

2. Interaction de composés bactériens sur des récepteurs cellulaires spécifiques

Les constituants bactériens de *P. aeruginosa* susceptibles d'être impliqués dans l'immunité innée sont le LPS et les lipoprotéines de la membrane externe, le flagelle et l'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien. Les récepteurs cellulaires capables de reconnaître les différents composés bactériens de *P. aeruginosa* sont le Toll-Like Receptor 2 (TLR2) pour les lipoprotéines, le TLR4 pour le LPS, le TLR5 pour le flagelle et le TLR9 pour l'ADN bactérien. Les principaux TLRs et leurs PAMPs impliqués dans l'infection à *P. aeruginosa* sont représentés dans le **Tableau I**.

Ligands	TLR
Lipoprotéine/lipopeptides, peptidoglycanes,	TLR2
Lipopolysaccharides	TLR4
Flagelle	TLR5
ADN	TLR9

Tableau I : Les différents composés bactériens de *P. aeruginosa* capables de se fixer sur les TLR.

Les TLR sont exprimés par différents types cellulaires (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, cellules endothéliales, lymphocytes, cellules épithéliales). Ils sont localisés à leur surface mais il existe des localisations spécifiques. Le TLR5 est présent à la surface basolatérale des cellules épithéliales et le TLR4 est exprimé à l'intérieur des cellules alvéolaires, des cellules épithéliales respiratoires et des cellules trachéales bronchiques (6). Ces TLRs sont couplés au facteur d'adaptation appelé « *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88* » (MyD88). L'interaction des constituants bactériens sur les récepteurs couplés au MyD88 engendre un signal qui conduit à une cascade d'événements intracellulaires. La conséquence est l'activation du facteur de transcription NFκB qui stimule la synthèse de nombreux facteurs inflammatoires (7,8). Dans les voies respiratoires, les principales cytokines inflammatoires sont le « *Tumor Necrosis Factor-α* » (TNF-α), l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8. Le rôle de la voie d'activation de NFκB et des différents TLR dans la réponse immune a été mis en évidence essentiellement à l'aide de souris déficientes en MyD88 et en TLR. Les souris MyD88^{-/-} montrent une hypersensibilité à l'infection et meurent très rapidement. Elles ne produisent que très peu de cytokines, l'afflux des neutrophiles dans les poumons est limité et la clairance bactérienne est nulle (9,10), par contre les souris déficientes pour le TLR2, et/ou le TLR4 (11) et le TLR5 (12) ne sont pas plus sensibles à l'infection que les souris sauvages. Ces résultats montrent que le LPS, les lipoprotéines et le flagelle (TLR5) pris indépendamment ne sont pas essentiels pour déclencher l'activation de NFκB. Leur action est complémentaire et pourrait continuer à déclencher cette réponse quelles que soient les modifications phénotypiques de la bactérie.

3. Les neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules recrutées lors d'une infection par un microorganisme, notamment lors d'une infection pulmonaire (13). Ils sont attirés au lieu d'infection par les chimiokines libérées par les macrophages et les autres cellules présentes au lieu d'inflammation ou d'infection. Leur principale propriété est de phagocyter les microorganismes et les débris cellulaires et de sécréter des molécules bactéricides et/ou cytotoxiques, comme les défensines, les protéases à sérine, la cathepsine G, l'élastase et la protéinase 3, stockées dans des granules azurophiles. Ils produisent aussi des dérivés actifs de l'O₂, comme l'oxyde nitrique (NO) et des dérivés actifs de l'oxygène comme

des ions superoxyde (O_2^-), grâce à leur expression de la Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxydase (NADPH-oxydase) à la membrane plasmique. Les radicaux O_2^- produits par la NADPH-oxydase ont une durée de vie très courte et sont rapidement hydrolysés en peroxyde d'hydrogène qui sert de substrat à la myéloperoxydase des neutrophiles pour former des dérivés chlorés fortement cytotoxiques. Les neutrophiles sont également capables de produire des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-8), l'IL-8 étant la cytokine majoritairement produite. *P. aeruginosa* en secrétant des C12-HSL, qui stimulent la production d'IL-8 par les cellules épithéliales, pourrait intervenir directement dans le recrutement et la fonction des neutrophiles et exercer un effet cytotoxique en stimulant leur apoptose (14).

4. Les macrophages

Les macrophages sont également des cellules clefs dans la réponse innée. Ils interviennent dans la phagocytose, cette dernière étant favorisée par le système du complément. L'implication de *P. aeruginosa* dans l'activation des macrophages classiques (M1) ou des macrophages à activation alternative (M2) est développée dans le chapitre suivant.

5. Le complément

Les principaux effets biologiques de l'activation du complément sont :

- l'induction de la réponse inflammatoire par la libération d'anaphylatoxines ;
- l'opsonisation des microorganismes sur les cellules phagocytaires. Cette étape permet la mise en place d'une molécule intermédiaire entre les cellules phagocytaires et les bactéries ou les cellules mortes à phagocyter ;
- la lyse des membranes des microorganismes ;
- la présentation de l'antigène (Ag) aux Lc B par les cellules dendritiques (CD) qui possèdent des récepteurs spécifiques à certains facteurs du complément.

C. Mécanisme de défense adaptative spécifique à *P. aeruginosa*

La réponse immunitaire spécifique ou adaptative dirigée contre *P. aeruginosa* dépend de la reconnaissance de la bactérie par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et la stimulation de lymphocyte Th naif. Elle conduit à une réponse immune à médiation cellulaire avec la production de Lc T et à une réponse à médiation humorale avec la production d'immunoglobulines. La réponse immunitaire cellulaire se développe en quelques jours et dépend de la reconnaissance spécifique de la substance étrangère, prélude à sa destruction, et garde la mémoire de la rencontre. Elle est initiée par une sous-population de Lc T encore appelée Lc T facilitateur ou T helper (Th). Il existe selon le type d'antigène, plusieurs sous populations de Lc Th : les Th1, Th2 et Th17. Une autre sous-population de Lc participe à la réponse Th, les Lc T régulateurs (Treg).

1. Bref rappel de la différenciation des lymphocytes Th et Treg

La différenciation des Lc Th et Treg dépend à la fois de l'agent contre lequel est dirigée la réponse (virus, bactérie intracellulaire, bactérie extracellulaire) et du tissu dans lequel elle est mise en place. Elle comprend les étapes principales suivantes :

- l'intervention des CPA pour la préparation et la présentation de l'antigène aux Lc T naïfs ou Th0 ;
- des interactions entre des récepteurs spécifiques membranaires des CPA permettant de présenter l'antigène à des récepteurs spécifiques membranaires des Lc T. Ce mécanisme est appelé la synapse immunologique ;
- des médiateurs solubles permettant aux Lc Th0 de se différencier en Lc Th1, Th2, Th17 et Treg et de communiquer entre eux et avec les autres effecteurs de l'immunité.

a. Les cellules présentatrices d'antigènes

Les CPA forment un lien entre l'immunité innée et adaptative et correspondent à

différents types cellulaires dont les principaux sont les CD, les monocytes et les macrophages (15).

i. Les cellules dendritiques

Identifiées en 1973 par Steinman et Cohn (16), les CD sont des cellules présentatrices d'antigènes dites « professionnelles » et sont considérées comme de véritables sentinelles du système immunitaire. Elles font partie du système réticulohistiocytaire et sont localisées au niveau des différentes muqueuses et de nombreux tissus. Ce sont les premières cellules que rencontrent les pathogènes et les antigènes étrangers introduits dans l'organisme. Leur rôle est de les phagocyter puis de les présenter aux Lc Th0 pour initier la réponse immune. On distingue 2 grandes classes de CDs : les CD myéloïdes et les CD lymphoïdes.

Les CD myéloïdes regroupent les CD de la peau [les cellules de Langherans, nous ne les développerons pas (17)] et les CD des tissus interstitiels non lymphoïdes. Ces dernières sont présentes à l'état immature dans ces tissus et sont caractérisées par l'expression des marqueurs myéloïdes comme le « *Cluster of Differentiation 11b* » (CD11b), CD13 et CD33 (18). Après leur rencontre avec des antigènes exogènes et leur activation par différents signaux inflammatoires (ex : TNF- α), les CD immatures migrent par les vaisseaux lymphatiques vers les zones T des ganglions lymphatiques (19). Lors de ce trajet, les CD acquièrent un phénotype mature par perte de leur capacité d'endocytose, par l'expression de différents marqueurs de co-stimulation (B7-1, B7-2, CD40, « *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1* » (ICAM-1)), de molécules de surface du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et du récepteur spécifique des CD, le « *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* » (DC-SIGN), qui est un récepteur nécessaire à l'interaction des CD avec les Lc naïfs (20). Les CD matures modifient également leur morphologie en réorganisant leur cytosquelette (actine F) et en formant de longs prolongements cytoplasmiques (dendrites) leur permettant un contact étroit simultané avec plusieurs Lc Th0. Les CD matures internalisent les antigènes exogènes (via le récepteur CD205 ou par simple macropinocytose), les dégradent sous la forme de peptides qui sont ensuite stockés dans des vésicules avant d'être fixés aux molécules du CMH-II. L'ensemble CMH-II-peptide migre à la surface des CD pour être présenté aux Lc T CD4 ou CD8 naïfs dans les organes lymphoïdes. Pour orchestrer la réponse immune et déterminer le type de

différenciation Th en aval (chapitre suivant), les CD intègrent plusieurs signaux provenant des pathogènes qu'elles ont phagocytés (LPS, LTA (acide lipotéichoïque), ADN bactérien) et de ceux émis par les cytokines de l'environnement cellulaire (IL-1, TNF- α , IL-6,...). Les CD sont particulièrement abondantes dans l'intestin et sont indispensables dans le recueil des antigènes intestinaux (cf chapitre flore intestinale). Les CD myéloïdes sont caractérisées par la production d'IL-12 et sont sensibles au « *Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor* » (GM-CSF). Elles sont désignées comme CD1 car elles sont capables d'induire une réponse Th1 (**Figure 2**) (18).

Les CD lymphoïdes ou plasmacytoïdes sont également des cellules sentinelles mais elles sont spécialisées dans la défense antivirale. Ces cellules circulent dans le sang où elles peuvent sécréter une grande quantité de cytokines antivirales comme l'Interféron (IFN) de classe I. Elles expriment les récepteurs IL-3R, CD36, L-selectine), le « *CXC chemokine receptors 3* » (CXCR3) et les récepteurs intracellulaires TLR7 et TLR9. Cette catégorie de CD est moins efficace pour l'activation des Lc T naïfs. Les CD plasmacytoïdes ne produisent que très peu d'IL-12 et sont sensibles à l'IL-3 et au « *Granulocyte colony-stimulating factor* » (G-CSF) nécessaires à leur différenciation. Ils sont désignés comme CD2 car ils sont capables d'induire une réponse Th2 (**Figure 2**) (21,22).

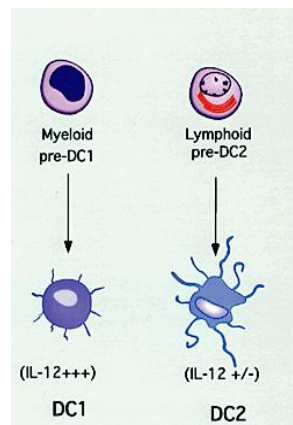


Figure 2 : Les cellules dendritiques et la régulation de la réponse immune T helper. Les 2 sous-populations de CD, myéloïdes et lymphoïdes orientent respectivement les réponses immunes Th1 et Th2. Les CD myéloïdes CD1 (DC1) produisent une grande quantité d'IL-12 au cours de leur interaction avec les Lc T et induisent préférentiellement une différenciation Th1. Les CD lymphoïdes CD2 (DC2) produisent une quantité plus faible d'IL-12 au cours de leur interaction avec les Lc T et induisent préférentiellement une différenciation Th2 (23).

ii. Les macrophages

Les macrophages appartiennent à la lignée myéloïde. Ils représentent la forme mature des monocytes qui circulent dans le sang et qui migrent continuellement dans les tissus où ils se différencient après leur rencontre avec un antigène. Les macrophages exercent diverses fonctions au cours de la réponse innée et de la réponse adaptative. La première est de phagocyter et de tuer les microorganismes. Ils remplissent également une fonction d'éboueur en éliminant les cellules mortes et les débris cellulaires. En fonction du type d'antigène et de leur environnement (facteurs de croissances, cytokines Th1, Th2, voir chapitre suivant) on distingue des macrophages activés selon la voie classique encore appelée M1, et des macrophages activés selon une autre voie dite alternative, encore appelée M2.

Les macrophages M1 interviennent dans la résistance de l'hôte aux pathogènes intracellulaires, la destruction tissulaire et la résistance anti-tumorale. Ils sont activés lorsqu'ils sont stimulés par l'IFN- γ , le TNF- α ou par des composants bactériens comme le LPS. Leur activation est bloquée par l'IL-4 et l'IL-13. Les macrophages M1 sont caractérisés par une forte capacité à présenter les antigènes, à produire de l'IL-12 et de l'IL-23 (24) et par conséquent à polariser la réponse immune vers la voie Th1. Ils produisent également certaines chimiokines (« *Chemokine (C-C motif) ligand* » (CCL5), « *Chemokine (C-X-C motif) ligand* » CXCL9), CXCL10, CXCL11, CXCL16) permettant le recrutement de Lc cytotoxiques et de cellules Natural Killer (25). Ces macrophages activés produisent à partir de l'arginine de grandes quantités de NO, de radicaux libres oxygénés et de dérivés nitrés nécessaires à la destruction des pathogènes intracellulaires (26). La production de NO est catalysée par une enzyme : la NO synthase (NOS) via une série de réaction rédox par dégradation de la L-arginine en L-citrulline en présence d'oxygène et de NADPH. Trois isoformes de NOS sont connues : la NOS endothéliale (eNOS ou NOS1), la NOS neuronale (nNOS ou NOS3) et la NOS inductible (iNOS ou NOS2), cette dernière étant codée par le gène *nos2*. Ce gène est exprimé dans les macrophages en présence de cytokines pro-inflammatoires. En condition normale, dans les voies aériennes, le NO produit permet la relaxation des muscles lisses et favorise donc la broncho-dilatation. Par contre, en situation pathologique, comme dans l'asthme, la NOS est impliquée dans les phénomènes d'hypersensibilité des voies aériennes par l'infiltration des cellules inflammatoires et l'induction de dommages épithéliaux (27).

Les macrophages M2 à activation alternative interviennent dans les phénomènes de réparation, de remodelage tissulaire, dans l'allergie, la résistance contre les parasites et le développement de tumeurs. Il existe 3 sous-classes de macrophages M2 : M2a, M2b, M2c. Les macrophages sont activés alternativement lorsqu'ils sont stimulés par l'IL4 ou l'IL13 (M2a), par les complexes immuns ou des agonistes de l'IL-1R (M2b) ou par l'IL-10 (M2c) (28). Ils sont caractérisés par une forte production d'IL-10, de « *Transforming Growth Factor-β* » (TGF-β) et une faible production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, d'IL-1, d'IL-6, TNF-α), orientant la réponse immunitaire vers la voie Th2 (29). Ces macrophages M2 produisent également certaines chimiokines (CCL1, CCL13, CCL17, CCL18, CCL22, CCL24) permettant le recrutement de différents types cellulaires : basophiles, éosinophiles, Lc Treg et Lc B. Les macrophages M2 activés sont caractérisés par la surexpression de l'Arginase 1 (Arg1), une enzyme cytosolique catalysant la conversion de L-arginine en L-ornithine et en urée (30). La L-ornithine est un précurseur de polyamines et de L-proline, qui sont impliquées respectivement dans les phénomènes de prolifération cellulaire (31) et de synthèse de collagène (26,32). Les sous population de M1 et M2 et leurs marqueurs sont représentés à la **Figure 3**.

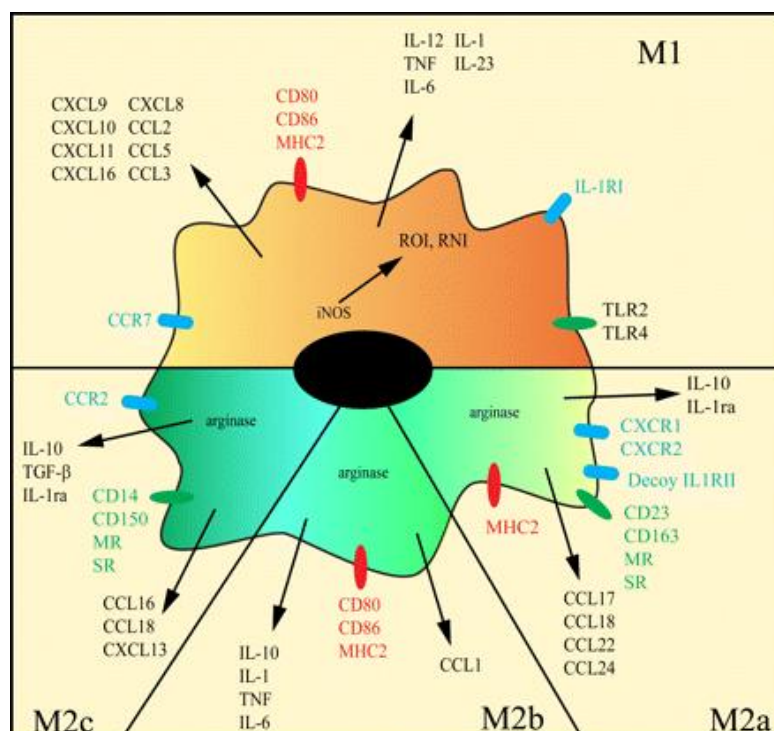


Figure 3 : Les différentes sous-populations de macrophages et leurs marqueurs. Les macrophages à activation classiques (M1) sont activés par le LPS et des produits microbiens. Ils produisent des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, et des intermédiaires réactifs oxygénés (ROI) et nitrés (RNI). Les macrophages à activation alternative (M2) sont divisés en 3 classes : les M2a activés par l'IL-4 et l'IL-13, les M2b activés par les TLRs et les complexes immuns, les M2c activés par l'IL-10 et leur récepteur aux glucocorticoïdes. Ils produisent des

cytokines et chimiokines spécifiques (33).

La différenciation des M1 et M2 est basée sur le métabolisme de l'arginine et de l'expression de NOS2 (M1) et de l'arginase 1 (M2). Le mécanisme est présenté à la **Figure 4**. L'arginase 1 régule la production de NO en rentrant en compétition avec NOS2 pour leur substrat commun, la L-arginine (34). La NOS2 conduit à la formation de NO et d'anion superoxyde O_2^- et par conséquent réduit la réponse cytotoxique des macrophages et la contraction des muscles squelettiques des voies aériennes. En cas de diminution de la disponibilité en L-arginine pour NOS2, la conséquence directe est la formation de peroxynitrites ($ONOO^-$) fortement réactifs aux propriétés pro-contractiles, pro-inflammatoires et cytotoxiques (35). En condition pathologique, comme dans l'asthme allergique, l'expression de l'arginase 1 et la production de cytokines Th2 sont fortement augmentées (36,37).

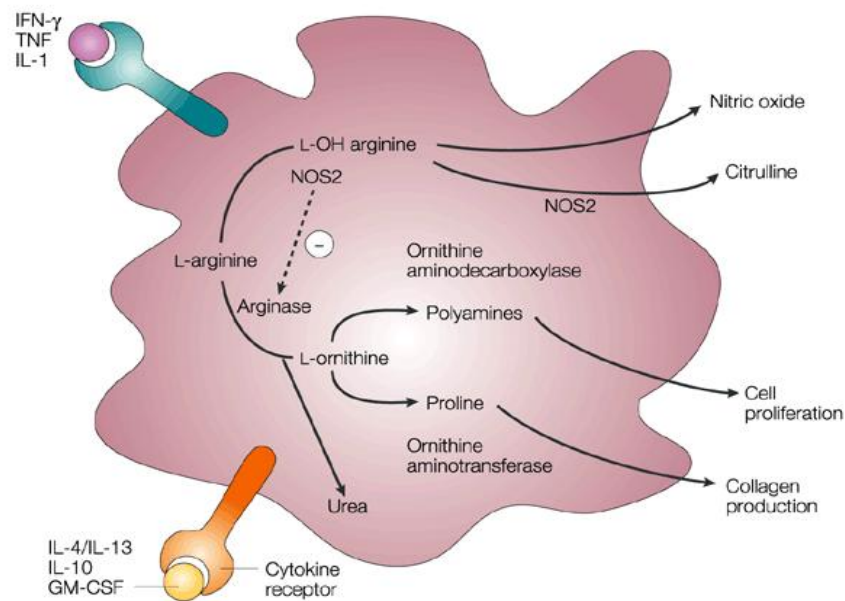


Figure 4 : Utilisation de la L-arginine par les macrophages activés. L'IL-4 et l'IL-13 favorisent la formation de L-ornithine conduisant à la prolifération de fibroblastes et à la synthèse de collagène. L'IFN-γ augmente l'activité de la NOS2 conduisant à la production de NO et à l'inhibition de l'arginase (38).

La différenciation des macrophages en M1 et M2 n'est pas irréversible. Ils peuvent dans un premier temps participer à la réponse inflammatoire, puis dans un second temps participer à sa résolution. Ils sont également capables d'évoluer de macrophages en CD et de revenir à l'état de macrophage M1 ou M2 selon l'environnement (39,40).

b. Initiation de la différenciation des lymphocytes Th0 : la synapse immunologique

La synapse immunologique est définie par l'interaction entre un récepteur spécifique membranaire des Lc Th0, appelé « *T Cell Receptor* » (TCR), et le peptide antigénique fixé à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII-Ag) situé à la surface de la CPA. La synapse immunologique entre une CPA et un lymphocyte T naïf est représentée à la **Figure 5**

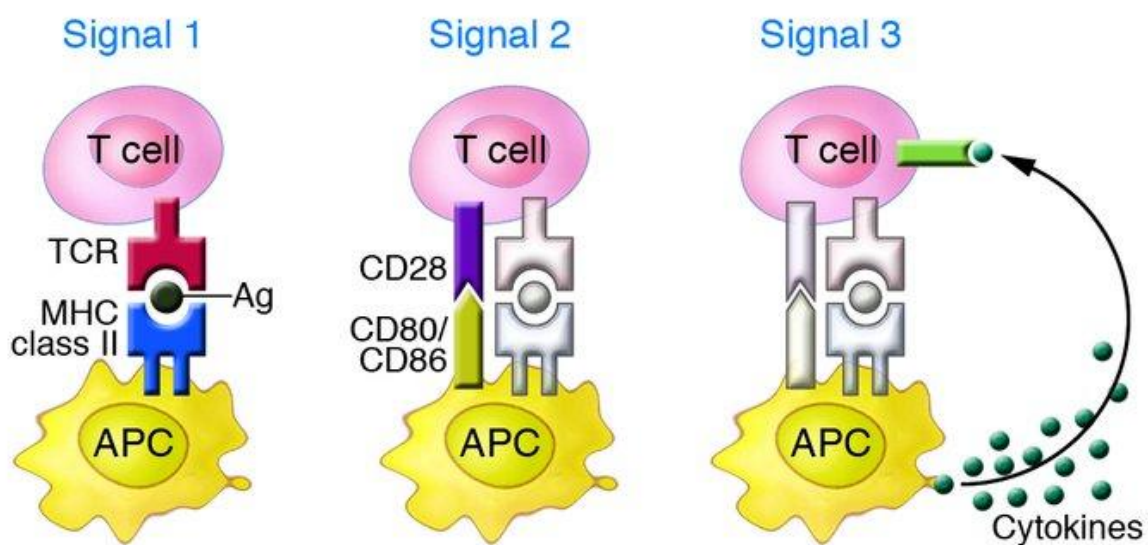


Figure 5 : La synapse immunologique entre une CPA et un lymphocyte T naïf (41). Signal 1 : la synapse immunologique est formée par la présentation de l'antigène par les CPA via leur CMH-II au TCR des Lc T naïfs. Signal 2 : la synapse est stabilisée par des molécules d'adhésions et l'induction de signaux via les molécules de co-stimulation situées à la surface des CPA : CD80 et CD86 interagissent avec le CD28 présent sur les Lc T, générant des signaux activateurs. Signal 3 : les CPA produisent des cytokines qui, via leur fixation sur les récepteurs aux cytokines présent sur les cellules T, conduisent à une différenciation spécifique des Lc T.

c. Différenciation des lymphocytes T helper

L'interaction des Lc Th0 avec les CD conduit à la synthèse de cytokines spécifiques et à leur différenciation en 4 classes de Lc : les Lc Th1, les Lc Th2, les Lc Th17 et les Lc Treg (42). Cette différenciation est présentée à la **Figure 6**.

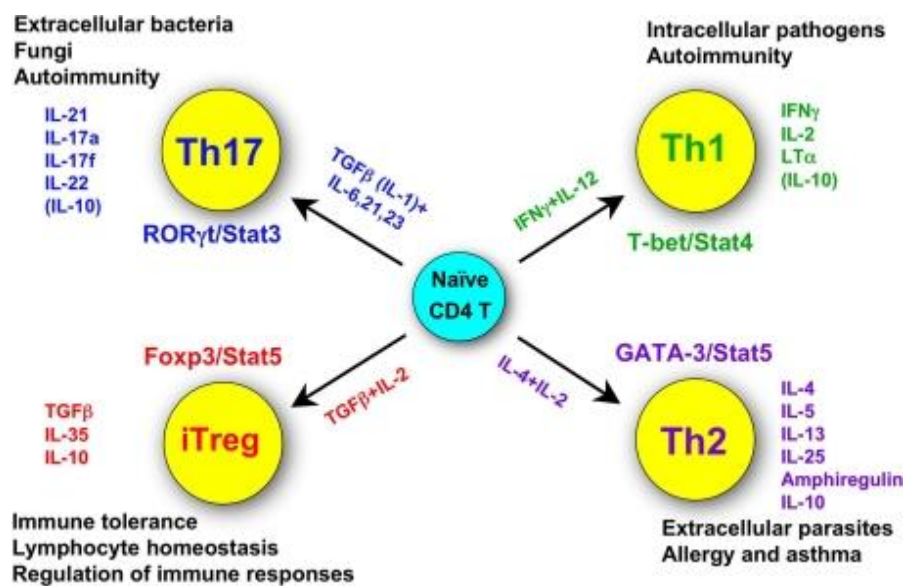


Figure 6 : Les différents Lc T helper, leurs fonctions, leurs cytokines spécifiques, leurs facteurs de transcription caractéristiques, et les cytokines essentielles pour leur différenciation (42).

i. Mécanismes de différenciation des lymphocytes Th1

La différenciation Th1 est initiée par la production d'IL-12 par les CPA et par l'activation du TCR présent à la surface du lymphocyte Th0. L'activation de la voie de signalisation de l'IL-12 *via* le récepteur IL-12R conduit à l'activation du facteur de transcription « *Signal Transducer and Activator of Transcription 4* » (STAT4) et par conséquent à l'expression initiale de gènes spécifiques de la réponse Th1 comme le gène de l'IFN- γ (43). La fixation de l'IFN- γ sur son récepteur à la surface du lymphocyte T en cours de différenciation (régulation autocrine) conduit l'activation du facteur de transcription STAT1 contrôlant l'expression du gène *t-bet* (également appelé *tbx21*, « *T-box transcription factor 21* ») codant le facteur de transcription clef de la différenciation Th1 : T-bet (44). Ce facteur de transcription joue un rôle dans l'inhibition de l'expression du gène de l'IL-4 comme antagoniste du facteur de transcription « *GATA binding protein 3* » (GATA3) (45). Le rôle de T-bet dans la différenciation Lc Th1 a été démontré *in vitro* (43,46) et à l'aide de souris *t-bet*^{-/-}. Ces dernières montrent un défaut de développement des Lc Th1 et de l'expression de l'IFN- γ , associée à une augmentation de la population des Lc Th2 (47,48). Elles sont également prédisposées aux allergies respiratoires (47). L'inhibition de l'expression du gène *t-bet* par le TGF- β est responsable de l'incapacité des souris BALB/c à développer une réponse Th1 contre *Leishmania major*, nécessaire à son éradication (49). T-bet est impliqué dans la boucle auto-catalytique d'activation de la signalisation impliquée au cours de

la différenciation Th1 en amplifiant la production d'IFN- γ et en augmentant l'expression de l'IL-12R à la surface du lymphocyte Th1 (50).

ii. Mécanismes de différenciation des lymphocytes Th2

L'initiation de la différenciation Th2 est sous le contrôle de la production d'IL-4 par une CPA et de l'activation du TCR présent à la surface du lymphocyte Th0. L'activation du TCR conduit à l'expression initiale d'IL-4 (51) et de GATA3 (52), le facteur de transcription clef de la différenciation Th2. L'implication directe de ce facteur de transcription dans la différenciation Th2 a été montrée *in vitro* en bloquant son action par un acide ribonucléique (ARN) anti-sens (52). Le résultat obtenu est l'inhibition de l'expression des ARN messagers (ARNm) de l'IL-4 et d'IL-13. La surexpression de *gata3* *in vivo* dans des souris transgéniques conduit à une augmentation des Lc Th2 dans ces dernières. La délétion de *gata3* étant létale chez la souris, GATA3 a été étudié chez des souris *gata3*^{-/-} conditionnelles qui sont incapables de développer une réponse Th2 contre les infections parasitaires (42,53). L'IL-4 *via* son récepteur IL-4R contrôle de façon autocrine l'amplification de la différenciation en activant STAT6, un autre facteur de transcription clef de la différenciation Th (54). Ce dernier est un facteur de transcription nécessaire à l'expression des cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) et à la surexpression de GATA3. GATA3 participe également à l'inhibition de l'expression des cytokines Th1 comme antagoniste de T-bet (55). Par contre, l'expression de GATA3 n'est pas suffisante pour produire de l'IL-4.

Le mécanisme de différenciation des Lc Th1 et Th2 est représenté à la **Figure 7**.

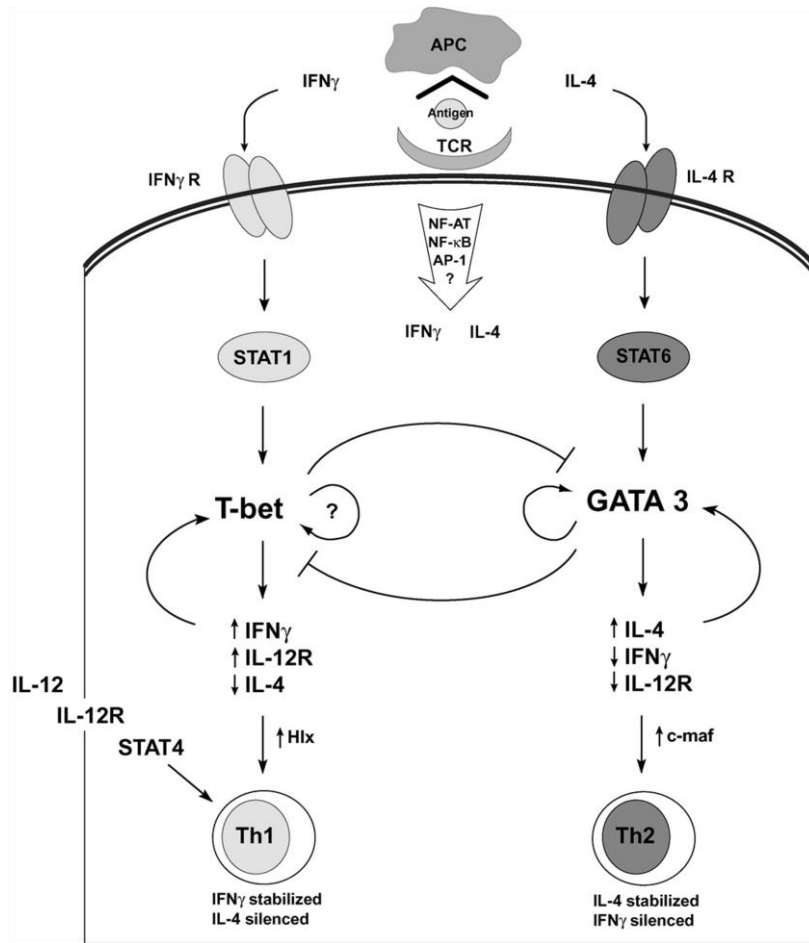


Figure 7 : Les différents mécanismes impliqués dans la différenciation des Lc Th1 et Th2 . Lors de la liaison à son récepteur sur la surface des cellules T, l'IFN- γ induit une activation de STAT1 et consécutivement de T-bet. T-bet est un facteur de transcription maître pour les Lc Th1 qui induit la production de cytokines Th1 ainsi que l'expression des récepteurs IL-12 β 2 et inhibe simultanément la production des cytokines Th2. L'IL-12 induit la différenciation des Lc Th1 via l'activation de STAT4 et consécutifs à la production d'IFN- γ , mais il n'induit pas d'activation directe de T-bet. En revanche, l'IL-4 induit la production de cytokines Th2 par les Lc T par l'activation de STAT6 suivie de l'activation de GATA3. GATA3 est capable de s'autoactiver de façon indépendante de STAT6 créant ainsi un rétrocontrôle pour stabiliser l'engagement vers une voie Th2. En plus de GATA3, c-Maf et NFAT régulent la production d'IL-4 par les Lc T (56).

iii. Mécanismes de différenciation des lymphocytes Th17

La différenciation Th17 est initiée par l'IL-6 et par le TGF- β (57). Ces cytokines activent le recrutement du facteur de transcription STAT3 qui induit l'expression d'IL-17, d'IL-21, d'IL-23R et du « *RAR-related orphan receptor* » (ROR- γ), un autre facteur de transcription clef pour la différenciation Th17 (58). Les réponses Th1 et Th2 participent à l'inhibition de la différenciation Th17 par la production de leurs cytokines spécifiques, respectivement l'IFN- γ et l'IL-4 (59).

iv. Mécanismes de différenciation des lymphocytes Treg

Le TGF- β et la stimulation du TCR des Lc T sont indispensables pour l'initiation de la différenciation des Lc Treg, notamment par le recrutement des facteurs de transcription appelés « *Mothers against decapentaplegic homolog 3* » (Smad3) et « *Nuclear factor of activated T-cells* » (NFAT) (60). Ces 2 protéines plus le recrutement de STAT5 (un autre facteur de transcription) par l'IL-2 induisent l'expression de « *Forkhead box P3* » (Foxp3) qui est le facteur de transcription clef de la différenciation et de l'activation des Lc Treg (61). Le recrutement de STAT5 par l'IL-2 est aussi nécessaire pour induire l'expression de Foxp3. Ces Lc Treg participent également à l'inhibition de la différenciation Th1 et Th2 (49,62).

d. Principales propriétés et caractéristiques des lymphocytes Th1, Th2, Th17 et Treg

i. Les lymphocytes Th1

Les Lc Th1 sont impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire contre les pathogènes intracellulaires (bactéries, virus, champignons) (63). Ils sont aussi à l'origine de certaines maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde. Ces Lc sont caractérisés par la production de cytokines spécifiques telles que l'IFN- γ , la lymphotoxine α et l'IL-2. L'IFN- γ joue un rôle crucial dans l'activation des macrophages en augmentant leur activité microbicide (64), dans l'auto-amplification de la voie Th1 et dans le rétrocontrôle négatif de l'activation de la réponse Th2. La lymphotoxine- α (LT- α) permet une modification des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium vasculaire nécessaire à la fixation des cellules phagocytaires (65). L'IL-2 est importante pour la fonction des Lc T CD4 et T CD8 mémoires (66). Ils peuvent être reconnus par leur récepteurs spécifiques CXCR3 (67) et le « *C-C chemokine receptor 5* » (CCR5) (68).

ii. Les lymphocytes Th2

Les Lc Th2 sont impliqués dans l'immunité à médiation humorale et dans la protection contre les parasites extracellulaires tels que les helminthes (63). Ils sont également impliqués dans la persistance de l'asthme et dans les phénomènes allergiques (69). Les Lc Th2 sont

caractérisés par la production de cytokines spécifiques telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10, l'IL-13 et l'IL-25. L'IL-4 est déterminante dans le processus d'auto-amplification et de différenciation des Lc de la voie Th2 (51,70) et dans le rétrocontrôle négatif contre l'activation de la réponse Th1, dans la production d'immunoglobuline E (IgE) par les Lc B, d'histamine, de sérotonine et de TNF- α (71). L'IL-5 est impliquée dans le recrutement des éosinophiles (72), l'IL-9 induit la production de mucines au cours des phénomènes allergiques (73), l'IL-10 inhibe la prolifération des Lc Th1 et l'activité des CD (74,75). L'IL-13 participe à l'expulsion des helminthes et à l'induction de l'hypersensibilité des voies aériennes (76), et l'IL-25 est un facteur d'amplification de la réponse Th2 (77). Le récepteur IL-4R α est surexprimé au cours de la différenciation Th2. Les Lc Th2 peuvent être identifiés par leurs récepteurs IL-2R α (CD25), IL-33R α , CCR3 (67), CCR4 (78) et CCR8 (79).

iii. Les lymphocytes Th17

Les Lc Th17 participent à l'immunité contre les bactéries extracellulaires et les champignons (80). Ils produisent l'IL-17 (2 isoformes, IL-17a et IL-17f), l'IL-21 et l'IL-22. L'IL-17 participe aux propriétés inflammatoires de la réponse Th17 en favorisant le recrutement des neutrophiles et en stimulant la production des cytokines IL-6 et IL-8 (81). L'IL-21 intervient dans l'auto-amplification de la voie Th17 (82,83), et l'IL-22 dans la défense contre les pathogènes bactériens comme *Klebsiella pneumoniae* (84) et *Citrobacter rodentium* (85).

iv. Les lymphocytes Treg

Les Lc Treg jouent un rôle crucial dans les mécanismes de tolérance du soi et dans la suppression de la réponse immune (86). Ils exercent leur rôle sur les cellules du système immunitaire (CD, neutrophiles) par la production de cytokines suppressives comme l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35 (87). En présence de TGF- β , les Lc Treg expriment le facteur de transcription Foxp3, indispensable pour le maintien de leur activité suppressive (88,89). L'IL-10 est également important pour le maintien des fonctions suppressives des Tregs, notamment dans la prévention et le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin (90). En plus du CD4, ils expriment constitutivement à leur surface le récepteur CD25 (91).

2. Action de *P. aeruginosa* sur la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2

La réponse immunitaire adaptative observable au cours d'une infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* est schématisée à la **Figure 8**.

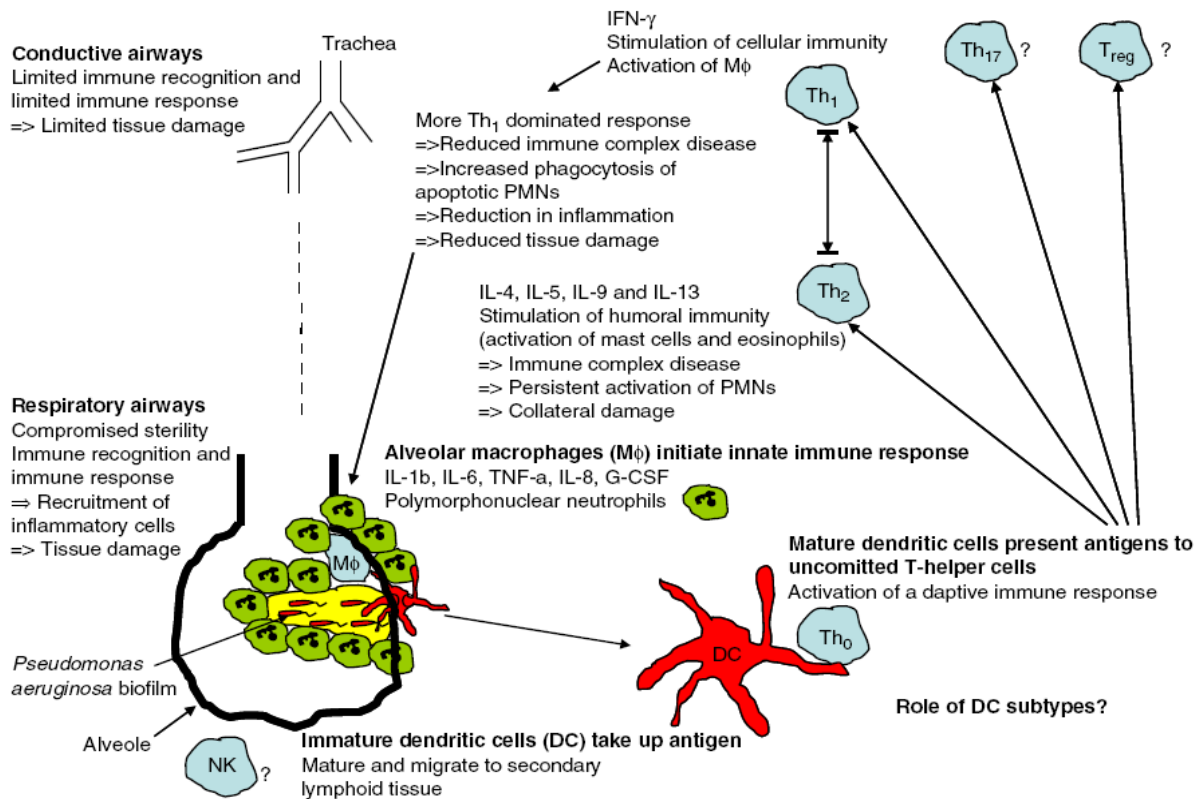


Figure 8 : La réponse immunitaire adaptative observée au cours d'une infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* selon Jensen et al (92).

a. Stratégies développées par *P. aeruginosa* pour échapper aux mécanismes de différenciation des lymphocytes Th1 et Th2

P. aeruginosa a développé de nombreuses stratégies pour échapper aux mécanismes de différenciation des Lc Th1 et Th2. Ces différentes stratégies sont :

- **la résistance à la phagocytose des macrophages :** cette résistance est attribuée essentiellement à l'exotoxine S, qui, lorsqu'elle est injectée directement dans les macrophages par le système de sécrétion de type III, agit sur le cytosquelette des macrophages par inhibition de la formation des filaments d'actine (93) ;

- **l'induction de l'apoptose des macrophages et des CD** : l'exotoxine S et les C12-HSL favorisent l'apoptose des macrophages et des CD en augmentant l'activation des caspases et du cytochrome C (14,94) ;
- **l'inhibition de la fonction des CPA** : les C12-HSL inhibent la capacité des macrophages et des CD à sécréter de l'IL-12, du TNF- α et de l'IFN- γ (95-97). Ils inhibent également à la surface des CD la synthèse de marqueurs de co-stimulation (CD40, CD80, CD 86) impliqués dans leur reconnaissance avec les Lc T naïfs (98,99). Ces résultats observés à partir de cultures de macrophages ou de CD avec des C12-HSL ont été observés chez les patients présentant des infections sévères à *P. aeruginosa* (94,100) ;
- **l'inhibition de la prolifération des Lc Th** : les C12-HSL inhibe la prolifération des Lc Th1 et Th2 (97,101) ;
- **l'induction de l'apoptose des Lc T** : Les C12-HSL de *P. aeruginosa* exercent également un effet toxique en induisant l'apoptose des Lc T CD4 mais pas celle des CD8 (94) ;
- **l'inhibition de la polarisation des Lc Th1** : les C12-HSL diminuent la polarisation des Lc Th1 et stimulent la polarisation des Lc Th2 (94,99,101,102). La polarisation de la réponse Th2 pourrait être une conséquence directe de l'inhibition de la production de l'IL-12 (stimulateur de la réponse Th1 ; cf chapitre précédent) par les CD. D'après Telford et al (97), cet effet serait dose dépendant et ne serait par conséquent observé qu'en présence de populations bactériennes très denses ;

b. Hypothèses sur le mécanisme d'action des C12-HSL

La modulation de la réponse Th semblant dépendre essentiellement de la production des C12-HSL, plusieurs hypothèses sont actuellement émises pour en expliquer le mécanisme d'action. Elles sont basées sur les propriétés lipophiles des C12-HSL qui pourraient s'insérer dans la double couche phospholipidique des membranes cellulaires et pénétrer directement dans les cellules eucaryotes. En s'insérant dans la double couche phospholipidique des membranes cellulaires, les C12-HSL pourraient inhiber l'interaction des CPA aux LcT en

rompant la formation du complexe CMH-II–TCR (103-106). En pénétrant dans les cellules, les C12-HSL pourraient agir sur des molécules possédant un domaine d'interaction proche de celui présent sur l'autoinducteur bactérien LasR (106). Cette interaction augmenterait l'activation de NFκB (107) et par conséquent la production de composés pro-inflammatoires comme les prostaglandines (PG) tels que la PGE2 et la 15d-PGJ2 (108). Ces 2 PG, qui interviennent respectivement au début et la fin de la phase inflammatoire, auraient des fonctions opposés, la PGE2 favorisant la réponse Th1, et la 15d-PGJ2 l'inhibant (109). Pour appuyer cette hypothèse, Smith et al (110) montre chez la souris, que l'injection de C12-HSL induit une augmentation de l'afflux des cellules inflammatoires au point d'injection, de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1β), et de la concentration en PGE2. Les C12-HSL pourraient également agir *via* l'activation des « *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* » (PPARs) en bloquant la fonction des CD et des Lc Th (111).

L'ensemble de ces données montrent que les C12-HSL permettent à *P. aeruginosa* de s'adapter à son environnement et en particulier à un hôte en stimulant la production de facteurs de virulence qui favorisent l'apport de nutriments nécessaires à sa multiplication, en échappant aux mécanismes de défenses de l'hôte, en formant des biofilms à la surface des muqueuses, et en régulant le système immunitaire (diminution de l'activité des peptides antibactériens, stimulation de la production d'IL-8 mais induction de l'apoptose des neutrophiles, diminution de la réponse Th1) . Le rôle des C12-HSL est résumé à la **Figure 9**.

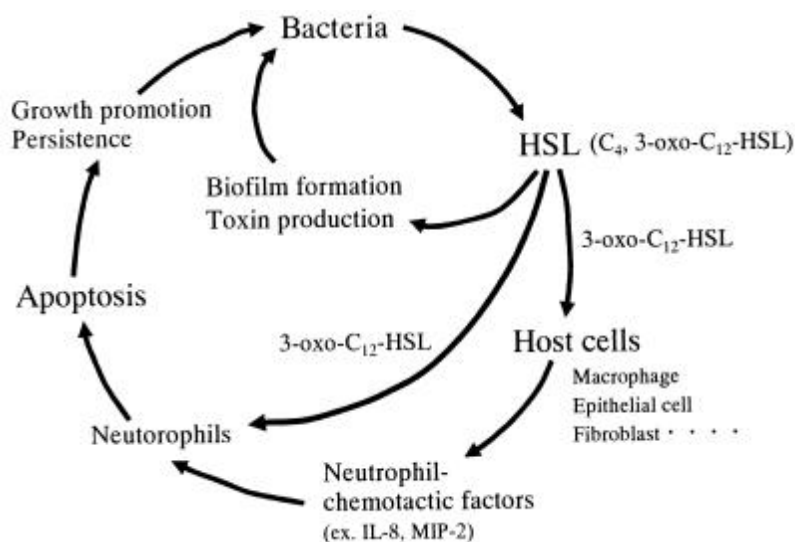


Figure 9 : Importance du 3-oxo-C12-HSL dans la pathogénèse de l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa*. 1 : modulation des fonctions de la bactérie (production de facteurs de virulence). 2 : résistance aux mécanismes de défense de l'hôte, formation du biofilm et dérégulation du système immunitaire (14).

c. Conséquences de l'action de *P. aeruginosa* sur la différenciation des Lc Th1 et Th2 dans le pronostic de l'infection pulmonaire

D'une manière générale, l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* associée à une réponse immunitaire Th1 a un meilleur pronostic que celle associée à une réponse Th2. Cet effet bénéfique a été démontré dans des modèles expérimentaux en utilisant différents types de souris et chez l'homme, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose.

i. Données observées dans les modèles expérimentaux

L'influence de la réponse immune Th1 ou Th2 sur le pronostic de l'infection pulmonaire a été étudiée avec des souris de fonds génétiques différentes. Les premières comparaisons montrent que les souris C3H/HeN meurent moins, ont une charge pulmonaire et une réponse inflammatoire plus faible que les souris BALB/c et que ces résultats sont associées à un profil immunitaire Th1 pour les C3H/HeN et un profil immunitaire Th2 pour les BALB/c (112,113). Le bénéfice de la réponse Th1 sur le pronostic de l'infection est conforté par Moser *et al.* qui montrent que les souris BALB/c survivant à une première infection à *P. aeruginosa* résistent mieux à une seconde infection et que ce bénéfice n'est pas corrélé à une augmentation de la concentration en Ac mais à un balancement de la réponse Th2 vers Th1 (114).

L'effet bénéfique de la réponse Th1 peut s'expliquer par la stimulation de l'activité M1 des macrophages alvéolaires. Les M1 possèdent une forte activité phagocytaire qui favorise la destruction des bactéries et la diminution de l'inflammation en phagocytant les neutrophiles apoptotiques et leur débris cellulaire avant leur nécrose. La réponse Th1 peut également réduire la production d'IL-8, un chemoattractant pour les neutrophiles (115,116). De façon complémentaire, la diminution de la réponse Th2, conduit à une diminution de la production d'Ac par les Lc B et de la formation de complexes immuns, réduisant les dommages tissulaires.

Le développement de la réponse Th1 et Th2 pourrait être lié à la charge bactérienne qui est 500 à 1000 fois plus élevée chez les BALB/c que chez les autres souris. Or, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, une forte densité bactérienne pourrait entraîner une concentration élevée de C12-HSL qui agirait sur la polarisation de la réponse Th2. Cependant, d'après Kondratieva *et al.* (117) le fond génétique des souris serait un facteur

essentiel. Ils démontrent qu'en injectant des *P. aeruginosa* tués par la chaleur et donc incapables de synthétiser des AHL, les souris BALB/c conservent leur profil Th2 et les C57BL/6 leur profil Th1. Ritchie *et al.* (102) appuient cette hypothèse en montrant que l'administration par voie intra-péritonéale de C12-HSL chez des souris préalablement sensibilisées par de l'ovalbumine favorise la production d'IL-4 et d'Ac de type IgG1 (immunoglobuline spécifique de la réponse Th2) chez les BALB/c et augmente celle d'IFN- γ chez les C57BL/6. Ainsi, l'infection à *P. aeruginosa* ne pourrait qu'accentuer le profil Th1 ou Th2 préexistant chez les 2 types de souris.

ii. Données observées chez l'homme

L'effet bénéfique d'une réponse Th1 dans le pronostic de l'infection à *P. aeruginosa* à été démontré essentiellement chez les patients atteints de mucoviscidose (cf chapitre suivant).

II. Particularités de l'infection à *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique létale à transmission autosomique récessive rencontrée le plus fréquemment dans les populations de type caucasienne blanche. Elle est liée à des mutations du gène *cftr* codant la protéine appelée CFTR pour « *Cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* ». La protéine CFTR est impliquée dans la régulation des échanges ioniques épithéliaux de chlore et de sodium. Ces échanges permettent l'hydratation des fluides sécrétés par les glandes sous-muqueuses au niveau de l'épithélium. Son dysfonctionnement provoque une augmentation de la viscosité du mucus et son accumulation dans les voies respiratoires et digestives. La maladie touche de nombreux organes mais les atteintes respiratoires sont prédominantes et représentent l'essentiel de la morbidité. La forme clinique la plus fréquente associe des troubles respiratoires, des troubles digestifs et des troubles de la croissance staturo-pondérale. D'évolution chronique et progressive, la maladie s'exprime souvent tôt dès la petite enfance même s'il existe des formes frustes de diagnostic tardif. Le registre Français de la mucoviscidose et l'institut national d'études démographiques ont estimé que l'espérance de vie actuelle est en moyenne de 46 ans (www.registredelamuco.org).

A. Manifestations cliniques observées dans la mucoviscidose

La mucoviscidose est une exocrinopathie généralisée touchant les glandes séreuses et les glandes muqueuses. Elle atteint l'appareil respiratoire, le tube digestif et ses annexes (pancréas, foie et voies biliaires), les glandes sudoripares et le tractus génital. La maladie est dominée par des problèmes respiratoires, des problèmes digestifs et de malnutrition voire de dénutrition.

1. Manifestations pulmonaires

Les manifestations pulmonaires restent la cause majeure de la morbidité et de la mortalité. Elles sont caractérisées par une inflammation pulmonaire chronique préexistante à l'infection et amplifiée par des épisodes de surinfection bactérienne. Plusieurs pathogènes se succèdent au niveau de la flore bactérienne *Haemophilus influenzae* puis *Staphylococcus aureus*, mais les pathogènes les plus redoutés sont *P. aeruginosa* et certaines espèces du complexe *Burkholderia cepacia*. Le pouvoir pathogène de ces dernières est lié à leur capacité à produire un grand nombre de facteurs de virulence et à former des biofilms dont l'éradication devient impossible. D'autres pathogènes tels que *Stenotrophomonas maltophilia* et *Alcaligenes xylosoxidans* peuvent aussi coloniser les voies respiratoires. Ils sont présents chez moins de 10% des patients, mais leur rôle dans l'aggravation de la fonction pulmonaire n'est pas encore clairement établi. *Mycobacterium abscessus* est un pathogène émergent de la mucoviscidose. Sa virulence est liée aux formes « rugueuses » (ou « rough ») et à son aptitude à persister à l'intérieur des macrophages chez le patient atteint de mucoviscidose (118).

2. Manifestations digestives

Les manifestations digestives peuvent être très précoces dans l'histoire de la maladie. Dix à vingt pour cent des nouveau-nés atteints révèlent leur maladie par une occlusion intestinale aiguë (ileus méconial lié à un méconium trop épais obstruant le jéjunum et l'iléon). Les nourrissons peuvent aussi présenter un reflux gastro-œsophagien, un prolapsus rectal favorisé par une malnutrition et une diarrhée chronique liée à l'insuffisance pancréatique

exocrine. Au niveau du foie, la bile du patient atteint de mucoviscidose est visqueuse et obstrue les canaux hépatiques entraînant l'accumulation de bilirubine non conjuguée à l'albumine dans la circulation sanguine. L'atteinte hépatique se manifeste aussi par l'augmentation d'enzymes de types gamma-glutamyl-transférases et de transaminases. Dans 10 à 15% des cas, elle peut évoluer vers une cirrhose biliaire. La vésicule biliaire est souvent atrophiée. Dans 90% des cas, l'insuffisance pancréatique exocrine est présente. Elle est responsable d'une mauvaise digestion des graisses (notamment les acides gras essentiels), protéines, vitamines liposolubles. Cette malabsorption est responsable de diarrhées chroniques graisseuses avec ballonnement abdominal. Ces manifestations aboutissent à l'hypotrophie pondérale puis staturale. D'autres facteurs de malnutrition sont présents : carence en vitamines E et D, anémie, carence en oligo-éléments et minéraux.

La malnutrition est fréquente dans la mucoviscidose : elle atteint de 15 à 44 % des patients. Elle résulte de troubles du comportement alimentaire (anorexie, inconfort digestif, régimes trop restrictifs) et d'une augmentation des pertes (malabsorption des lipides et des protéines, vomissements, diarrhées, insuffisance pancréatique, insuffisance intestinale, perte sudorale et augmentation de la dépense énergétique de repos). Les carences nutritionnelles concernent essentiellement les acides aminés, les vitamines et les acides gras essentiels. Des études réalisées chez la souris *cfr* knockout (KO) (119) puis chez l'homme (120) ont mis en évidence un déséquilibre de la balance des acides gras poly-insaturés de la série 3 et de la série 6 (AGPI n-3 et n-6). Ce déséquilibre entraînerait une libération exagérée de dérivés pro-inflammatoires dérivés des AGPI n-6 dont l'acide arachidonique (AA). Il serait en partie responsable de l'inflammation pulmonaire. Le métabolisme des AGPI est développé dans le chapitre suivant.

B. Particularités de l'infection pulmonaire dans la mucoviscidose

L'infection pulmonaire dans la mucoviscidose est caractérisée par une réponse inflammatoire excessive présente dès le plus jeune âge (121) et reste permanente chez tous les patients (122). Cette réaction inflammatoire serait principalement liée à une dérégulation de la production de cytokines (123,124) et à la production de médiateurs lipidiques à partir de l'AA (125). Cette réponse inflammatoire anormale a été décrite initialement comme préexistante à

l'infection, mais cette notion tend à être remise en cause par l'utilisation de techniques modernes d'identification bactérienne qui mettent en évidence une colonisation très précoce des bronches des patients (126).

1. Réaction inflammatoire liée à une dérégulation de la production de cytokines et à une dérégulation du métabolisme des lipides

Dans la mucoviscidose, les anomalies de la réaction inflammatoire sont dominées par une hypersécrétion d'IL-8 et concerneraient également, mais de façon plus modérée, les autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1- β , l'IL-6, et le TNF- α (127). Deux mécanismes principaux seraient à l'origine de cette dérégulation : une accumulation du facteur nucléaire de transcription NF κ B (128) et une augmentation du calcium mobilisable dans les cellules mucoviscidosiques qui accentuent son activation (129).

L'insuffisance pancréatique observée dans la mucoviscidose est à l'origine d'un déficit en acides gras essentiels comme l'acide linoléique et l'acide α -linoléique (nomenclature décrite au chapitre suivant). Ce déficit se manifeste au niveau sérique par une augmentation de l'acide palmitoléique et de l'acide eicosatriénoïque (dérivé à 20 carbones de la série n-9) et à une diminution de l'acide linoléique et des métabolites supérieurs de l'acide α -linoléique : l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (130). Outre ce déséquilibre, des anomalies cellulaires du métabolisme des lipides ont été décrites. Elles sont étroitement corrélées à la protéine CFTR mutée, même si l'origine de ce lien demeure totalement inconnue. D'après les mesures effectuées à partir d'homogénats d'organes de souris transgéniques exprimant cette protéine (119) ou celles effectuées sur les tissus de patients atteints de mucoviscidose (131), ces anomalies se caractérisent par une augmentation de la production d'AA et une diminution de DHA et de son précurseur métabolique l'EPA. Ce déséquilibre entraîne une libération accrue des métabolites de l'AA issus essentiellement de la voie de la cyclooxygénase 2 (COX-2) (cf chapitre suivant).

2. Anomalies des défenses mécaniques

Chez le patient atteint de mucoviscidose, le système de clairance mucociliaire est perturbé par une couche de mucus uniformément visqueuse et épaisse. Le battement des cils des cellules épithéliales est alors insuffisant pour évacuer le mucus, et les corps étrangers comme les bactéries telles que *P. aeruginosa*, qui persistent alors dans les voies respiratoires et adhèrent à l'épithélium bronchique.

L'analyse des différents travaux publiés suggère que la production et la sécrétion des mucines salivaires et bronchiques chez les patients atteints de mucoviscidose sont modifiées qualitativement dans leur glycosylation et leur sulfatation (132,133). Ces modifications qualitatives des mucines pourraient en partie expliquer l'adhérence préférentielle et spécifique de *P. aeruginosa* avec les différents épitopes glycaniques des mucines salivaires et bronchiques des sujets mucoviscidosiques par rapport aux mucines des sujets normaux. L'expression des gènes *muc* qui sont responsables de la synthèse des mucines serait également altérée dans la mucoviscidose. Cette altération serait directement liée à l'infection à *P. aeruginosa* (134,135) ou encore à la réponse inflammatoire.

3. Anomalies de la réponse innée

a. Anomalies de l'activité microbicide des peptides cationiques

L'activité anti-microbienne des peptides cationiques serait diminuée par l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium (NaCl) dans le liquide de surface bronchique chez les patients (136,137). Cependant, cette hypothèse est remise en cause depuis que les dosages en ions dans ces liquides de surface ne démontrent pas l'existence de concentrations plus élevées chez les patients atteints de mucoviscidose que chez les patients sains (138). La diminution de l'action de ces peptides antibactériens pourrait être liée à une forte déshydratation de la surface des muqueuses secondaire à une adsorption massive du liquide de surface par les cellules épithéliales (139)

b. Anomalies de la fonction de neutrophiles

Les neutrophiles pulmonaires présentent de nombreuses anomalies au niveau de leur activation, de leur capacité à phagocyter les bactéries et de leur aptitude à entrer en apoptose. Les anomalies d'activation sont liées à une diminution du nombre de récepteurs d'IL-8 à la surface des neutrophiles (140). Ces neutrophiles produisent également plus d'élastases, de facteurs oxydants et de myéloperoxydases que les neutrophiles sains. Ces enzymes amplifient les lésions tissulaires et membranaires observées dans les poumons. L'activité bactéricide des neutrophiles est également diminuée (141). Cette diminution serait en partie due à une altération de l'activité de la myéloperoxydase présente dans les granules primaires des neutrophiles et donc à une diminution de leur activité bactéricide par réduction de la production d'acide hypochloreux (HOCL) (142)). Le mécanisme de mort cellulaire programmée des neutrophiles ayant phagocyté *P. aeruginosa* ou *B. cepacia* serait également altéré chez les patients atteints de mucoviscidose (143).

c. Anomalies de la fonction des macrophages

Les macrophages alvéolaires *citr^{-/-}* sont caractérisés par une perte de l'acidification de la vacuole de phagocytose. Ce mécanisme joue probablement un rôle majeur dans la survie des bactéries dans ce compartiment et dans l'entretien de la réponse inflammatoire.

4. Anomalies de la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2 et des macrophages M1 et M2

Les anomalies de la différenciation des Th1 et Th2 et des macrophages M1 et M2 sont liées essentiellement à la production de C12-HSL (cf chapitre précédent) qui stimulent la polarisation des Lc Th2. Ce mécanisme a été étudié chez les patients atteints de mucoviscidose.

Les premières études ont été réalisées en comparant la production d'IFN- γ et d'IL-4 par les cellules mononucléées récoltées du sang périphérique de patients atteints de mucoviscidose. Elles montrent que ces cellules provenant de patients infectés chroniquement par *P. aeruginosa* produisent significativement moins d'IFN- γ et plus d'IL-4 que celles

provenant de patients qui ne sont pas infectés ou qui présentent une colonisation intermittente (144-147). Ces études ont été complétées par le dosage sérique des facteurs de croissance GM-CSF (nécessaire à la survie des CD1) et G-CSF (nécessaire à la survie des CD2). Ces dosages montrent une relation positive entre un ratio GM-CSF/G-CSF élevé et une meilleure fonction pulmonaire (148). Ces résultats ont été confirmés en quantifiant les Lc Th1 et Th2 par cytométrie de flux directement dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA) chez 12 patients infectés chroniquement par *P. aeruginosa*, 11 non infectés et 8 patients contrôles non atteints de mucoviscidose. Les résultats montrent que le taux de Lc Th2 est significativement plus important chez les patients atteints de mucoviscidose infectés que chez les patients non infectés ou les patients sains. Ils montrent aussi une relation négative entre la concentration d'IL-4 et d'IL-13 et la fonction pulmonaire mesurée par le volume expiratoire maximal par seconde. (149).

L'analyse des mécanismes d'activation classique (M1) et d'activation alternative (M2) des macrophages confirment ces résultats en montrant que l'activation des macrophages M2 est augmentée chez les patients infectés par *P. aeruginosa* et que cette augmentation est associée à un déclin de la fonction respiratoire (150).

III. Les acides gras polyinsaturés à longues chaînes

Les lipides alimentaires contiennent une grande variété d'acides gras divisée en 3 groupes : les acides gras saturés, les acides gras monosaturés et les acides gras poly-insaturés. Cette distinction se fait par leurs caractéristiques chimiques, c'est-à-dire le nombre de double liaison.

Les acides gras poly-insaturés à longues chaînes (AGPI-LC) se répartissent en différentes familles (oméga 3, oméga 6, oméga 9) définies par la position de la première double liaison à l'extrémité méthyl –terminale de leur précurseur. Deux familles d'AGPI-LC, les oméga 3 et les oméga 6, ont beaucoup été étudiées car elles représentent un intérêt majeur dans le domaine de la santé. Les chefs de file de ces 2 familles sont respectivement l'acide α -linoléique (C18 :n-3) et l'acide linoléique (C18 :2n-6) (**Figure 10**). Ces 2 acides gras sont dits essentiels car ils ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères et ils doivent obligatoirement être apportés par l'alimentation. L'acide linoléique et l'acide α -linoléique peuvent être synthétisés par les plantes, représentant la meilleure source d'apport.

membranaires et des différents systèmes enzymatiques notamment ATPasiques qui contrôlent les transports ioniques.

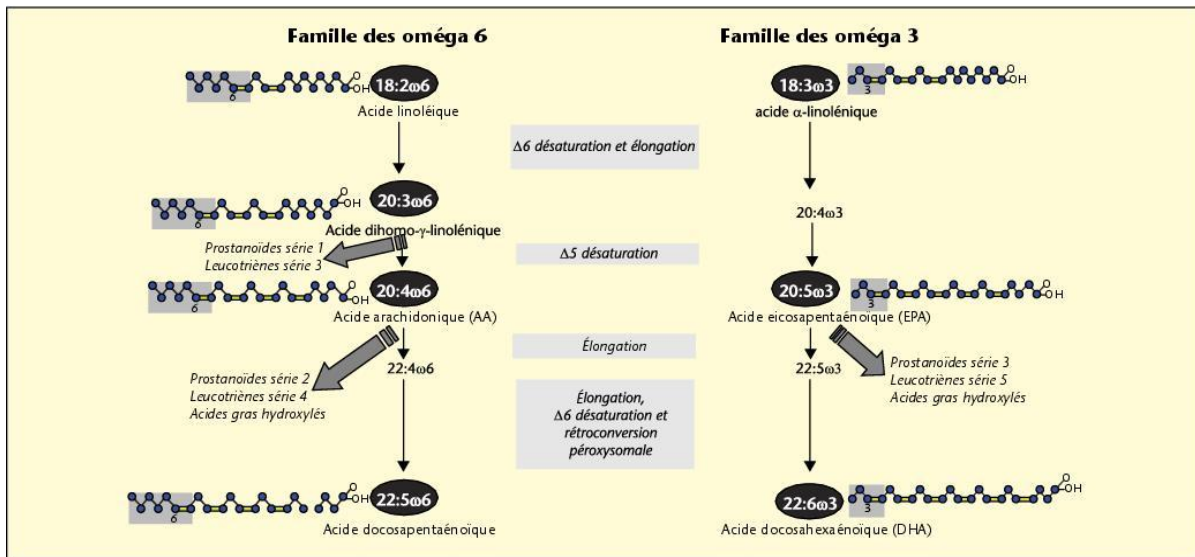


Figure 11 : Voies de biosynthèse des AGPI-LC à partir des AGPI précurseurs essentiels et voies métaboliques des eicosanoïdes.

B. Métabolisme de l'acide arachidonique et principales propriétés de ses métabolites

Le métabolisme de l'AA repose sur l'activation initiale des phospholipases qui le libère des phospholipides transmembranaires. L'AA ainsi libéré peut être oxygéné selon 2 voies métaboliques principales : **la voie des cyclooxygénases (COX) et des lipoxygénases (LOX) (Figure 12).**

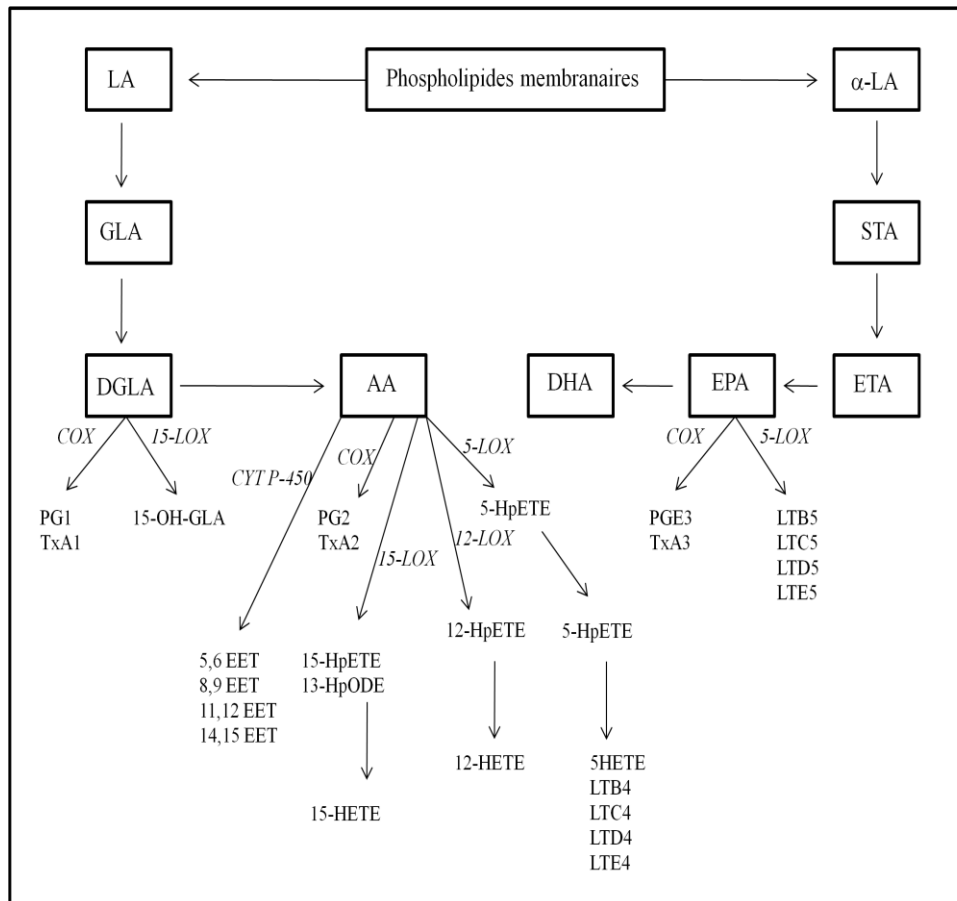


Figure 12 : Biosynthèse des eicosanoïdes à partir des AGPI-LC.

La voie des cyclooxygénases. Cette voie conduit à la synthèse des prostaglandines (PG), thromboxanes (TX) et prostacyclines. Elle fait intervenir 2 types d'enzymes, la cyclooxygénase 1 qui est constitutive et qui s'exprime dans presque tous les tissus et la COX-2 qui est inductible et dont la synthèse peut être amplifiée par des médiateurs de l'inflammation ou par des composés bactériens (151). Les PG dérivées de l'AA (PG de la série 2, PG2) possèdent une forte activité pro-inflammatoire et peuvent augmenter la perméabilité vasculaire. Le TXA2 est un puissant agrégant plaquettaire et également un puissant vasoconstricteur. La prostacycline PGI2 est un vasodilatateur et un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire.

La voie des lipoxygénases. Cette voie conduit à la synthèse des leucotriènes (LT). Les LT dérivés de l'AA sont pro-inflammatoires. Ils stimulent fortement le chimiotactisme des leucocytes, augmentent la perméabilité vasculaire et augmentent la production de TNF- α , d'IL-1 et d'IL-6 (152,153).

Une troisième voie a également été décrite, celle du **cytochrome p450** qui mène à la production d'acide époxyeicosatriénoïque (EET) et d'acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) comme le 20-HETE (154).

Lorsque la réaction inflammatoire évolue, les cellules inflammatoires produisent de l'IL-10 qui, entre autres effets, modifie le métabolisme des PG. Plusieurs études ont montré que l'IL-10 inhibe la production de PGE2 via la régulation de la COX-2 (155). De plus, pour résoudre l'inflammation, les PGD2 peuvent former la PGJ2 qui à son tour peut former la 15d-PGJ2 (156). Cette dernière peut exercer des activités anti-inflammatoires en se liant au facteur transcriptionnel PPAR- γ . Il a été démontré que le 15d-PDJ2 inactive le facteur de transcription NF κ B et par conséquent pourrait inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires (157).

L'intervention séquentielle des différentes PG dérivées du métabolisme de l'AA doit permettre dans des conditions physiologiques et lorsque celles-ci sont produites en quantité normale d'établir un équilibre entre le déclenchement de la réponse inflammatoire et son contrôle. Cet équilibre n'est pas atteint dans la mucoviscidose où il existe des anomalies du métabolisme des lipides, un emballement des voies cyclooxygénases et lipoxygénases et un déficit en IL-10 freinant la réponse anti-inflammatoire.

C. Métabolisme de l'EPA et principales propriétés de ses métabolites

L'EPA entre en compétition avec l'AA pour la synthèse des LT et PG, en utilisant les mêmes voies métaboliques de la cyclooxygénase et la lipoxygénase (**Figure 12**) (158).

L'EPA mène à la production de :

- Thromboxane A3, qui produit une faible agrégation plaquettaire et une faible vasoconstriction ;
- Prostacycline PGI3, qui donne une augmentation de la quantité totale de prostacycline en augmentant la PGI3 sans diminuer la PGI2. Comme PGI2, PGI3 a une action vasodilatatrice et inhibe l'agrégation plaquettaire ;

- Leuctotriène B5, qui est un faible inducteur de l'inflammation et un faible agent chimiotactique ;
- Resolvines E, qui est un médiateur anti-inflammatoire favorisant l'élimination des débris inflammatoires et la défense mucoale anti-microbienne.

L'EPA agit en diminuant la production des dérivés pro-inflammatoires issus de l'AA (PGE2, TXA2 et LTB4) et permet la synthèse d'autres molécules dont l'activité inflammatoire et chimiotactique est plus faible (158).

IV. Les oligosaccharides

A. Origines et structure

Selon leur origine, on distingue 2 grandes classes d'oligosaccharides (OS) : ceux présents dans le lait humain ou des mammifères et ceux qui sont retrouvés dans les végétaux, bactéries et champignons.

1. Les oligosaccharides du lait humain

Le lait humain comprend 80% d'OS neutres et 20% d'OS acides (159). Ils contiennent 5 composés de base, le D-glucose (Glc), le D-galactose (Gal), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le L-fucose (Fuc) et l'acide sialique (acide N-acétylneuraminique, Neu5Ac). Leur association forme des structures plus ou moins complexes. L'association d'une molécule de β -D-galactose et β -D- glucose forme le lactose, qui est le composé essentiel du lait. Il peut être sialylé ou fucosylé en deux sites différents pour former, soit un 3'sialyllactose et un 6'sialyllactose, soit un 2'fucosyllactose et un 3'fucosyllactose. Ces trisaccharides forment les oligosaccharides à chaînes courtes. Le lactose peut également s'associer au N-acétylglucosamine suivi de l'addition de galactose pour former des structures oligosaccharidiques plus complexes, qui peuvent également être sialylés ou fucosylés. Le lait humain contient plus de 200 structures oligosaccharidiques (160). La concentration en OS

libres est particulièrement élevée dans le colostrum (20-23 g/L) et diffère de celle du lait mature qui est produit à partir du 3^{ème} ou 4^{ème} jour (12-14 g/L).

2. Les oligosaccharides dérivés des végétaux

a. Les fructooligosaccharides, les β -fructanes et l'inuline

Ces OS sont des ingrédients naturels de la chicorée, la banane, l'oignon, l'artichaut. Ce sont des polymères linéaires ou branchés de fructose liés en β 2-1 ou β 2-6. On distingue les fructooligosaccharides (FOS) à chaînes courtes (scFOS, degré de polymérisation=2-6) et les FOS à chaînes longues (lcFOS, degré de pomymérisation=7-60) (**Figure 13**) (161).

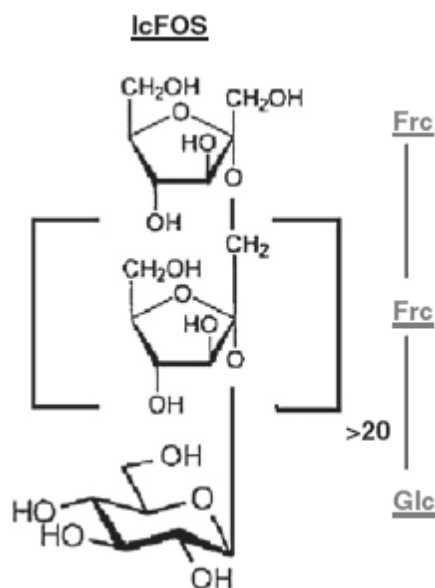


Figure 13 : Structure biochimique des lcFOS (162).

b. Les galactooligosaccharides

Les galactooligosaccharides (GOS) sont des polymères de galactose possédant un glucose en position terminale réductrice, et ayant un degré de polymérisation inférieur à 10 monomères. Ils sont ainsi principalement désignés comme galactooligosaccharides à chaînes courtes (scGOS) Ils sont synthétisés à partir du lactose par une β -galactosidase d'origine bactérienne (163). Les scGOS peuvent être produits à partir du lactose présent dans le lait de

vache, mais la source principale utilisée pour leur production commerciale est le lactosérum (**Figure 14**) (164).

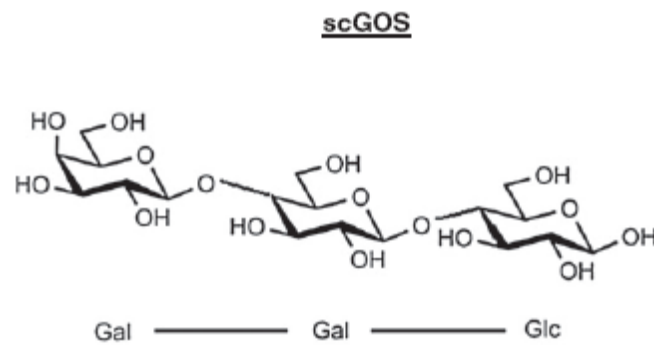


Figure 14 : Structure biochimique des scGOS (162).

c. Les oligosaccharides acides

Ces OS sont présents dans la pectine qui est le composant structural majeur de la paroi cellulaire des végétaux. La pectine, bien connue comme composant actif sur la flore intestinale (165) et sur l'immunité (166), est clivée en fragment oligosaccharidiques acides d'où leur nom de pAOS (oligosaccharides acides dérivés de la pectine). Les pAOS de la carotte sont connus depuis plus de 100 ans pour leurs propriétés bénéfiques dans le traitement des diarrhées . Ce sont des polymères d'acides galacturoniques partiellement méthylés et insaturés (**Figure 15**) (164).

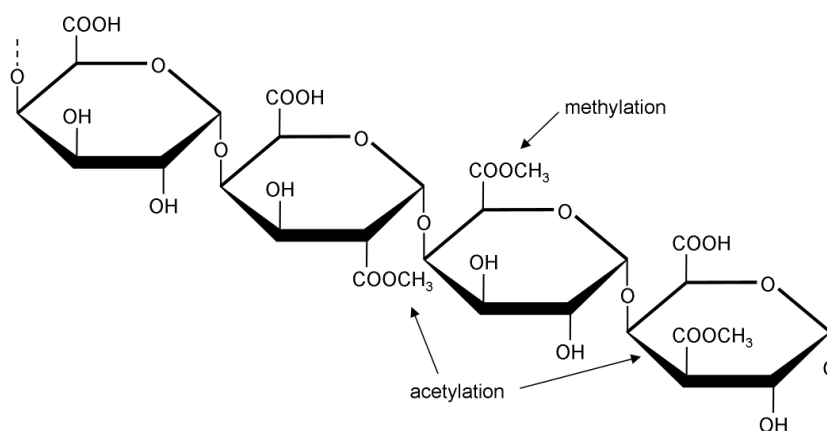


Figure 15 : Structure biochimique de la pectine (166).

B. Définition des prébiotiques

Les OS neutres et acides décrits précédemment sont des prébiotiques. Ils correspondent selon la définition initiale de Gibson et Roberfroid à des composants alimentaires non digestibles qui affectent de façon bénéfique l'hôte en stimulant la croissance ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de souches de bactéries bénéfiques dans le colon (167). Cette définition initiale des prébiotiques a été mise à jour en ajoutant les propriétés de résistance à la digestion et de fermentation par le microbiote intestinal du côlon (168). Ils sont actuellement désignés comme « des ingrédients non digestibles, sélectivement fermentés, permettant des modifications de la composition et de l'activité du microbiote intestinal et ayant des bénéfices sur la santé et le bien être de l'hôte ». L'activité prébiotique des pAOS leur confère 3 propriétés principales : des propriétés anti-infectieuses, anti-inflammatoires et immunomodulatrices.

C. Actions immunomodulatrices des oligosaccharides

Les OS ont des propriétés immunomodulatrices provenant :

- soit de leur action directe sur les cellules immunitaires ;
- soit de leur action sur la croissance de bactéries aux propriétés immunomodulatrices comme les lactobacilles et les bifidobactéries dans l'intestin

Dans un souci de clarté, nous détaillerons dans un premier temps les propriétés immunomodulatrices directes sur les cellules immunitaires, puis leur rôle stimulateur de la flore intestinale. Enfin, les effets bénéfiques des OS dans les désordres immunologiques seront détaillés. Le chapitre suivant mettra en évidence le rôle de la flore intestinale dans le développement du système immunitaire afin de faire le lien avec l'effet prébiotique des OS.

1. Effets immunomodulateurs des oligosaccharides indépendants de la flore intestinale

Les OS pourraient agir directement sur les cellules immunitaires mais leur action dépendrait du type d'OS et du type de cellules immunes.

a. Mise en évidence de l'effet immunomodulateur indépendant de la flore intestinale

L'action des OS sur les cellules T a été démontrée en cultivant des populations cellulaires comme celles contenues dans le sang du cordon en présence de différents types d'OS et en mesurant la production des cytokines Th1 et Th2. Par cette méthode, Eiwegger *et al.* (20,169) observent que les OS acides dérivés du lait humain stimulent la production d'IFN- γ par les Lc T CD4⁺ et TCD8⁺, n'ont pas d'effet sur la production d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-12 et augmentent la proportion des T CD4⁺ CD25⁺. Cet effet serait cependant dépendant des OS. Il n'est pas observé avec la fraction neutre des OS du lait humain et avec la fraction acide du lait de vache. L'effet immunomodulateur des OS dépend également de l'origine des Lc. C'est ainsi que les OS du lait humain peuvent diminuer la production des cytokines Th2 (IL-4 et IL-13) et augmenter la production d'IFN- γ par des Lc TCD4⁺ de patients allergiques à l'arachide.

b. Mécanismes d'action des oligosaccharides sur les cellules immunitaires

Plusieurs hypothèses sont actuellement émises pour expliquer l'action directe des OS sur les cellules immunes. Elles sont basées sur l'interaction des OS avec les lectines présentes à la surface des cellules immunes comme les lectines de type C situées à la surface des CD, les galectines qui se fixent à la surface des cellules immunitaires comme les Lc, et les sélectines de l'endothélium activé. En outre, les OS pourraient agir directement sur les récepteurs tels que ceux impliqués dans l'immunité innée.

i. Interaction avec les lectines de type C

L'action des OS sur les CD n'est pas démontrée, mais les OS en se fixant sur certaines lectines des CD pourraient intervenir dans le développement de la réponse immunitaire en bloquant la synapse CD / Lc Th0. Ce mécanisme est possible entre la lectine de type C spécifique DC-SIGN exprimée à la surface des CD et les OS riches en galactose et en N-acétyllactosamine et les trisaccharides Lewis x (Le^X) présents dans les OS du lait humain. Ces OS en se fixant sur la lectine C (170) pourraient inhiber l'interaction des CD et des Lc Th0 lors de la capture des antigènes pour la présentation du CMH au Lc T (171,172). Comme les

CD captent les antigènes situés dans la lumière intestinale, elles pourraient interagir avec les oligosaccharides non digérés à cet endroit (173).

ii. Interaction avec les lectines de type S (glectines)

L'action directe des OS sur les Lc pourrait également se faire par l'intermédiaire des lectines de type S ou glectines. Ces molécules sont exprimées par les cellules immunes comme les Lc et sont connues pour moduler le système immunitaire. A titre d'exemple, la glectine 1 est capable de diminuer la production de NO par les macrophages (174), d'induire l'activation alternative des macrophages (174), de bloquer la prolifération des Lc T (175) et de stimuler la production d'IL-10 et l'expansion des Treg (176). La glectine 1 est capable de se fixer sur la protéine CD2 présente à la surface des cellules T, déstabilisant l'interaction CPA-cellule T et supprimant l'activation des Lc T (177). La glectine 3 supprime l'activation du TCR des Lc T. La glectine 9 conduit à une augmentation de la maturation des CD, à la production d'IL-12 et de cytokines Th1 (178). Les OS en se fixant sur ces glectines pourraient donc inhiber leur fonction.

iii. Interaction avec les sélectines

Les oligosaccharides sialylés et les OS du lait humain pourraient réduire le rolling et l'adhésion de leucocytes humains sur l'endothélium activé en se fixant sur les sélectines. Les sélectines sont impliquées dans l'interaction cellule-cellule des cellules immunitaires. Les P- et E-sélectines participent au rolling des leucocytes sur l'endothélium activé et initie leur extravasation aux sites inflammatoires. Cet effet des OS pourrait expliquer une action anti-inflammatoire (179). Klein *et al* ont également montré que les OS du lait humain sont capables d'inhiber l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire de manière dépendante de la concentration (180).

iv. Interaction avec d'autres récepteurs

Les OS sont également capables d'interagir avec :

- **les Siglec** (*Sialic acid binding Ig-like lectins*). Ce sont des lectines présentes à la surface

des CDs et des macrophages (170,181). Elles fixent les acides sialiques en position terminale (α 2-3 et/ou α 2-6) qui sont aussi présents dans certains OS maternels. Les Siglecs sont connus pour leur rôle immunosuppresseur notamment sur la fonction des leucocytes (182) ;

- **les TLR.** Les fructanes sont capables de se fixer sur le TLR4 et ainsi activer la production d'IL-12 et d'inhiber la réponse Th2 et la production d'IgE (183,184) ;
- **les cytokines.** Il existe des domaines de fixation aux sucres sur les cytokines. La fixation des OS sur ces domaines pourrait modifier l'action des cytokines et expliquer les effets immunomodulateurs des OS (185).

c. Transport des oligosaccharides au travers de l'épithélium intestinal

Pour exercer un effet systémique, les OS doivent traverser la paroi intestinale et peu de données existent concernant leur transfert à travers la barrière intestinale. Les OS du lait humain sont retrouvés dans les urines des enfants allaités selon une proportion de 1% (186,187) et pourraient également se retrouver dans la circulation systémique. En se basant sur la concentration en OS dans le lait, la consommation journalière de lait maternel, le volume sanguin de l'enfant et la quantité d'urine produite, la concentration sanguine en oligosaccharides pourrait atteindre 100-200 mg/L. Il a été montré *in vitro* que les oligosaccharides du lait humain chargés positivement ou négativement sont captés par les cellules épithéliales via une voie para- ou transcellulaire (188). Récemment, Eiwegger a montré *in vitro* dans un modèle cellulaire de transfert épithéliale (lignée CaCo-2) que, selon leur taille et leur structure moléculaire, 4 à 14% des lcFOS, scGOS et pAOS sont transférés et qu'une partie de ces OS est aussi retrouvée dans les compartiments intracellulaires (20).

2. Action des oligosaccharides sur la flore intestinale

L'action des OS comme ceux du lait humain sur la croissance dans l'intestin de *B. bifidum* a été démontrée pour la première fois en 1954 par György (189). Depuis ils ont été abondamment étudiés et leur mode d'action sur la flore intestinale pourrait être soit direct en servant de substrats aux bifidobactéries et lactobacilles qui possèdent les enzymes nécessaires

à leur hydrolyse, soit indirect en générant des produits de fermentation. Parmi ceux-ci, on retrouve les acides gras à chaînes courtes (AGCC) qui en diminuant le pH luminal du côlon (190) inhibent la croissance de bactéries pathogènes comme *Bacteroides spp* (191), et des substrats secondaires comme le fructose qui favorisent la croissance d'autres bactéries comme *Anaerostipus caccae*, *Eubacteria rectale*, *Clostridium coccoïdes* et *Roseburia inulinivorans*.

Cette modification de la flore intestinale par les OS a des conséquences locales importantes sur les propriétés de la muqueuse intestinale, la prévention des diarrhées infectieuses ou post antibiotiques et l'atténuation de l'inflammation dans les colites inflammatoires. Mais leur effet sur la flore intestinale varie selon le composé (164,192,193).

Les lcFOS (194,195) et les scGOS (196,197), pris isolément ont un effet sur la croissance des lactobacilles et/ou des bifidobactéries et améliorent la consistance des selles. Les scGOS et les lcFOS en association (ratio 9 :1) miment les effets de l'allaitement maternel sur la flore fécale par l'établissement d'une flore bifidogène et/ou lactogène (198-201) et leur effet bifidogène pourrait se prolonger chez les nourrissons 6 mois après l'arrêt de leur administration dans les laits formulés (202).

Les pAOS seuls n'ont pas d'effet sur la flore intestinale et sur le pH des selles, mais améliorent la consistance des selles (203). Cependant, selon certaines études (203,204), les pAOS pourraient agir en synergie avec scGOS/lcFOS et augmenter la proportion de lactobacilles et bifidobactéries observés après une supplémentation par le mélange scGOS/lcFOS, améliorer la consistance des selles et diminuer leur pH. Mais ces résultats sont encore controversés et doivent encore être confirmés (205).

3. Propriétés immunomodulatrices des oligosaccharides dépendantes de leur action sur la flore intestinale

La modulation de la flore intestinale par les oligosaccharides pourrait avoir un effet bénéfique sur la santé au moins comparable à l'action des probiotiques comme les bifidobactéries et les lactobacilles (cf chapitre suivant sur la flore intestinale). Les effets majeurs sont ceux qui concernent la prévention ou le traitement des diarrhées infectieuses ou post antibiotiques et l'intégrité des fonctions de la muqueuse intestinale qui pourraient être bénéfiques dans les maladies inflammatoires de l'intestin. La modulation de la flore colique pourrait aussi avoir des conséquences sur le développement de la réponse immune et en

particulier la réponse Th2 (cf chapitre suivant sur la flore intestinale) qui est associée aux maladies allergiques et sur la réponse immune cellulaire qui est impliquée dans l'immunité anti-infectieuse et sollicitée dans le processus de vaccination. Ce sont les données de la littérature concernant ces 2 domaines que nous développerons ici.

a. Effets des oligosaccharides dans les maladies allergiques

L'effet bénéfique des OS a été démontré dans des modèles expérimentaux d'allergie respiratoire ou alimentaire et chez l'homme dans les dermatites atopiques.

Les modèles expérimentaux d'allergie respiratoire reposent sur une sensibilisation de rats ou de souris à l'ovalbumine. Dans ces modèles, une alimentation enrichie en 5% de scGOS (206) ou en 1% de scGOS/lcFOS (ratio 9 :1) administrée pendant 14 jours (207) diminue l'hypersensibilité des voies aériennes en réduisant la production d'IgE spécifiques de l'ovalbumine dans le sérum, le recrutement des éosinophiles et l'expression de l'IL-4 (207). Cet effet est amplifié par le mélange scGOS/lcFOS/pAOS (85% scGOS/lcFOS (ratio 9:1) + 15% pAOS) (207).

Les modèles murins d'allergie alimentaire au lait de vache sont induits par l'administration orale de caséine. Dans ces modèles, l'administration d'un mélange de 2% de scGOS/lcFOS/pAOS pendant 14 jours dans l'alimentation diminue la réponse allergique en réduisant le nombre de cellules Th2 et en augmentant le nombre de cellules Th1 dans les nœuds mésentériques lymphoïdes (208). Le mécanisme serait dépendant de l'activation des cellules Treg et l'effet protecteur de ces Lc peut être transféré à des souris naïves en leur injectant des splénocytes de souris sensibilisées et nourries avec le mélange scGOS/lcFOS/pAOS (209). Selon Fujitani *et al.* (210) cet effet est aussi associé à une diminution du nombre de mastocytes et de la formation d'œdèmes duodénaux.

Les essais chez l'homme montrent que l'addition aux laits formulés d'un mélange de 0,8% scGOS/lcFOS ou d'un mélange de 0,8% scGOS/lcFOS/pAOS diminue la fréquence des épisodes allergiques notamment chez des enfants à haut risque en réduisant l'incidence des dermatites atopiques au cours de 6 premiers mois de vie (211). L'effet peut durer 2 ans et est associé à une réduction de l'incidence des infections respiratoires chez ces enfants (212). L'effet anti-allergisant de ces OS pourrait apporter un bénéfice supplémentaire à l'allaitement maternel dans la mesure où les nourrissons recevant ces formules auraient également moins de dermatite atopique que ceux qui sont allaités (264). Le mélange scGOS/lcFOS pourrait

également réduire les allergies alimentaires en diminuant la concentration d'immunoglobulines à chaîne courte (qui sont impliqués dans les phénomènes allergiques) chez des enfants à risque d'allergie (213). Ce bénéfice est associé à une diminution de la concentration plasmatique d'IgG1, IgG2, IgG3, et des anticorps IgG1 spécifiques des protéines de lait de vache (214).

b. Effet bénéfique des OS sur la réponse vaccinale

Comme précédemment, l'effet bénéfique des OS dans la réponse vaccinale a été étudié dans des modèles murins. Dans un modèle murin de vaccination contre le virus *influenza*, plusieurs études montrent que le mélange scGOS/lcFOS (215), les pAOS ou l'association scGOS/lcFOS/pAOS (216,217) ajoutés dans l'alimentation pendant 6 semaines stimulent les mécanismes d'immunité cellulaire mais n'ont aucun effet sur la prolifération des splénocytes et sur la production d'Ac spécifiques de la vaccination. Ces effets sont corrélés à une diminution de la production de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) et du ratio IL-4/IFN- γ . Mais le mélange scGOS/lcFOS/pAOS serait le seul à augmenter significativement la production d'IFN- γ et à stimuler efficacement la réponse Th1. L'étude du mécanisme d'action de ce mélange a été complétée par une exploration de la réponse immune impliquant les Lc Treg. Leur nombre n'est pas modifié par l'administration du mélange scGOS/lcFOS/pAOS, mais leur inactivation par l'administration d'un Ac spécifique réduit la surexpression de la réponse Th1 observée chez les souris recevant ce mélange. Ces cellules pourraient donc jouer un rôle prépondérant dans la modulation de la réponse vaccinale induite par les prébiotiques (218).

V. Rôle de la flore intestinale sur le développement de la réponse immune

La flore intestinale représente la source la plus importante de *stimuli* microbiens et joue un rôle prépondérant dans la maturation et le développement postnatal du système immunitaire qui permet de distinguer les bactéries pathogènes des bactéries commensales et les antigènes exogènes des antigènes du soi. Ce rôle fut suggéré la première fois par Elie Metchnikov en 1907. Il a établi un lien entre la consommation régulière d'une alimentation

enrichie en produits laitiers fermentés et la longévité plus importante de certaines populations. Il s'est appuyé sur l'observation faite par Henry Tissier en 1906 qui avait remarqué que les enfants nourris au lait maternel avaient moins d'infections que ceux nourris au lait de vache et que contrairement aux selles des enfants sains, les selles des enfants souffrant de diarrhée ne contenaient qu'un faible nombre de bactéries en forme de Y.

A. Le tissu lymphoïde associés au tube digestif

La stimulation du système immunitaire par la flore intestinale s'effectue au niveau du tissu lymphoïde associé au tube digestif ou GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*), qui représente l'organe lymphoïde le plus riche en cellules immunes et qui comprend les plaques de Peyer (PP), les follicules lymphoïdes de l'intestin, les ganglions mésentériques lymphoïdes ou MLN (*Mesenteric Lymph Node*) (**Figure 16**), mais aussi l'appendice, les amygdales et les végétations de la gorge (219).

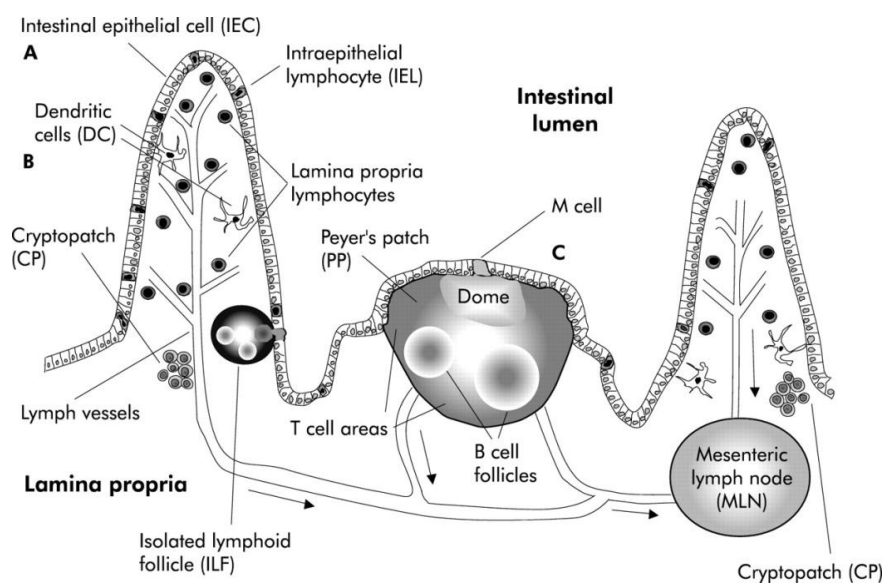


Figure 16 : Structure des principaux organes lymphoïdes du GALT : les plaques de Peyer (PP) et les ganglions mésentériques lymphoïdes (MLN) sont organisés en follicules lymphoïdes. (A-C) Les antigènes luminaux peuvent être repris par (A) les cellules épithéliales intestinales, (B) les CD de la *lamina propria*, et par les cellules M (C). Le drainage lymphatique est réalisé des PP et des villosités de la *lamina propria* vers les MLNs (direction de la circulation de la lymphe indiquée par les flèches) (220).

1. Structure des principaux organes lymphoïdes du GALT

a. Les plaques de Peyer

Les plaques de Peyer (PP) sont des sites extrêmement importants pour l'induction de la réponse immunitaire au niveau de l'intestin et ont une forme caractéristique en dôme débordant au niveau de la lumière intestinale. Ces structures lymphoïdes regroupent des agrégats de cellules lymphoïdes comprenant un grand nombre de follicules de cellules B et avec des centres germinatifs et de plus petites zones de cellules T (219). Leur couche supérieure est composée de cellules épithéliales spécialisées appelées cellules M (Microfold) (221). Ces cellules sont caractérisées par la présence de petits pores à leur surface apicale au lieu de microvillosités rencontrées chez les cellules épithéliales classiques. Les cellules M sont moins nombreuses que les entérocytes. Elles ne sécrètent pas d'enzymes digestives ni de mucus et ont la capacité d'interagir directement avec les molécules présentes dans la lumière intestinale. Leur rôle est de capter les antigènes de la lumière intestinale par endocytose ou phagocytose puis de les amener par transcytose vers leur membrane basale. Cette dernière présente de nombreux replis où peuvent se loger des Lc et des CD. Les CD pourront présenter les particules libérées par les cellules M aux Lc T naïfs présents dans les zones T des plaques de Peyer ou dans les ganglions lymphatiques. Ce moyen de stimuler la réponse immunitaire par les cellules M n'est pas le seul. Les CD sont également capables de prélever directement des antigènes présents dans la lumière intestinale par l'intermédiaire de leurs longs prolongements cytoplasmiques (dendrites) sans en altérer l'intégrité de l'épithélium intestinal en traversant l'espace entre les cellules.

b. Les follicules lymphoïdes

Ils sont isolés et sont présents sous l'épithélium intestinal. Ils contiennent essentiellement des Lc B (222). De nombreux Lc sont également dispersés tout au long de l'épithélium et de la *lamina propria* de l'intestin en dehors des tissus lymphoïdes organisés. Ces Lc représentent les cellules T CD4 et CD8 ou les plasmocytes sécrétant des anticorps du système immunitaire de la muqueuse intestinale (IgA). Des agrégats lymphoïdes sont

également présents au niveau des cryptes de la *lamina propria* de l'iléon contenant des cellules lymphoïdes et des CD. Ils sont plus nombreux que les follicules isolés et les PP (223).

c. Les ganglions mésentériques

Ils sont situés dans le tissu conjonctif qui attache l'intestin à la paroi intestinale. Ils sont connectés aux plaques de Peyer et aux follicules isolés par des vaisseaux lymphatiques. Ce sont les ganglions les plus volumineux du corps et ils jouent un rôle prépondérant dans le déclenchement de la réponse immunitaire aux antigènes intestinaux.

2. Différenciation des lymphocytes Thelpers au niveau intestinal

Le mécanisme de différenciation et de migration des Lc Th1 et Th2 au niveau du GALT est le même que pour les autres organes lymphoïdes comme ceux situés au niveau de la peau. Ces mécanismes sont représentés à la **Figure 17**. Dans les plaques de Peyer, les Lc T naïfs rencontrent des antigènes environnants et deviennent des Lc T activés effecteurs. Ces derniers quittent les plaques de Peyer vers la circulation lymphatique et passent par les ganglions mésentériques. Ils arrivent jusqu'au canal thoracique où ils atteignent la circulation sanguine et peuvent circuler dans tout le corps. Ils retournent dans les tissus muqueux *via* les vaisseaux sanguins entourant la paroi intestinale.

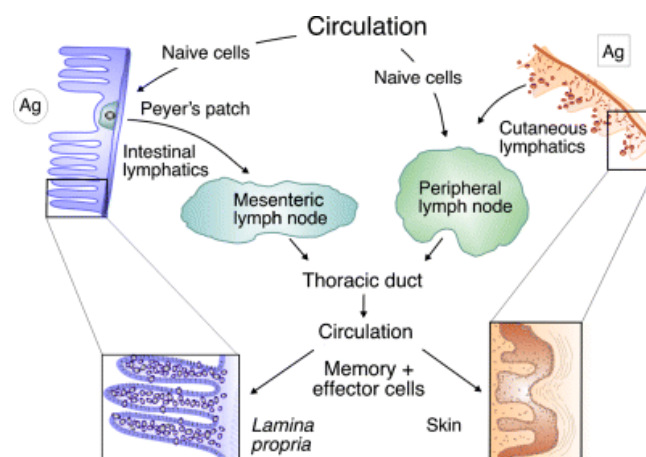


Figure 17 : Schéma de la recirculation des Lc à partir de l'intestin et de la peau. Le transport des antigènes étrangers (Ag), par exemple des fragments bactériens, dans les organes lymphoïdes a lieu à travers l'épithélium de l'intestin et via les vaisseaux lymphatiques afférents drainant la peau. Les Lc sanguins pénètrent dans les tissus lymphatiques organisés (ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer) par la circulation systémique et leur extravasation dans la haute veinule endothéliale post-capillaire. Par la suite, les Lc migrent dans les tissus à

la recherche de leurs antigènes apparentés. Si l'antigène est reconnu, les Lc sont activés dans les centres germinatifs (cellules B) ou en dehors des centres (cellules T). Les cellules activées et les cellules qui n'ont pas trouvé leur antigène quittent les nœuds en entrant dans les vaisseaux lymphatiques et retournent via les vaisseaux lymphatiques efférents dans la circulation sanguine (224).

B. Mise en évidence du rôle de la flore intestinale dans le développement du système immunitaire

La plupart des connaissances actuelles sur le rôle du microbiote dans le développement du système immunitaire sont basées sur l'utilisation d'animaux axéniques, sur des animaux gnotobiotiques et sur la mise en évidence de relations entre un déséquilibre de la flore intestinale et des désordres immunologiques.

1. Les animaux axéniques

Les animaux axéniques sont par définition des animaux dépourvus de flore intestinale. Ils présentent de nombreuses anomalies morphologiques et fonctionnelles des organes lymphoïdes et une grande sensibilité aux infections. Leur système immunitaire, en particulier le GALT et les organes lymphoïdes secondaires sont immatures. Les plaques de Peyer sont sous-développées et le nombre et la taille des centres germinatifs dans la rate sont réduits (225). Le nombre de Lc T et de Lc B sécrétant des IgA présents dans le GALT est diminué (226). Ces différences de développement des organes lymphoïdes sont représentées à la **Figure 18**. A ces anomalies morphologiques s'ajoutent des anomalies fonctionnelles. Dans la *lamina propria*, le nombre de Lc T CD4⁺ produisant de l'IL-17, l'IFN- γ , l'IL-10, et le TNF- α est diminué (227) et le nombre de Lc intra-épithéliaux CD8⁺ est 10 fois moins élevé que chez des animaux élevés en animalerie conventionnelle (228,229). Les animaux axéniques sont également caractérisés par un déséquilibre de la réponse Th en faveur d'une réponse Th2. Sudo *et al.* (230) ont montré dans un modèle murin d'allergie que l'absence de flore empêche le développement d'une réponse Th1 (diminution de la production d'IgG2 et d'IFN- γ) et favorise le maintien de la réponse Th2.

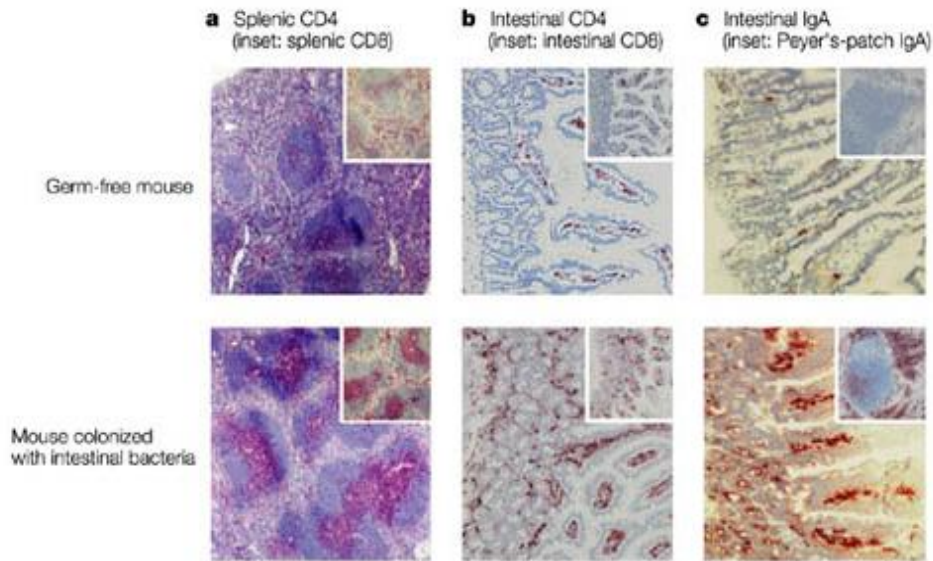


Figure 18 : Coupe histologique de rate et de colon de souris C57BL/6 axéniques (Germ-free) et de souris colonisées par des bactéries intestinales. a : diminution du nombre de centres germinatifs au niveau de la rate. b. diminution du nombre de follicules lymphoïdes dans le côlon. c. diminution de la production d'IgA au niveau du côlon (225).

Les animaux axéniques sont plus sensibles aux infections que les animaux élevés en animalerie conventionnelle, qu'elles soient causées par des pathogènes intestinaux comme *Salmonella enteritidis* (231) ou extra-intestinaux comme *Leishmania major* (232) et le virus *influenza A* (233). Leur grande sensibilité aux infections intestinales est attribuée à l'absence de flore intestinale et à un défaut de production de peptides antimicrobiens comme le REG3 γ (*Regenerating islet-derived protein 3 gamma*) produit par les cellules de Paneth (234,235). La flore intestinale intervient en se fixant sur les récepteurs glycoconjugués membranaires de la muqueuse intestinale et en limitant ainsi l'adhésion des bactéries pathogènes. Elle participe activement à ce phénomène en synthétisant des glycoconjugués par l'activation de glycosyltransférases (236). La plus grande sensibilité des animaux axéniques aux infections extra-intestinales pourrait être reliée à un effet systémique et être associée aux anomalies fonctionnelles des organes lymphoïdes. Cette relation a été démontrée pour les infections par le parasite *L. major*. Les animaux axéniques produisent plus d'IFN- γ , ce qui témoigne d'une potentialisation de la réponse Th1, mais sont incapables de réduire les lésions engendrées par l'infection, alors que ce mécanisme est normalement contrôlé par une réponse Th2 (232).

2. Les animaux gnotobiotiques

Le rôle de la flore intestinale dans le développement du système immunitaire a été également mis en évidence avec des animaux gnotobiotiques (animaux dont la flore intestinale est contrôlée). Leur utilisation permet de démontrer le rôle de certaines espèces bactériennes dans le développement du système immunitaire. La recolonisation de l'intestin des animaux axéniques par *Bacteroides fragilis* favorise le développement des organes lymphoïdes et permet de corriger le déséquilibre de la réponse T CD4 observé chez les animaux axéniques (237). Ce mécanisme est lié à une augmentation du nombre de cellules T et à un rééquilibrage de la réponse Th1/Th2 en faveur d'une réponse Th1. Le mécanisme serait secondaire à la stimulation des CD par la capsule de polysaccharides de la bactérie qui stimule la production d'IL-12. De la même manière, la reconstitution d'une flore intestinale par *Bifidobacterium infantis* restaure le déséquilibre de la réponse Th2 observé dans un modèle murin de sensibilisation à l'ovalbumine (230).

3. Déséquilibre de la flore intestinale et désordres immunologiques

Certains désordres immunologiques, comme des phénomènes d'allergies, l'obésité, le diabète et les maladies inflammatoires de l'intestin sont associés à un déséquilibre de la flore intestinale. Cette relation a été définie par Stachan en 1989 selon le concept d'« hygiène hypothesis » (238). Elle suggère qu'une réduction de l'exposition à des agents infectieux ou qu'un changement de composition de la flore intestinale pendant l'enfance pourrait altérer la régulation du système immunitaire, notamment la différenciation des cellules T, modifier le phénomène de tolérance immunitaire et engendrer une augmentation de l'incidence des maladies allergiques et des maladies inflammatoires de l'intestin (239). D'après de nombreuses études (240-242), la flore intestinale des enfants souffrant d'atopie serait différente et contiendrait moins d'espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, excepté *Bifidobacterium adolescentis* qui y serait prédominante par rapport à la flore intestinale des enfants sains (243). La colonisation précoce par *Bacteroides fragilis* et *Clostridium coccoides* chez l'enfant a été corrélée à l'apparition de symptômes asthmatiques (243,244). Le ratio *Bifidobacterium* / *Clostridia* serait plus faible pendant la période néonatale chez les enfants allergiques que les enfants non allergiques. Cette flore pourrait favoriser une réponse

immunitaire majoritairement de type Th2. Pourtant, il n'est pas encore clairement défini si l'altération de la flore est une cause ou une conséquence de l'apparition de phénomènes allergiques, même si 2 études suggèrent que la modification de flore précède l'apparition des symptômes allergiques (245,246). La flore intestinale des patients atteints de maladie inflammatoire de l'intestin, comme la maladie de Crohn, est différente de celle des patients sains (247). Leur flore intestinale contient moins de bactéries anaérobies comme les *Bacteroides* et les *Firmicutes*. Cette modification de la flore intestinale est associée à une polarisation de la réponse immune vers une réponse Th1.

C. Les principales bactéries impliquées dans le développement du système immunitaire

1. Définition des probiotiques

Le rôle bénéfique de la flore intestinale sur l'immunité est la propriété de certaines espèces bactériennes appartenant essentiellement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et de certaines levures appartenant au genre *Saccharomyces*. Mais, seules les bactéries seront développées ici. Ces microorganismes sont présents essentiellement dans les produits fermentés et sont appelés probiotiques (248-250).

Les probiotiques (en langue grecque « pour la vie ») correspondent selon la Food and Agriculture Organisation (FAO), et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), à des "microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte". Ils répondent aux critères de sélection suivants :

- la survie au faible pH intestinal et à la haute concentration de sels biliaires ;
- la capacité à coloniser transitoirement le tractus gastro-intestinal, c'est à dire à se lier au mucus et / ou à l'épithélium intestinal ;
- l'activité antimicrobienne à travers la production de molécules antimicrobiennes ;
- la capacité à inhiber l'adhérence des agents pathogènes à la surface intestinale.

En plus des propriétés précédentes, d'autres critères peuvent être pris en compte pour définir une souche probiotique comme la capacité à moduler le système immunitaire (251).

2. Les lactobacilles

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram + ne formant pas de spores mais des coccobacilles avec un pourcentage en G+C (Guanine et Cytosine) inférieur à 50%. Ce genre fait partie de la sous division des bactéries à Gram + à faible pourcentage en G+C et sont inclus dans le phylum *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordre *Lactobacillales*, et famille *Lactobacillaceae*. Le genre *Lactobacillus* est le plus grand groupe parmi les bactéries lactiques et contient plus de 120 espèces et 20 sous-espèces (http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature) (252), et leur nombre augmente tous les ans. L'arbre phylogénétique des différents lactobacilles est représenté à la **Figure 19**. Ces bactéries sont strictement « fermentrices », aérotolérantes ou anaérobies, aciduriques ou acidophiles. En outre, certaines espèces et souches sont largement utilisées comme initiateurs de la fermentation pour l'alimentation humaine et animale, principalement pour les produits laitiers (yaourt et fromage), les légumes fermentés (olives, cornichons et choucroute), les viandes fermentées (saucissons, saucisses) et le pain au levain et d'autres denrées alimentaires à base de céréales. Bien que moins nombreux que les bifidobactéries, les lactobacilles sont des habitants naturels du tractus gastro-intestinal où ils jouent un rôle essentiel dans le maintien et le rétablissement d'un état sain. Les effets bénéfiques attribués aux lactobacilles probiotiques indigènes comprennent la colonisation de l'intestin et de la muqueuse génitale, l'inhibition de pathogènes, l'immunomodulation, et la réduction du taux de cholestérol.

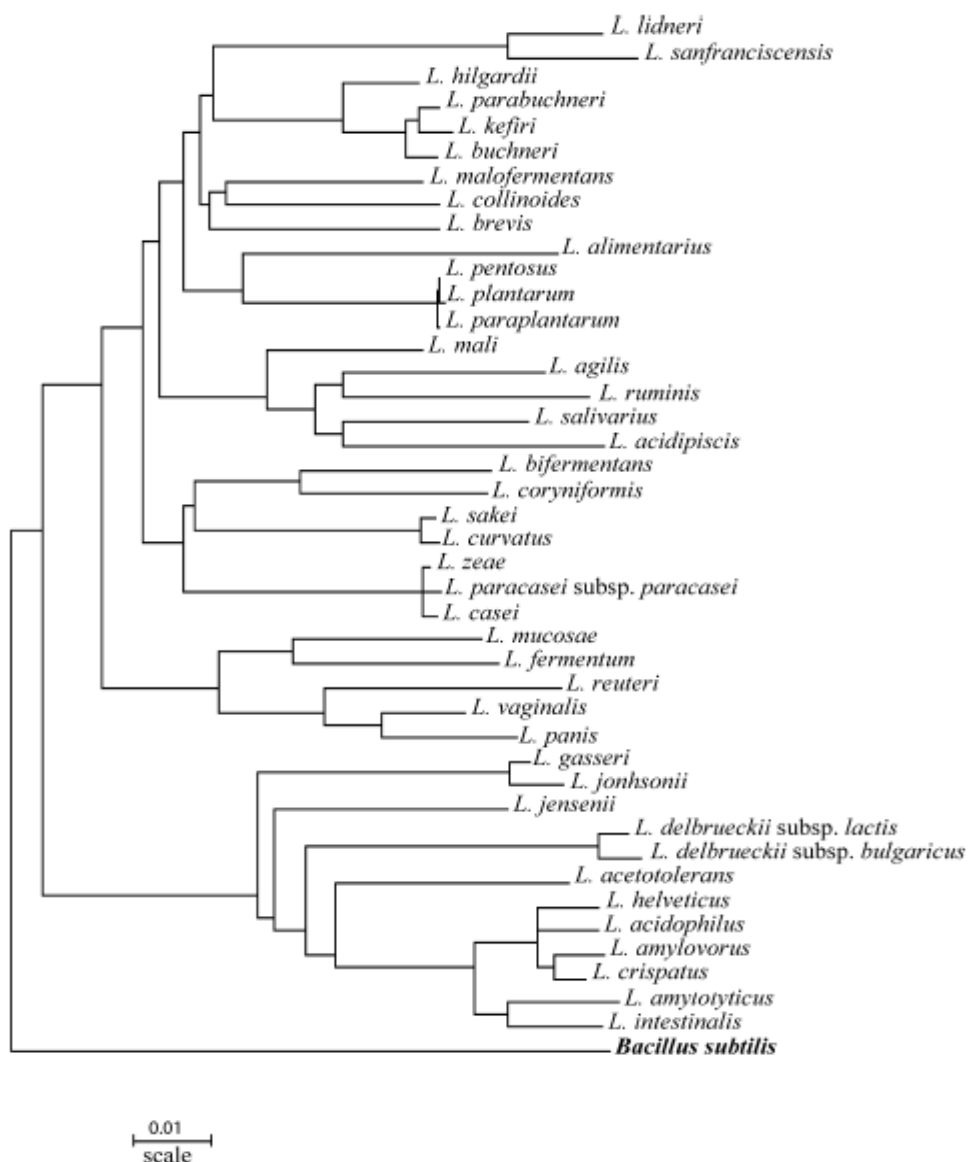


Figure 19 : Arbre phylogénétique des lactobacilles obtenu à partir de l’analyse de leurs séquences d’ARNr 16S (Handbook of probiotics and prebiotics, John Wiley & Sons, 2009, 2nd édition, part I).

3. Les bifidobactéries

Les espèces du genre *Bifidobacterium* forment un groupe phylogénétique montrant entre elles 93% de similarité au niveau des séquences d’ARN ribosomales 16S (ARNr 16S) (150). Ce genre est organisé en différentes sous-populations de bactéries à Gram + à haut pourcentage de G+C. Il est inclus dans le phylum *Actinobacteria*, classe *Actinobacteria*, sous-classe *Actinobacteridae*, ordre *Bifidobacteriales*, et famille *Bifidobacteriaceae*. Selon la base de données regroupant la nomenclature des bactéries, 51 espèces et sous-espèces sont incluses

dans le genre *Bifidobacterium* (http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature) (252). Ces différentes espèces et sous-espèces de bifidobactéries ont été isolées d'un nombre limité d'habitats et ont été regroupées en 6 groupes. L'arbre phylogénétique des différentes bifidobactéries est représenté à la **Figure 20**. Les souches les plus retrouvées dans l'intestin et les fèces de l'homme sont *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. dentium*, et l'espèce isolée de produits alimentaires *B. animalis subsp. lactis*.

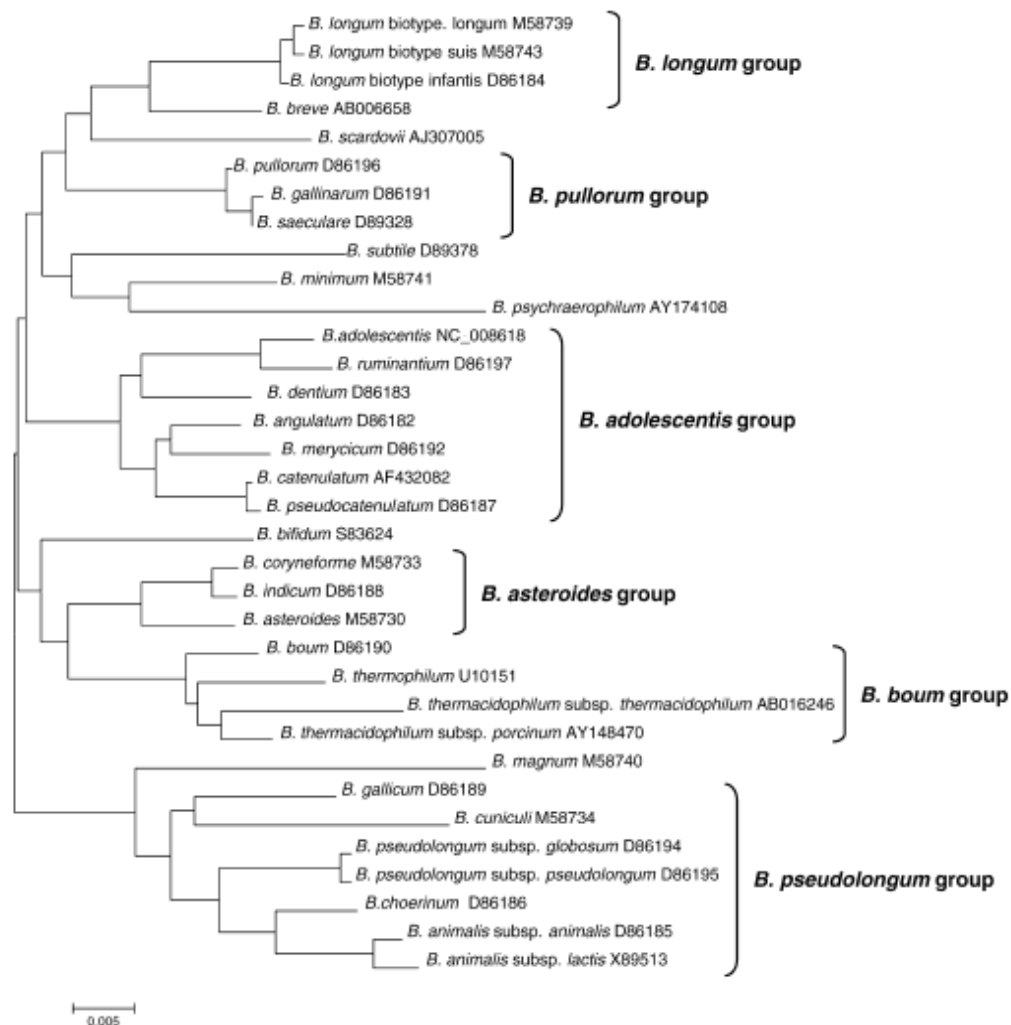


Figure 20 : Arbre phylogénétique des bifidobactéries obtenu à partir de l'analyse de leurs séquences d'ARNr 16S (Handbook of probiotics and prebiotics, John Wiley & Sons, 2009, 2nd édition, part I).

Les espèces bactériennes les plus utilisées comme probiotiques chez l'homme et dans les études expérimentales sont donc les *B. catenulatum*, *B. pseudocatenolatum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. dentium*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*.

D. Mécanismes d'action de la flore intestinale dans le développement du système immunitaire

La flore intestinale peut intervenir dans le développement du système immunitaire en agissant soit directement sur les CD et sur les cellules épithéliales intestinales, soit en produisant des composés à activité immunomodulatrices comme les AGCC.

1. Interaction des cellules dendritiques avec la flore intestinale

L'interaction des CD avec la flore intestinale s'effectue au niveau des différents récepteurs de composés bactériens présents à leur surface comme les TLRs, et ceux présents dans leur cytosol comme les « *Nucleotide-binding Oligomerization Domains* » (NODs) (253,254). Elle est rendue possible grâce à l'expression de protéines de jonction serrées au niveau des CD qui, en ouvrant les jonctions entre les cellules épithéliales intestinales et en émettant des expansions cellulaires (dendrites) entre ces cellules, sont en contact direct avec les bactéries présentes dans la lumière intestinale (255,256). Cette interaction est illustrée à la **Figure 21**.

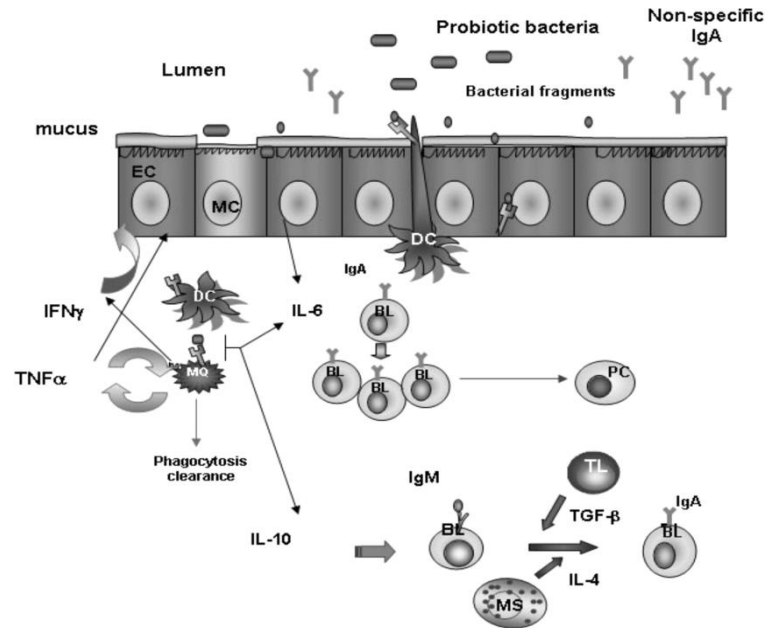


Figure 21 : La réponse immune locale intestinale induite par l'interaction des bactéries probiotiques avec les cellules épithéliales et les cellules immunitaires (257).

L'interaction des CD avec la flore intestinale dépendrait de 2 facteurs principaux : la bactérie et ses composés bactériens reconnaissables par les TLR et les NOD et la susceptibilité individuelle.

a. Importance de la reconnaissance des composés bactériens par les TLR et les NOD

La nature et la fixation de l'antigène bactérien au niveau des TLR et des NOD joueraient un rôle essentiel dans la stimulation et l'orientation de la réponse immunologique. D'après plusieurs études, Le LPS en activant le TLR4 induirait la production d'IL-12 (258) favorisant une réponse Th1, le peptidoglycane en activant le TLR2 induirait la production d'IL-10 favorisant une réponse Th2 (259,260), les mucopeptides avec un acide méso-diamino-pimélique en position terminale (spécifique des peptidoglycanes des bactéries à Gram -) reconnus par NOD1 et les N-acétylmuramyldipeptides des peptidoglycanes des bactéries à Gram + et à Gram -, ainsi que les muramyldipeptides avec une L-lysine en position terminale, reconnus par NOD2 conduiraient à une polarisation de type Th2 (261).

Ainsi, selon la richesse en peptidoglycane, l'interaction des CD avec les lactobacilles et bifidobactéries qui sont dépourvus de LPS mais riches en peptidoglycane pourrait conduire à une réponse de type Th2 qui est anti-inflammatoire et tolérogène, tandis que les bactéries pathogènes (essentiellement des bacilles à Gram-négatif) induiraient préférentiellement une

réponse inflammatoire et une réponse Th1. Cependant ce schéma reste très simplifié et est finalement peu réaliste car il ne tient pas compte des interactions des différents TLR entre eux et des TLR avec les NOD, de la diversité des espèces bactériennes, et de la différence d'expression des TLR entre les individus qui pourrait être à l'origine d'une susceptibilité individuelle. C'est ainsi que le complexe TLR2/TLR1 reconnaît les lipoprotéines tri-acylées exprimées préférentiellement par les bactéries à Gram-négatif et induisent une réponse Th1 alors que le complexe TLR2/TLR6 reconnaît les groupements di-acylés sur l'acide lipoteichoïque et les lipoprotéines des bactéries à Gram-positif et stimulent une production importante d'IL-10 et inhibent la réponse Th1 (262). Selon Voltz *et al.* (263), les lipoprotéines contenues dans la structure du peptidoglycane, et pas le peptidoglycane lui-même, activeraient la signalisation TLR2. NOD1 et NOD2 peuvent être activés par les TLR et par conséquent augmenter le processus inflammatoire et stimuler une réponse Th1 (264,265).

b. Importance de la susceptibilité individuelle

La susceptibilité individuelle reste également un facteur important dans le développement de la réponse immune. Les mécanismes qui pourraient en être responsables sont encore peu explorés chez l'homme. Les premières données concernent une association entre les patients atteints de la maladie de Crohn et des altérations du gène *nod2* (266) et un polymorphisme du gène *nod1* (267). Chez la souris, on est tenté de faire un parallèle entre les différences de réponse immune Th1 et Th2 des souris BALB/c et les souris C57BL/6 et l'expression des TLR. C'est ainsi que les BALB/c expriment les TLR2, 4, 5, et 6 et les C57BL/6 les TLR9 (268).

c. Conséquences de l'interaction des souches de lactobacilles et de bifides sur les cellules dendritiques

Ces conséquences ont été mesurées à partir de tests *in vitro*. La maturation des CD est identifiable par une augmentation de l'expression des antigènes de costimulation (CD80, CD86), l'initiation de la réponse Th1 par une augmentation d'IL-12 ou d'IFN- γ , l'initiation d'une réponse Treg et anti-inflammatoire par une augmentation d'IL-10 et de TGF- β et une diminution de cytokines pro-inflammatoires. Ces effets sont résumés dans le **Tableau II**

Probiotiques	Cellules	Effets	Références
<i>L. gasseri</i> ATCC 19992 ou <i>L. reuteri</i> ATCC 23272 ou <i>L. johnsonii</i> ATCC 33200 (Ratio bactérie / CD : 10:1 ; 100:1 ; 1000:1)	CD* (10 ⁷ cellules)	Maturation des CD (CD80, CD86, CD40, CD83, HLA-DR ↗ Th1 (IFN-γ, IL-12) ↘ IL-10	(269)
<i>L. rhamnosus</i> Lcr35 (10 ⁴ à 10 ⁷ CFU)	CD* (10 ⁶ cellules)	CD semi matures (↗ CD86, CD83, HLA-DR, ↘ DC-SIGN et CD14) ↗ Th1/Th17 (IL-12, TNF-α, IL-1β, IL-23) Dose dépendant	(270)
<i>L. casei</i> CHCC 3139 + <i>L. reuteri</i> DSM12246 Irradiés (1-100µg/ ml)	CD myéloïdes de C57BL/6 (1.4 10 ⁶ cellules)	Activation des CD ↗ IL-12, TNF-α, IL-6, IL-10 ↘ IL-12, TNF-α, IL-6	(271)
<i>L. rhamnosus</i> GG (10 ⁷ CFU)	CD* immatures (2.10 ⁴ cellules)	↗ CMH, ↗ CD83, CD86 faible ↗ TNF-α, IL-6, IL-8	(272)
	CD* matures (2.10 ⁴ cellules)	faible ↗ IL-12, IL-18	
VSL3** (10 ⁵ à 10 ⁷ CFU)	CD myéloïdes de BALB/c (1-2.10 ⁶ cellules)	↗ marqueurs d'activation et de maturation ↗ IL-10, pas ↗ IL-12 Dose dépendant	(273)
VSL3** (10 ⁸ CFU) Bifidobactéries de VSL#3	CD*(8.10 ³ cellules) CD de lamina propria de colon (8.10 ³ cellules)	↗ IL-10 ↘ IL-12 et IFN-γ ↗ IL-10 +++	(274)
<i>L. reuteri</i> ASM 216 (10 ⁸ CFU) <i>L. casei</i> NIZOB255 (10 ⁸ CFU) <i>L. plantarum</i> NIZOB253 (10 ⁸ CFU)	CD* (5.10 ³ cellules)	Activation des Treg et ↗ IL-10 Via fixation sur DC-SIGN Pas d'effet	(275)
<i>L.rhamnosus</i> GG Ratio bactéries/ cellules : 5:1	CD* (2.5 10 ⁶ cellules)	Pas ↗ cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IL-6, IL-8, IL-12)	(276)

Tableau II : Effets de différentes espèces de probiotiques sur les cellules dendritiques.* : monocytes de sang périphériques ; ** :VSL# 3 est composé de *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ;CFU : colony forming unit ; HLA-DR : Human Leukocyte Antigen DR

Ces tests de culture de CD en présence de probiotiques montrent bien que leurs effets sont dépendants de l'espèce. Certaines espèces de lactobacilles favorisent la maturation des CD comme *L. gasseri* ATCC 19992, *L. reuteri* ATCC 23272, *L. johnsonii* ATCC 33200 (269), *L. casei* CHCC 3139 (271) et activent la réponse Th1. D'autres espèces augmentent plutôt les réponses Th2 et Treg comme *L. reuteri* (ASM 216), *L. casei* (NIZOB255) (275) et le mélange commercial de lactobacilles et bifidobactéries VSL#3 (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*) (273,274). Les bifidobactéries n'activent pas la réponse Th1. Celles présentes dans le mélange VSL#3 montrent des propriétés anti-inflammatoires en induisant une forte production d'IL-10 (274).

Ce tableau met bien en évidence un effet souche-dépendant. *L. rhamnosus* Lcr35 induit un phénotype semi-mature des CD et active la réponse Th1 (270) alors que *L. rhamnosus* GG induit la maturation complète des CD et une faible activation de la production de cytokines Th1 (272). De la même manière, *L. reuteri* ATCC 23272 active la réponse Th1 (269) alors que *L. reuteri* DSM12246 exerce un effet répresseur sur cette réponse (271). *L. casei* CHCC3139 est également capable d'activer la réponse Th1 (271) alors que *L. casei* NIZOB255 active la réponse Treg (275).

2. Interaction des cellules épithéliales intestinales avec la flore intestinale

Les cellules épithéliales intestinales (CEI), qui sont en contact permanent avec les bactéries intestinales, peuvent aussi intervenir dans le développement du système immunitaire. Elles n'expriment pas de façon permanente les différents TLR décrits plus hauts et joueraient par conséquent un rôle important dans les phénomènes de tolérance vis-à-vis des bactéries exogènes en n'activant pas de façon constante le NFκB. Elles pourraient même orienter le comportement des CD vers une augmentation des cellules Treg (277,278). Par contre, un stress infectieux favorise l'expression de certains TLR comme les TLR2 et TLR4 à leur surface. Dans cette situation, les CEI pourraient également influencer le comportement des CD. C'est ainsi que le surnageant de culture de cellules épithéliales inhibe la production d'IL-12 par les CD et donc leur capacité à induire une polarisation Th1 en présence de stimuli

microbiens (279,280). Par ailleurs, il a été montré que le microbiote situé à la surface apicale des cellules épithéliales favorise la production de Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), qui est une cytokine impliquée dans la maturation des Lc, et de TGF- β qui agissent en concert pour orienter la fonction des CD sous jacents vers un phénotype tolérogène (281).

3. Les acides gras à chaînes courtes et le développement du système immunitaire

Les AGCC produits par la flore intestinale pourraient également jouer un rôle dans le développement de la réponse immune.

a. Définition, origine et concentration des acides gras à chaînes courtes

Les principaux AGCC sont l'acétate (C2), le propionate (C3), le butyrate (C4) et le valérate (282). Ces AGCC résultent de la fermentation par la flore intestinale de composés alimentaires non digestibles comme le mucus et les polysaccharides dérivés des fibres alimentaires et de l'amidon. Ils sont produits essentiellement dans le colon et le caecum où l'activité de fermentation est la plus importante. En condition normale, 30 à 80 grammes de sucres et de fibres entrent dans le colon chaque jour et la production d'AGCC est de 300 à 800 mmol. Le colon en absorbe une grande partie et la concentration en AGCC dans les selles est d'environ 100 à 240 mM (283). Le ratio de la concentration des AGCC dans la lumière du colon est de 60% pour l'acétate, 25% pour le propionate et 15% pour le butyrate.

b. Propriétés des acides gras à chaînes courtes

La plupart des études sur le rôle des AGCC se sont focalisées sur le butyrate qui est l'AGCC le plus important. Il protège la muqueuse intestinale, mais a aussi des propriétés anticancéreuses et immunomodulatrices. Par contre, ses propriétés anti-inflammatoires ne sont pas encore clairement démontrées.

Le butyrate inhibe la polarisation des Lc Th1 (284,285). Ces résultats ont été démontrée à partir de Lc isolés des ganglions mésentériques de rats stimulés par la Concanavaleine A. Le propionate a les mêmes propriétés que le butyrate mais à de plus fortes

concentrations. Par ailleurs, ces 2 AGCC augmentent la production d'IL-10 et inhibent selon leur concentration la prolifération des Lc sanguins (286). Ce mécanisme pourrait être lié à leur action sur les mitochondries, qui sont le lieu d'oxydation des AGCC (287). Par contre, les effets spécifiques de l'acétate sont inconnus.

4. Principales propriétés des bifidobactéries et des lactobacilles

L'utilisation des bifidobactéries et des lactobacilles a triplé depuis 5 ans. Ils sont utilisés dans le traitement des diarrhées infectieuses, dans la prévention des diarrhées associées aux traitements antibiotiques et dans la prévention et le traitement des phénomènes allergiques. Mais ils seraient également capables de stimuler l'immunité et améliorer le pronostic des maladies inflammatoires du tube digestif et d'infections plus systémiques. Nous ne présenterons ici que leur rôle dans l'allergie et sur les infections extra-intestinales.

a. Action sur les allergies

Les différentes études montrant le rôle bénéfique des lactobacilles et des bifidobactéries dans les phénomènes allergiques sont résumées dans le **Tableau III**.

Probiotiques	Etudes ex vivo	Effets	Références
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103 (5.10⁹ CFU/ g) Durée : 2 fois / j / 4 semaines 	PBMC d'enfants allergiques au lait de vache et souffrant d'eczéma	<ul style="list-style-type: none"> ↗ IFN-γ, Pas ↗ IL-4 	(288)
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103 (5.10⁹ CFU/ g) +<i>L. Rhamnosus</i> LC705 (5.10⁹ CFU/g) +<i>B. breve</i> Bbi99 (2.10⁸ CFU/g) +<i>P. freudenreichii</i> (2.10⁹ CFU/ g) Durée : 2 fois / j / 4 semaines 	PBMC d'enfants allergiques au lait de vache 1.10 ⁶ cellules/ ml	<ul style="list-style-type: none"> ↗ IL-4 	(288)
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. plantarum</i> NCIMB8826 <i>L. lactis</i> MGI363 <i>L. casei</i> ATCC393 <i>L. rhamnosus</i> GG (10¹⁰ CFU/ ml) 	PBMC de patients allergiques aux acariens 2.10 ⁶ cellules/ ml	<ul style="list-style-type: none"> ↗ cytokines Th1 (IFN-γ), ↘ cytokines Th2 (IL-4, IL-5) Dépendant : <ul style="list-style-type: none"> . du ratio Lacto/PBMC . de la présence de CPA (monocytes) . IL-12 et IFN-γ produit par Lacto 	(289)
Lait fermenté contenant : <ul style="list-style-type: none"> <i>L. helveticus</i> NCC1643 (5.10⁷ CFU/ ml) <i>L. paracasei</i> ST11 NCC2461 (1.10⁷ CFU/ml) Durée : 4 semaines 	Cellules nasales (10 ⁶ cellules/ml) et sérum de patients souffrant de rhinite allergique au pollen	<ul style="list-style-type: none"> ↘ IL-5 ↘ IgG4 	(290)
Souche	Etudes Cliniques	Effets	Références
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103 (5.10⁹ CFU/g) Durée : 2 fois / j / 4 semaines 	Enfants souffrant d'eczéma et de dermatite atopique	<ul style="list-style-type: none"> ↘ symptômes 	(291)
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103 (5.10⁹ CFU/g) Durée : 2 fois / j / 4 semaines 	Enfants souffrant d'allergie alimentaire	<ul style="list-style-type: none"> ↗ de l'inflammation (E-selectine) ↗ IL-10 	(292)
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103 (2.10¹⁰ CFU) Durée : 2 fois / j / 4 semaines 	Enfants allergiques (dermatite atopique et allergique au lait de vache)	<ul style="list-style-type: none"> ↗ IL-10 dans le serum 	(293)
<ul style="list-style-type: none"> <i>B. Lactis</i> Bb-12 (10⁹ CFU/g) <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103 (10⁸ CFU/g) Durée : 8 semaines 	Enfants souffrant d'eczema	<ul style="list-style-type: none"> ↘ symptômes eczema, ↘ TGF-β 	(294)
Yaourt contenant : <ul style="list-style-type: none"> <i>B. animalis subsp lactis</i> LKM512 (5.10⁷ CFU/ g) 100g / j / pendant 4 semaines 	Patients atteints de dermatite atopique	<ul style="list-style-type: none"> ↗ IFN-γ dans le sérum Dépendant SCFA 	(295)
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. rhamnosus</i> HN001 (6.10⁹ CFU/g) <i>B. lactis</i> HN019 (9. 10⁹ CFU/g) Durée : 2 à 5 semaines avant l'accouchement + 6 mois post natal 	Mère à risque d'atopie	<ul style="list-style-type: none"> ↗ IFN-γ dans le sang de cordon ↗ TGF-β dans le lait maternel 	(296)
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103 (2.10¹⁰ CFU / j) Durée : 4 semaines avant l'accouchement et pendant l'allaitement 	Mère à risque d'atopie	<ul style="list-style-type: none"> ↘ incidence d'eczema atopique ↗ TGF-β dans le lait 	(297)
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103 (1.10¹⁰ CFU / j) Durée : 2-4 semaines avant l'accouchement + 6 mois post natal 	Mère à risque d'atopie	<ul style="list-style-type: none"> ↘ incidence d'eczema atopique 	(298)
<ul style="list-style-type: none"> <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103 (5 .10⁹ CFU/ 100 ml) 	Patients atteints de DA	<ul style="list-style-type: none"> Pas de ↘ des symptômes 	(299)

Tableau III : Effets des probiotiques dans les phénomènes allergiques : exemple de modèles ex vivo d'allergie et de différentes études cliniques. PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell*, cellules mononuclées de sang périphériques ; DA : dermatite atopique

Les probiotiques mis en présence de cellules mononuclées collectées du sang périphérique (PBMC) d'enfants allergiques (souffrants d'eczéma, de dermatite atopique et d'allergie alimentaire (288)) ont montré le rôle bénéfique des probiotiques dans la réduction de la réponse Th2 et l'augmentation de la réponse Th1. Ces effets sont également observés directement chez les enfants allergiques avec une augmentation de la réponse Th1 et des phénomènes inflammatoires (292), une diminution des symptômes allergiques associés à une augmentation du TGF- β (291,294) ou de l'IL-10 dans le sérum (292,293). Leur effet pourrait être bénéfique avant la naissance, puisque l'administration de probiotiques à des mères à risques d'atopie avant l'accouchement puis pendant l'allaitement augmente la concentration en IFN- γ dans le sang de cordon et de TGF- β dans le lait maternel (296,297) associée à une diminution des symptômes atopiques jusque l'âge de 2 ans (297,298).

Chez les adultes, différentes souches de lactobacilles mises en présence de PBMC de patients allergiques aux acariens augmentent la réponse Th1 et diminuent la réponse Th2, les résultats étant dépendant du ratio lactobacilles/ PBMC, de la présence de monocytes et de la production d'IL-12 et d'IFN- γ produit par les lactobacilles (289). En clinique, les probiotiques diminuent le risque d'eczéma atopique (295) en augmentant la réponse Th1 et de rhinite allergique au pollen en diminuant la réponse Th2 (290). Cependant, l'effet bénéfique des probiotiques n'est pas observé pour toutes les études cliniques sur les dermatites atopiques (299) et les allergies comme l'allergie au pollen (300). En effet, la supplémentation en probiotiques dans les dermatites atopiques chez l'enfant, montre des résultats contrastés (301,302). L'hétérogénéité des résultats semble dépendre des souches bactériennes utilisées, de la durée d'administration, de l'âge et des paramètres allergiques explorés.

b. Action des lactobacilles et bifidobactéries sur les infections extra-intestinales

Quelques études montrent que l'administration orale de lactobacilles et les bifidobactéries peuvent prévenir et réduire les infections extra-intestinales comme les infections respiratoires. Ces études sont regroupées dans le **Tableau IV**.

Probiotique	Modèle <i>in vivo</i>	Effets	Références
<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. casei</i> CRL431 (10⁹ CFU/ souris/ j) • 2 ou 5 jours 	Infection à <i>P. aeruginosa</i> (souris Swiss albino)	<ul style="list-style-type: none"> ↗ de la clairance bactérienne ↗ de la phagocytose de macrophages alvéolaires ↗ IgA 	(303)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. casei</i> CRL431 (10⁹ CFU/ souris/ j) • 5 jours (304) • 7, 14, 21 jours (305) 	Infection à <i>S. pneumoniae</i> (souris Swiss albino)	<ul style="list-style-type: none"> ↗ neutrophiles/ leucocytes dans le sang et le LBA ↗ activité des cellules phagocytaires ↗ cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL-1β) ↗ IgA anti-pneumocoques 	(304,305)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. rhamnosus</i> CRL1505 Lr05 (10⁸ CFU/ souris / jour) • 2, 5, 7 jours 	Infection à <i>S. pneumoniae</i> (souris Swiss albino)	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Th1 (IFN-γ) ↗ Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) ↗ activité des cellules phagocytaires ↗ IgA anti-pneumocoques 	(306)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. casei shirota</i> • Dans les croquettes, 4 semaines 	Infection intra-nasale au virus <i>influenzae</i>	<ul style="list-style-type: none"> ↘ charge virale dans lavage nasaux ↗ IFN-γ et TNF-α 	(307)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. breve</i> (YIT4064) • 0.05% 	Vaccination orale contre le virus <i>Influenza</i> + infection intra-nasale	<ul style="list-style-type: none"> ↗ survie ↗ IgG anti-influenza 	(308)
Probiotique	Etude clinique	Effets	Références
<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. rhamnosus</i> GG (5. 10⁵ CFU/ ml de lait) • 7 mois 	Enfants âgés de 1 à 6 ans en garderie	<ul style="list-style-type: none"> ↘ de l'incidence des infections respiratoires ↘ de la prise d'antibiotiques 	(309)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. rhamnosus</i> GG + <i>B. lactis</i> Bb-12 (10¹⁰ CFU / j) • Jusque l'âge de 1 an 	Enfants âgés de moins de 2 mois	<ul style="list-style-type: none"> ↘ de l'incidence des infections respiratoires ↘ otites 	(310)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. lactis</i> Bb-12 (10¹⁰ CFU / ml) • jusque l'âge de 8 mois 	Enfants âgées de 1 à 2 mois	<ul style="list-style-type: none"> ↘ de l'incidence des infections respiratoires 	(311)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. rhamnosus</i> GG 53103 (7.10⁹ CFU/ ml) + <i>B. sp</i> B420 (8.10⁹ CFU/ ml) • + <i>L. acidophilus</i> (3.10⁹ CFU/ ml) + <i>S. thermophilus</i> (2.7. 10¹⁰ CFU/ ml) • 3 semaines dans le lait 	Adultes	<ul style="list-style-type: none"> ↘ des infections nasales par : <i>S. aureus</i>, <i>S. pneumoniae</i>, <i>H. influenza</i>, <i>S. β hémolytique</i> 	(312)

Tableau IV : Effets des probiotiques dans les infections extra-intestinales, exemples d'études expérimentales *in vivo* et clinique

i. Données expérimentales

En 2001, Alvarez *et al.* ont montré que *L. casei* CRL 431 améliore la protection contre l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez la souris en augmentant la clairance bactérienne pulmonaire, l'activité phagocytaire des macrophages alvéolaires et la concentration en IgA dans le sérum et dans le LBA (303). La même équipe a montré dans un modèle murin de dénutrition, que *L. casei* CRL 431 améliore également la résistance à l'infection pulmonaire à *Streptococcus pneumoniae* (304,305). *Lactobacillus casei* CRL431 augmente le recrutement des neutrophiles dans le sang et le LBA, la production de cytokines inflammatoire (TNF- α , IL-6, IL-1 β), des anticorps de type IgA anti-pneumocoque, des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-10) dans le LBA et augmente l'activité des cellules phagocytaires. Salva *et al.* ont étudié l'effet des 2 souches de *L. rhamnosus* CRL1505 Lr05 et Lr06 sur la résistance à l'infection pulmonaire à *S. pneumoniae* chez la souris (306). L'étude a montré que seule la souche Lr05 augmente la résistance à l'infection, prévient la dissémination sanguine de *S. pneumoniae* et augmente significativement la réponse Th1 (IFN- γ) et Th2 (IL-4, IL-10) dans le LBA. Ils montrent que la résistance est associée à une augmentation du nombre et de l'activité des cellules phagocytaires et de la concentration en anticorps spécifiques du pathogène dans le sérum et le LBA. Hori *et al.* ont montré que *L. casei* Shirota protège contre l'infection intra-nasale par le virus *influenzae* en diminuant la concentration du virus dans les lavages nasaux associé à une augmentation locale et systémique de la production d'IFN- γ et de TNF- α par les Lc nasaux (307). Yasui *et al.* ont étudié l'effet de *B. breve* (YIT4064) dans la réponse anticorps après vaccination orale contre le virus *influenzae*, et ont testé l'effet protecteur contre l'infection intra-nasale par le virus. Ils ont montré que les souris vaccinées et nourries avec *B. breve* ont un taux de survie supérieur après l'infection par le virus *influenza* et une augmentation de la concentration en anticorps IgG anti-influenza dans le sérum (308).

ii. Données cliniques

Les données cliniques concernent essentiellement les infections oto-rhino-laryngologiques et respiratoires chez les enfants. Cette protection a été observée avec *L. rhamnosus* GG (309), seul ou associé *B. lactis* Bb-12 (310). En 2003, Gluck *et al.* ont montré qu'un mélange de probiotiques (*L. GG* (ATCC53103), *B. spB420*, *L. acidophilus* 145 et *Streptococcus thermophilus*) pendant 3 semaines diminue la colonisation nasale par *S. aureus*,

S. pneumoniae, *H. influenzae* et les streptocoques β hémolytiques (312).

En conclusion, les OS, en agissant directement sur les cellules immunitaires ou indirectement en stimulant la croissance de souches spécifiques de lactobacilles et bifidobactéries, pourraient influencer la réponse immune et augmenter la résistance aux infections extra-intestinales. C'est ce mécanisme que nous avons voulu développer dans le 2^{ème} objectif de la thèse.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

Certains composants nutritionnels sont capables de moduler la réaction inflammatoire et la réponse immune. Ils pourraient être efficaces dans la prévention et le traitement de certaines maladies infectieuses, en particulier dans l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose qui est caractérisée par une réponse inflammatoire excessive et dont la sévérité est associée à une réponse immune de type Th2. Deux composés nutritionnels sont particulièrement intéressants dans cette application : les acides gras polyinsaturés à longues chaînes de la série 3 ou (n-3) AGPI-LC pour leur propriétés anti-inflammatoires et certains prébiotiques pour leur action sur la réponse immune. Parmi ceux-ci, nous avons choisis les oligosaccharides acides dérivés de la pectine de *Citrus* ou pAOS. Ils correspondent, selon le concept décrit par Gibson et Roberfroid (313) en 1995, à « des composants alimentaires non digestibles qui peuvent affecter de façon bénéfique l'hôte en stimulant la croissance ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de souches bactériennes bénéfiques dans le côlon ». Les pAOS pourraient initier un balancement de la réponse Th2 vers Th1 en modulant la flore colique et améliorer par conséquent le pronostic de l'infection.

Dans les travaux précédents du laboratoire, nous avons démontré qu'une nutrition enrichie en (n-3) AGPI-LC induit une modulation de la composition en AGPI des phospholipides des membranes cellulaires, a un effet bénéfique sur la composition corporelle, et augmente la résistance à l'infection à *P. aeruginosa* dans un modèle de souris sauvages. Les bénéfices cliniques observés sont une diminution ou un retard de la mortalité chez les animaux infectés, une optimisation de la réponse épithéliale alvéolaire et une diminution de la lésion pulmonaire. Ils sont corrélés à une action directe des (n-3) AGPI-LC sur l'expression des mucines (*muc5B*) et une optimisation de la réponse pro- et anti-inflammatoire intervenant dans la réponse innée.

Notre thèse a 2 objectifs :

- étudier l'effet des (n-3) AGPI-LC (EPA/DHA), dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa* chez les souris *cfr*^{-/-} males et femelles ;
- étudier l'impact d'une supplémentation orale en pAOS dans un modèle d'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* chez 2 autres espèces de souris, les souris BALB/c ayant un profil immunitaire de type Th2 et les C57BL/6 connues pour avoir un profil immunitaire de type Th1.

L'objectif à terme de ces travaux est d'analyser le bénéfice d'une supplémentation orale par ces facteurs nutritionnels pour prévenir et/ou augmenter la résistance des patients atteints de mucoviscidose et présentant une infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa*.

RESULTATS

I. Impact du régime enrichi en EDA+DHA dans la résistance à l'infection pulmonaire des souris $cftr^{-/-}$ mâles et femelles

Cette étude a fait l'objet d'une publication en Avril 2011 dans *The Journal of Nutrition* (vol 141(6) : 1101-1107). L'article est ajouté à la page suivante.

(n-3) Long-Chain PUFA Differentially Affect Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Infection of Male and Female $cftr^{-/-}$ Mice

Hélène Tiesset^{4,8}, **Henry Bernard**^{4,8}, Nana Bartke⁵, Christopher Beermann⁶, Elisabeth Flachaire⁷, Jean-Luc Desseyn⁴, Frédéric Gottrand⁴, and Marie-Odile Husson⁴

4 Inserm U995, IFR 114, University Lille Nord de France, Lille 59045, France.

5 Danone Research, Centre for Specialised Nutrition, Milk Research and Functional Innovations, Friedrichsdorf D-61276, Germany.

6 University of Applied Science Fulda, Department of Food Technology, Fulda D-36039, Germany.

7 CERM, Hôpital Renée Sabran, Giens, Hyères, CHRU Lyon 83406, France.

8 **co-auteurs**

II. Impact des pAOS dans l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* chez les souris BALB/c

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article (introduction, matériels et méthodes, résultats) qui sera complété et soumis pour publication dès que nous aurons terminé notre travail sur l'étude de la flore intestinale.

Les références citées dans cet article sont incluses dans les références globales de la thèse.

La discussion des résultats de cet article est incluse dans la discussion de la thèse

Pectin derived acidic oligosaccharides improve the outcome of *Pseudomonas aeruginosa* chronic pulmonary infection in BALB/c mice by polarizing M1 and Th1 response

H. Bernard¹, F Gottrand¹, N. Bartke², B. Stahl², M.O. Husson¹

¹Unité Inserm 995, IFR 114, Faculté de médecine, Université Lille Nord de France, Lille, France.

²Danone Research - Centre for Specialised Nutrition, Milk Research & Functional Innovations, Friedrichsdorf, Germany

Introduction

Pseudomonas aeruginosa, a commensal Gram-negative bacteria commonly found in waterborne environments, is the major cause of chronic and often fatal broncho-pulmonary infection in patients with cystic fibrosis (CF). It aggravates pulmonary inflammation and injury that begin early in life and leads to respiratory failure. Despite cellular and humoral immune response against *P. aeruginosa* leading to pulmonary accumulation of neutrophils, macrophages, T and B lymphocytes, CF patients are unable to clear *P. aeruginosa*.

T-helper (Th) cell response is divided into 2 main subtypes based on their cytokine profiles designated Th1 (IFN- γ , IL-2) and Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) (314). Cytokines from one phenotype regulate those of the other, while both are regulated by T regulatory cells (T-Reg) that TGF- β (87). Besides, IL-10 production by Thelpers and Treg cells serves as a negative regulatory mechanism for limiting the immune responses (42). Exposure of macrophages to either IFN- γ or IL-4 and IL-13 induces two distinct phenotypes defined as classical or alternatively activated macrophages respectively and called M1 and M2 mirroring Th1 and Th2 nomenclature (315). Classical macrophage activation is characterized by the production of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) leading to the elimination of bacteria by high production of toxic intermediates [ie nitric oxide (NO), and reactive oxygen intermediates (ROI)] via activation of the enzyme iNO synthetase (encoded by *nos2* gene) (316). Alternatively macrophages activation is characterized by a limited production of NO and ROI and an up regulation of arginase (encoded by *arg1* gene) that leads to the production of ornithin and collagen (317). This pathway is involved in the regulation of inflammation and in tissue remodelling and repair.

In CF patients, the function of T cells and the activation of macrophages are modified once their airways are colonised by *P. aeruginosa* (318). The T cell modulation is in part attributed to the production of N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (HSL) by *P. aeruginosa* that is able to inhibit T-cell proliferation (319,320), and induce a Th2 immune response by stimulating the secretion of IL-4 and IL-13 (97). Alternative macrophage activation seems also to predominate in CF patient (321). The role of alternative macrophage activation during the disease course remains to be determined, but severe *P. aeruginosa* infection in CF patients is associated to a Th2 response while Th1 predominant is associated with a better pulmonary outcome (148,149). These results were reproduced in mouse models where Th2-reacting mice like BALB/c have a worse outcome with an enhanced bacterial colonisation and exacerbated lung inflammation than Th1-reacting mice like C3H/HeN

(112,322-324). Taking together these observations suggest that modifying the Th1/Th2 balance toward a predominant Th1 response might be beneficial for CF patients.

Several studies have recently described the immune functions of dietary substrates as galacto-, fructo-oligosaccharides (scGOS/lcFOS) and pectin derived acidic oligosaccharides (pAOS) that are able to combat intestinal (325,326) or prevent respiratory infections (327,328). Their immune properties are mainly attributed to their prebiotic properties, increasing immunogenic bacteria such as bifidobacteria and lactobacilli (329,330) and production of short chain fatty acid (SCFA) in the intestinal tract (331). This usually leads to Th1 polarisation of the immune response (332-334), production of anti-inflammatory cytokine IL-10 (335) and in some studies reduction of pro inflammatory cytokines production (336).

Therefore our hypothesis was that pAOS should shift the Th1/Th2 balance toward a predominant Th1 response and should be beneficial on *P. aeruginosa* pulmonary infection. The aim of this study was to evaluate the influence of an oral administration for 5 weeks of acidic oligosaccharides extracted from pectin of *Citrus* (pAOS) in a mouse model of *P. aeruginosa* chronic pulmonary infection with BALB/c mice. The effect of this regimen on Th1 and M1 polarization was studied in the lung and spleen during the first 4 days of infection. In addition, survival rate of animals, pulmonary bacterial clearance, inflammatory response were studied. Resistance to a new *P. aeruginosa* infection was also analyzed by re-infecting surviving mice 2 weeks after the first infection and by measuring bacterial load.

The influence of this regimen on the intestinal flora and SCFA to explain the modulation of the immune system was also explored (no data obtained for now).

Material and methods

Animals and diets. Males BALB/c mice (5-wk-old) purchased from Harlan Laboratories (Gannat, France) were randomized in 2 groups to be fed during 5 weeks either by a control diet or a diet enriched in pAOS 5% (Danone Research, Germany). The diets were adapted from the AIN-93 (American Institute of Nutrition) rodent diet (337). The 2 diets were isocaloric and isolipidic, containing 5% of pAOS in pAOS diet and 5% of cellulose in the control diet. Mice were maintained in specific pathogen free conditions with a 12h light-dark cycle. All experiments were in accordance with the French Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Guidelines of the European Union. All procedures study was approved by the local Laboratory Animal Facility Executive Committee.

Lung infection. *P. aeruginosa* (PAO1 strain) was grown at 37°C in a rotating, shaking water bath in a tryptic soy broth (Biomérieux Laboratories, France) for 14h. The inoculum was calibrated at 1×10^9 colony-forming units (CFU) /ml by spectroscopy. *P. aeruginosa* was then entrapped in agar beads as previously described (338). Mice were anesthetized by sevoflurane inhalation (Abbott, UK) and placed in dorsal recumbency. Endotracheal insertion of a 24-G animal feeding needle was used to instillate 50 μ l of the agarose beads (5×10^5 CFU/mouse). Survival animals were re-infected following the same protocol 2 weeks after the initial infection. Control groups were constituted with mice receiving one of the 2 diets which were inoculated with sterile beads where the bacterial suspension was substituted by 0.9% saline solution.

Quantitative bacteriology. The lungs were excised aseptically from day 1 to day 4 after the inoculation and were then homogenized in 1 ml of saline buffer. Serial dilutions of the samples were plated on BCP agar plates (Biomérieux Laboratories, France) and were incubated at 37°C. *P. aeruginosa* colonies counting were performed after at least 24 h of incubation. Lungs homogenized samples were also frozen at -80°C for further analysis.

Bronchoalveolar lavage. Bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were collected by cannulating the trachea and washing the lungs three times with 0.5 mL of 0.9% saline solution. After centrifugation (10 min, 1000g), the supernatant was collected, filtered and immediately frozen at -80°C. Total cell numbers were then counted in the resuspended cell

pellets and cellular morphology differentiation was obtained by counting 200 cells/sample from cytopsin slide preparation stained with Wright–Giemsa coloration.

Cytokine assays. Levels of keratinocyte-derived chemokine (KC), tumor necrosis factor α (TNF- α) and IL-10 were quantified in the filtered BALF using ELISA kits (R&D Systems Lille, France and CliniSciences, Montrouge, France). Levels of IL-4, and IFN- γ were measured in the lung homogenized samples using an ELISA kit (CliniSciences, Montrouge, France).

RNA isolation and real time quantitative RT-PCR assay. Total RNA from frozen lung and spleen was extracted using kit Invitrap Spin Tissue RNA (Eurobio, Courtaboeuf France). Reverse transcription was performed using the Thermoscript™ reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Cergy Pontoise France) according to the manufacturer’s protocol. cDNA samples were stored at -20°C. Real time PCR assays were performed using the ABI PRISM 7000 sequence detection system with SYBR green (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) as fluorescent intercalant. Primers used for genes expression analysis are summarized in table 1. PCR reactions were carried out in duplicate and were normalized against the expression of β -actin gene as endogenous control. Data are expressed as fold changes in expression of infected mice at day 1, 2, 3 and 4 compared to non-infected mice by using the formula : $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Target gene	Primer orientation	Primers sequences	Primers Length	Tm	GC%	Product length
<i>gata3</i>	Forward	AAGGCTGTCGGCAGAAAGGA	20	58.63	60.00	98
	Reverse	AGACCGGGTCCCCATTAGCGT	21	59.36	61.90	
<i>t-bet</i>	Forward	GCAAGGACGGCGAATGTTCCCA	22	59.99	59.09	142
	Reverse	TCCACACTGCACCCACTTGCC	21	59.51	61.90	
<i>arg1</i>	Forward	GTGGAGACCACAGTCTGGCAGT	22	58.18	59.09	146
	Reverse	GGACACAGGTTGCCCATGCAGA	22	59.34	59.09	
<i>nos2</i>	Forward	TTGGAGGCCTGTGTGCAGCCCT	22	60.05	59.09	110
	Reverse	AAGGCAGCGGGCACATGCAA	20	60.18	60.00	
β -actin	Forward	GCCACCAGTTCGCCATGGAT	20	57.31	60.00	106
	Reverse	AATACAGCCCAGGGGAGCATCG	21	58.71	61.90	

Table 1 : primers sequences used for the gene expression study

Statistical analysis. The results are expressed as median. The cumulative survival rates of mice fed the control diet were compared with those of mice fed pAOS diet using Pearson’s chi-square test. The Mann-Whitney U test was used to compare nonparametric unpaired data between pAOS and control diet groups, and to compare each day within diet group. P <0.05 was considered significant.

Results

pAOS do not influence survival

Animals died between the 2nd and 4th day after endotracheal instillation of *P. aeruginosa* (Fig 1). The percentage of surviving mice was 42% and 51% for mice fed control and pAOS diet respectively. This difference was not statistically significant (Fig 1).

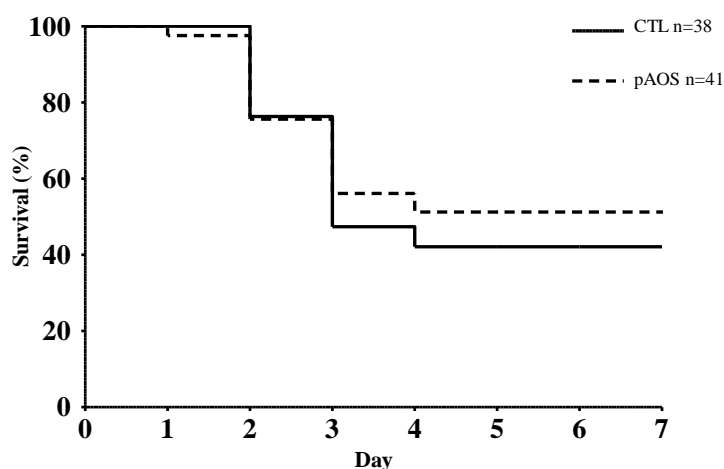


Fig 1 : Survival of mice infected with *P. aeruginosa* fed either control (CTL) or pAOS diet. n indicate number of mice in each groups.

pAOS improve the bacterial clearance

Bacterial cultures of *P. aeruginosa* isolation and numeration in the two groups of mice were performed during the first 4 days of infection (Fig 2).

All mice fed control diet remained infected during the first 3 days while the bacterial culture of the lungs became negative for 3, 2 and 2 mice at the 2nd, 3rd and 4th day respectively in mice fed pAOS. Besides, the median bacterial load was significantly lower in animals fed pAOS than in animals fed control diet at these days. Both results indicated that pAOS improved pulmonary bacterial clearance.

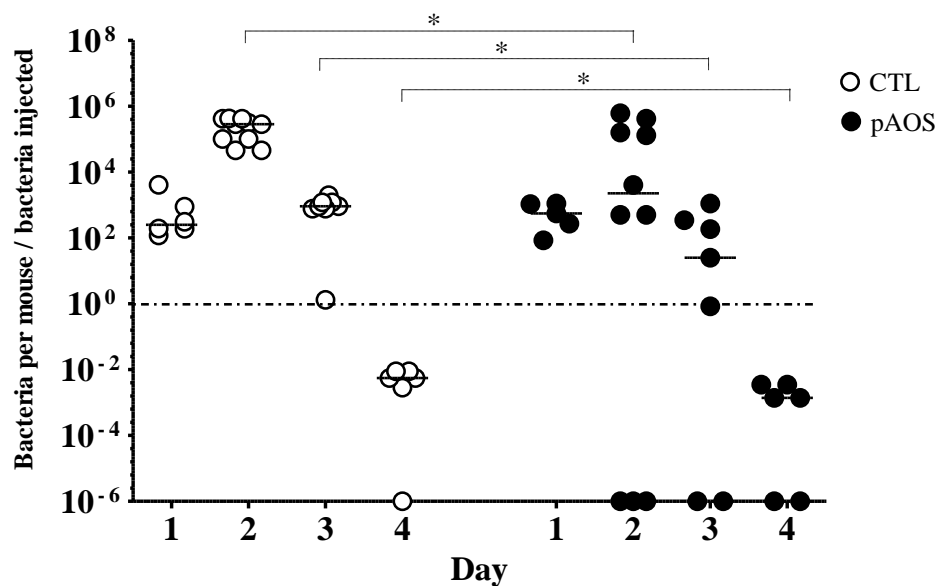


Fig 2 : Bacterial load in lungs of mice fed either control (CTL) or pAOS diet. Lung bacterial load was assessed as the ratio between the number of bacteria recovered in each mouse and the number of bacteria injected. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. * $p < 0.05$.

pAOS sustain the recruitment of neutrophils and increase that of macrophages in BALF

Number of neutrophils and macrophages recovered for mice instilled with sterile beads was significantly lower than in mice infected with *P. aeruginosa*, with no difference between the diets (data not shown).

During infection, the number of neutrophils decreased significantly from the 1st day in control diet group mice while it remained high in mice fed pAOS. The number of neutrophils was significantly lower at the 1st day and significantly higher at the 2nd and 3rd day in mice fed pAOS compared to mice fed control diet (Fig 3).

The number of macrophages was significantly higher in mice fed pAOS than in mice fed control diet for the first 3 days of infection (Fig 4).

These results indicate that pAOS sustain the recruitment of neutrophils and increase that of macrophages in BALF until the 3rd day.

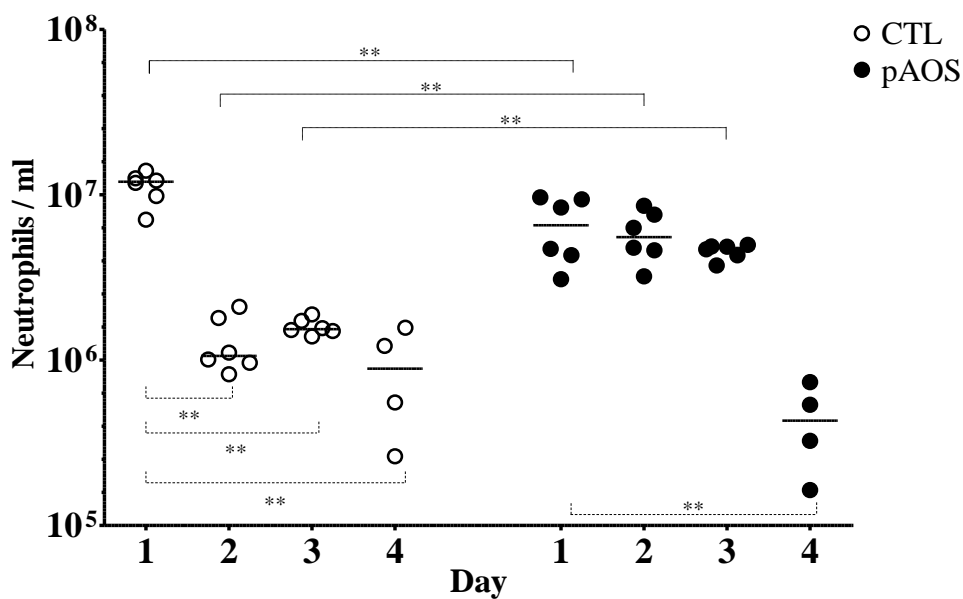


Fig 3 : Number of neutrophils in the bronchoalveolar lavage of mice infected by *P. aeruginosa* beads fed either control (CTL) or pAOS diet. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. *p<0.05 ; **p<0.01.

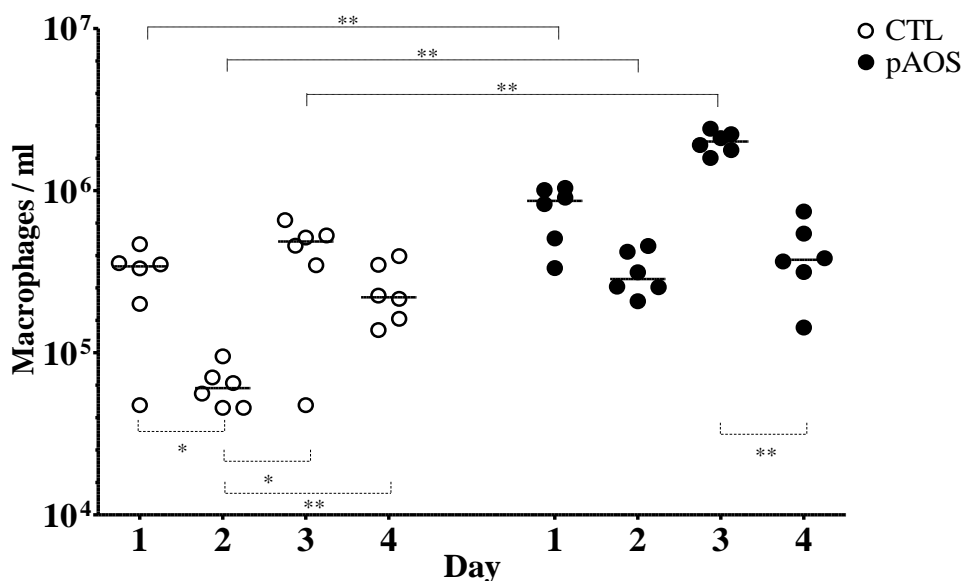


Fig 4 : Number of macrophages in the bronchoalveolar lavage of mice infected by *P. aeruginosa* beads fed either control (CTL) or pAOS diet. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. *p<0.05 ; **p<0.01.

pAOS decrease the release of TNF- α but increase those of KC and IL-10 in BALF

In parallel to the study of neutrophils and macrophages efflux in the BALF, KC, TNF- α and IL-10 were measured in mice instilled with sterile or *P. aeruginosa* agar beads. The level of the three cytokines measured in the mice instilled with sterile agar beads was significantly lower than measured in infected mice and did not vary according to diets (data not shown).

In *P. aeruginosa* infected mice, the KC level decreased significantly during the course of infection for mice fed the control diet but increased significantly during the first 2 days of infection for mice fed pAOS. The KC level was also significantly higher in mice fed pAOS than in mice fed control diet the 2nd day of infection (Fig 5).

The TNF- α level was similar in the two groups of mice for the first 2 days. It was lower in the 3rd and the 4th day in mice fed pAOS compared to mice fed control diet. Besides, the TNF- α decreased also more significantly between the 3rd and the 4th day in mice fed pAOS (Fig 5).

The level of IL-10 increased for the first 2 days of infection in mice fed control diet while it increased between the 2nd and 3rd day of infection in mice fed pAOS. Whatever the groups, IL-10 level remained low during the course of infection except at day 3 where it increased significantly for mice fed pAOS (Fig 5).

These results show that pAOS increase or delay the release of KC for the first 2 days, decrease the release of pro-inflammatory cytokine TNF- α the 3rd and the 4th day and increase that of the anti-inflammatory cytokine IL-10 at the 3rd day.

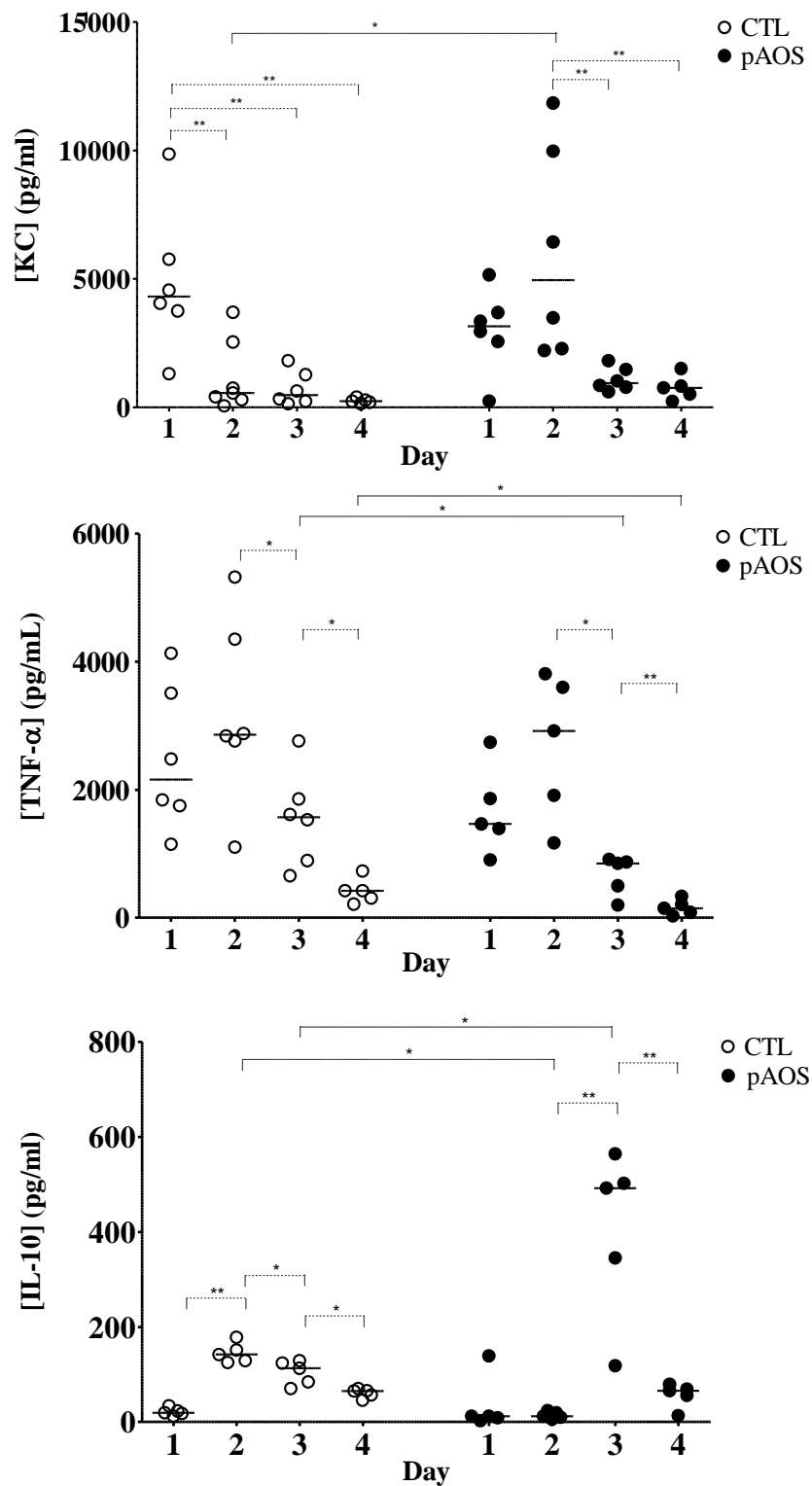


Fig 5 : Levels of KC, TNF- α and IL-10 in the bronchoalveolar lavage of mice infected by *P. aeruginosa* fed either control (CTL) or pAOS diet. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

pAOS promote Th1 polarization

Effect of pAOS on Th1 polarization was assessed through the dosage of INF- γ (Th1) and IL-4 (Th2) in lung (Fig 6) and the expression of *t-bet* (Th1) and *gata3* (Th2) genes in lung and spleen (Fig 7 and Fig 8).

While the IFN- γ level decreased from the 3rd day and that of IL-4 remained stable during the course of infection in mice fed control diet, the level of IFN- γ increased and that of IL-4 decreased the 2nd day in mice fed pAOS diet. The level of IFN- γ was also higher the first 2 day in pAOS mice compared to mice fed control diet. The high level of IL-4 in the BALF of mice fed pAOS the 3rd was very surprising, but it might be due to the interference of *P. aeruginosa* on the Th2 response (94,99,101,102). Besides this level was significantly lower the 4th day in mice fed pAOS compared to mice fed control diet. These results led to a significant increased of the ratio IFN- γ /IL-4 in mice fed pAOS compared to mice fed control diet the 2nd and the 4th day (Fig 6).

The mRNA level of *t-bet* increased in the lungs of mice fed control diet during the first 3 days of infection and not in mice fed pAOS, but it was significantly higher in mice fed pAOS than in mice fed control diet the 1st and the 2nd day. The mRNA level of *gata3* increased between the 1st and the 2nd day in the 2 groups of mice and was significantly higher the 2nd and the 3rd day in mice fed pAOS compared to mice fed control diet. These variations did induce any significant difference in the ratio *t-bet* / *gata3* between the 2 groups (Fig 7).

Results were slightly different in the spleen where the mRNA level of *t-bet* remained stable in mice fed control diet while it was higher at day 3 in mice fed pAOS. The mRNA level of *gata3* decreased significantly in the 2 groups of mice with a more pronounced effect in pAOS group for the first 2 days. These results led to an increase of the ratio *t-bet/gata3* in the 2 groups with a higher ratio in pAOS mice (Fig 8).

These results, by showing a significant increase of the ratio IFN- γ /IL-4 in the lungs and of the ratio *t-bet/gata3* in the spleen of mice fed pAOS diet, indicate that pAOS promote a Th1 polarization. The absence of any significant difference in the ratio *t-bet/gata3* in the lungs between the 2 groups suggest an interference of *P. aeruginosa* (cf discussion).

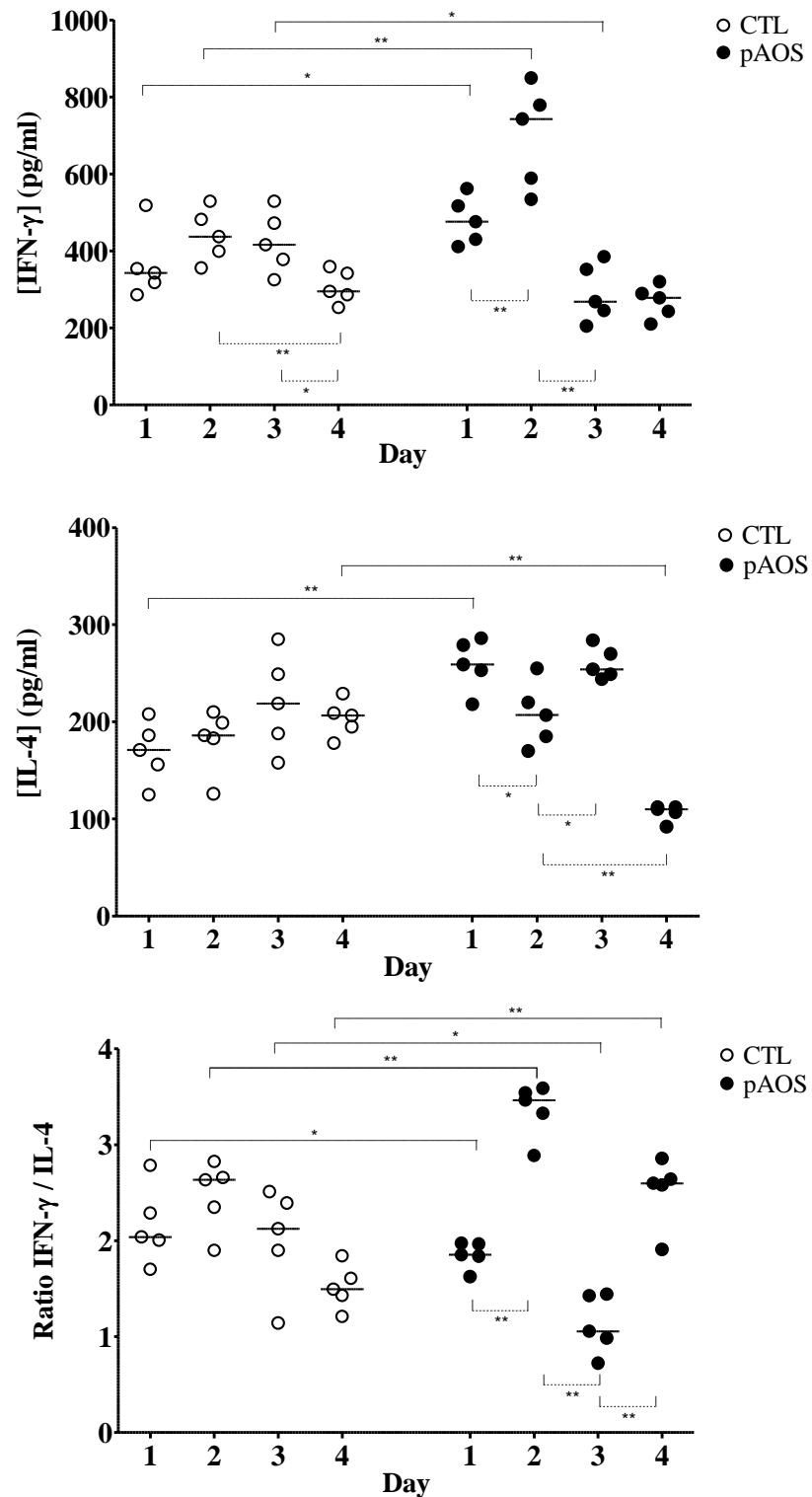


Fig 6 : Levels of IFN- γ /IL-4 and ratio IFN- γ /IL-4 in the lungs of mice infected by *P. aeruginosa* fed either control (CTL) or pAOS diet. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. *p<0.05 ; **p<0.01.

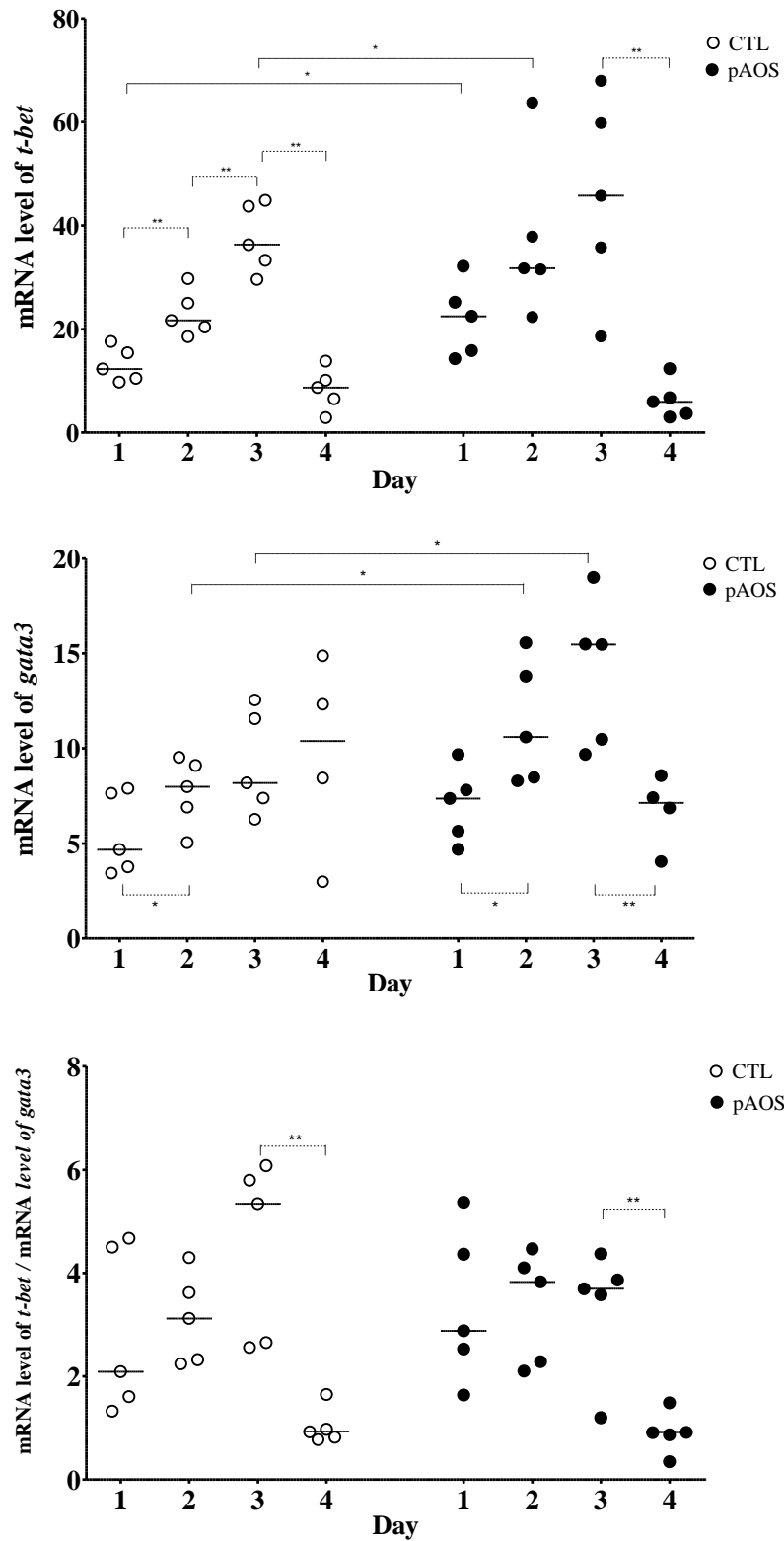


Fig 7 : mRNA levels of *t-bet*, *gata3* genes and their ratio in the lung of mice fed either control (CTL) or pAOS diet. Data are expressed in fold changes in mRNA levels of infected versus non-infected mice. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

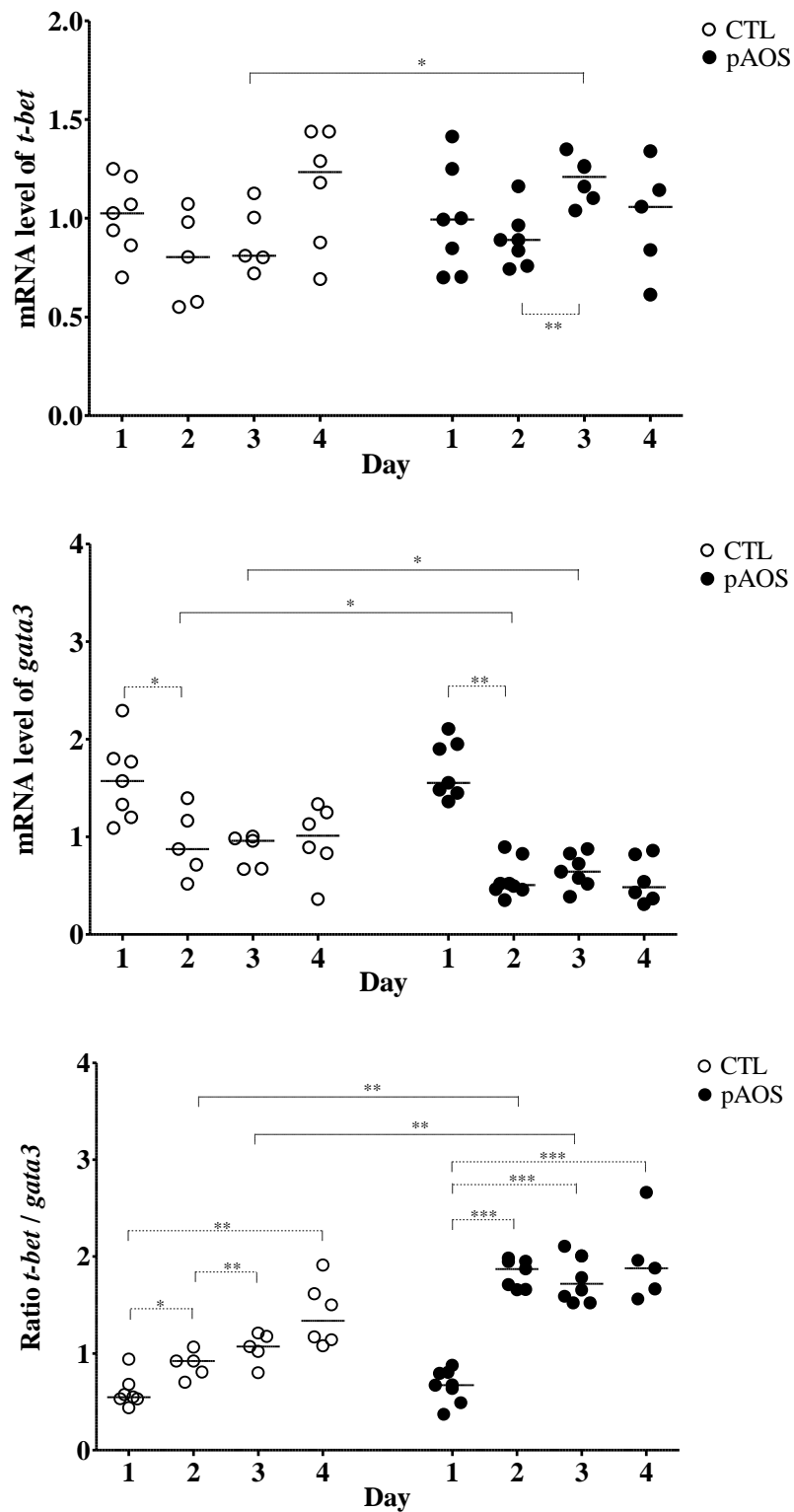


Fig 8 : mRNA levels of *t-bet*, *gata3* genes and their ratio in the spleen of mice fed either control (CTL) or pAOS diet. Data are expressed in fold changes in mRNA levels of infected versus non-infected mice. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

pAOS promote M1 activation

The activation of macrophages M1 and M2 by pAOS was assessed through the expression of *nos2* and *arg1* genes in the lung and in the spleen (Fig 9 and Fig 10).

In the lung, the mRNA level of *nos2* increased until the 3rd day in mice fed control and pAOS diet, while that of *arg1* increased only in the control mice. Besides the level of *arg1* trend to be lower in the lungs of mice fed pAOS compared to mice fed control diet. The ratio *nos2/arg1* remained stable in control mice while it increased between the 1st and the 2nd day in pAOS mice. This increase suggested M1 activation (Fig 9).

The mRNA levels of *nos2* and *arg1* measured in the spleen were different from those in the infected lungs. The mRNA level of *nos2* decreased in mice fed control diet while it increased in mice fed pAOS diet between the 1st and 2nd day. The mRNA levels of *arg1* decreased in the 2 groups, and this decrease trend to be less significant in pAOS group. The ratio *nos2/arg1* which decreased in mice fed control diet between the 1st and the 2nd day indicated M2 activation while the increase of this ratio in mice fed pAOS indicated a M1 activation. Besides, this ratio was significantly higher in mice fed pAOS diet than in mice fed control diet (Fig 10).

These results, by showing an increase of the ratio *nos2/arg1* in the lungs and in the spleen, indicate that pAOS promote M1 activation.

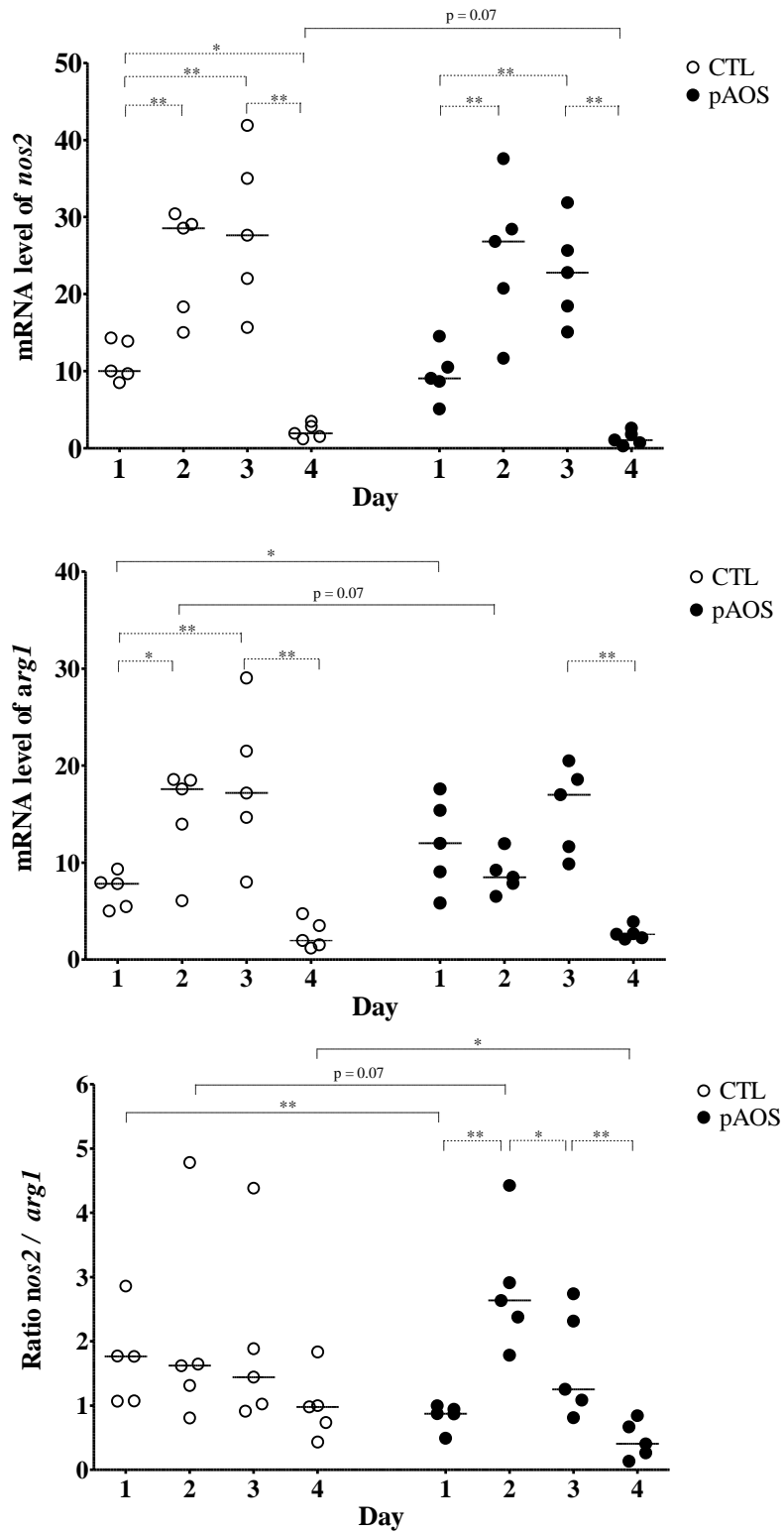


Fig 9 : mRNA levels of *nos2*, *arg1* genes and their ratio in the lung of mice fed either control (CTL) or pAOS diet. Data are expressed in fold changes in mRNA levels of infected versus non-infected mice. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. *p<0.05 ; **p<0.01.

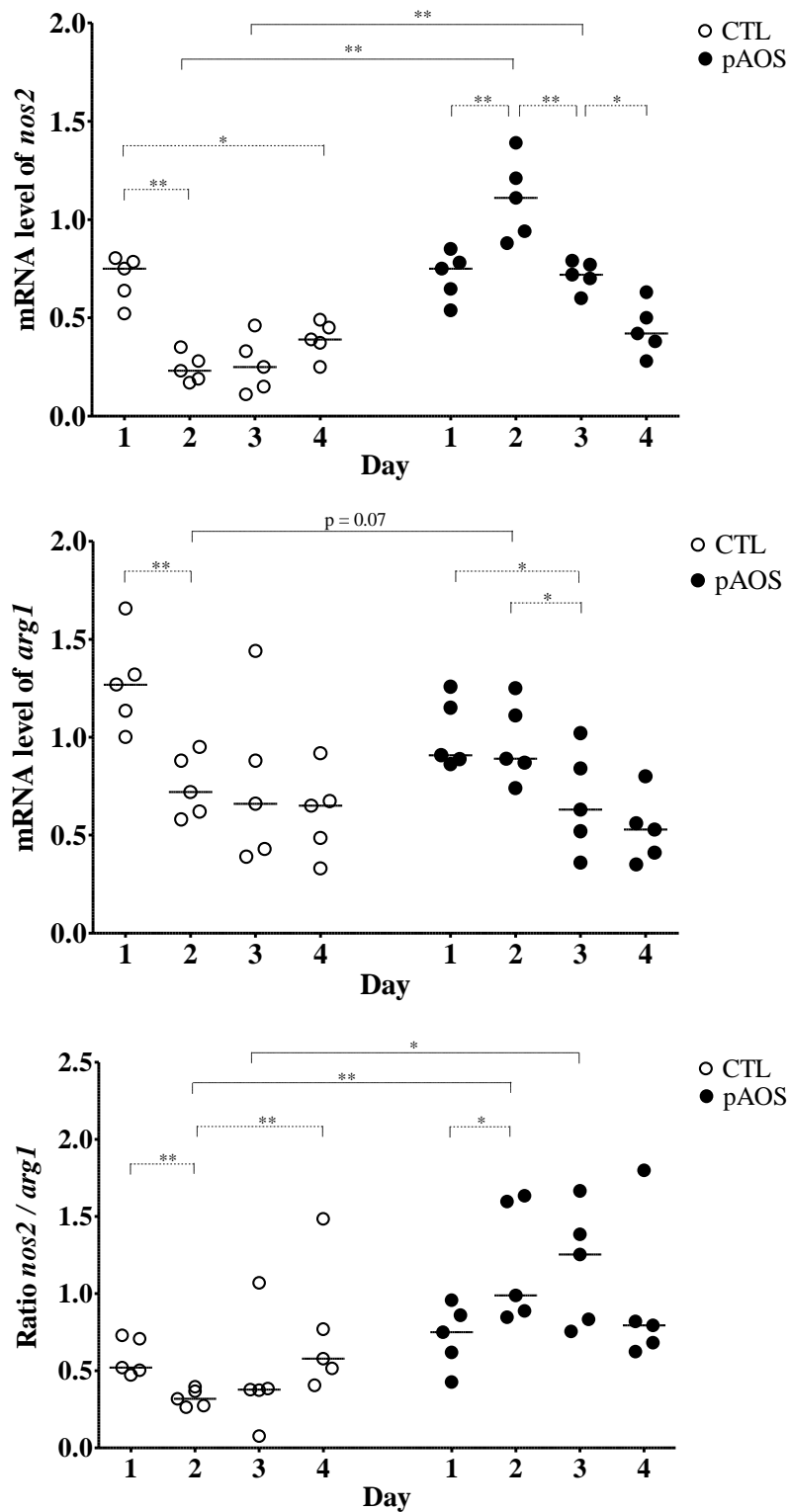


Fig 10 : mRNA levels of *nos2*, *arg1* genes and their ratio in the spleen of mice fed either control (CTL) or pAOS diet. Data are expressed in fold changes in mRNA levels of infected versus non-infected mice. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. *p<0.05 ; **p<0.01.

pAOS improve the bacterial clearance in re-infected mice

Mice that survived after the first infection were re-infected 2 weeks later following the same protocol. No re-infected mice died in the two groups. All bacterial culture for *P. aeruginosa* were positive during the re-infection, but remained 1900 to 450000 lower the 2nd and 50000 to 900000 lower the 3rd day of re-infection compared to the first infection in control and pAOS diet groups respectively. In addition, bacterial load was significantly lower in mice fed pAOS compared to mice fed control diet during the first two days of re-infection (Fig 11).

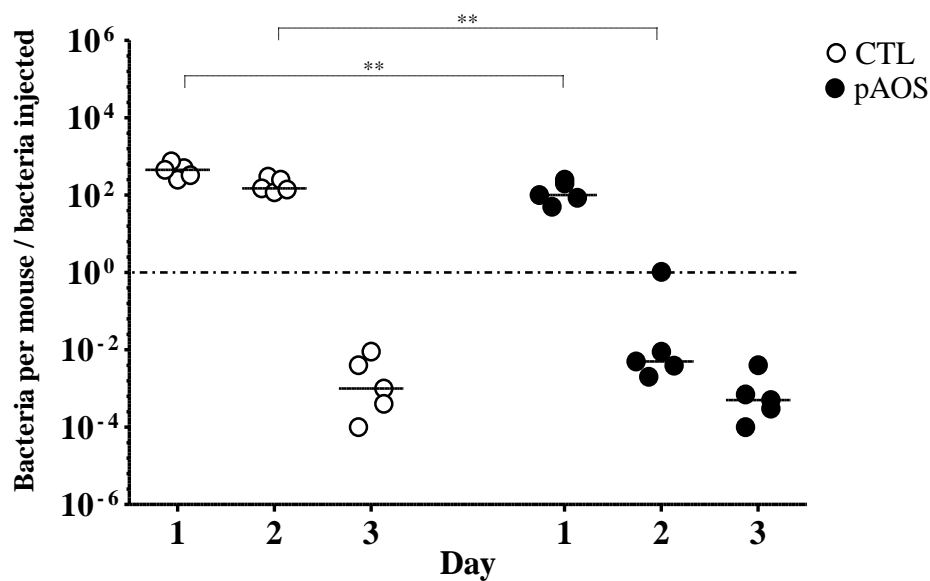


Fig 11 : Bacterial load in lungs of reinfected mice fed either control (CTL) or pAOS diet. Lung bacterial load was assessed as the ratio between the number of bacteria recovered in each mouse and the number of bacteria injected. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. **p<0.01.

These results show that pAOS improve the outcome of re-infected mice.

III. Impact des pAOS dans l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* chez les souris C57BL/6

Prebiotics oligosaccharides (scGOS/lcFOS, pAOS) have been demonstrated to modulate the Th2 immune response toward a Th1 response in mice model of allergy and asthma (207) and to improve the Th1 response in mice model of vaccination (215,216). We have previously demonstrated in BALB/c, having a Th2 immune response profile, that pAOS are able to switch a Th2 to Th1 immune response during a chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. This switch was associated with a better resistance against the infection and a decrease of the bacterial load in lungs. Moreover, pAOS sustained neutrophils and macrophages recruitment and delayed the pro- and anti-inflammatory cytokines production. Since several years we used C57BL/6 mice in the laboratory (339,340). Because these mice have a Th1 immune response profile, the aim of this study was to evaluate the effect of pAOS in these mice, particularly their ability to improve the Th1 response in our model of chronic pulmonary infection with *P. aeruginosa*. Material and methods used in this study were the same for the study of pAOS in BALB/c (results part II). In this part, we will describe only results obtained with C57BL/6 mice.

Results

pAOS improve survival

Mice fed control diet died between day 1 and day 4, while mice fed pAOS diet died between day 2 and day 4. The percentage of surviving mice was 41% and 58% for mice fed control and pAOS diet respectively. This difference was statistically significant (Fig 1).

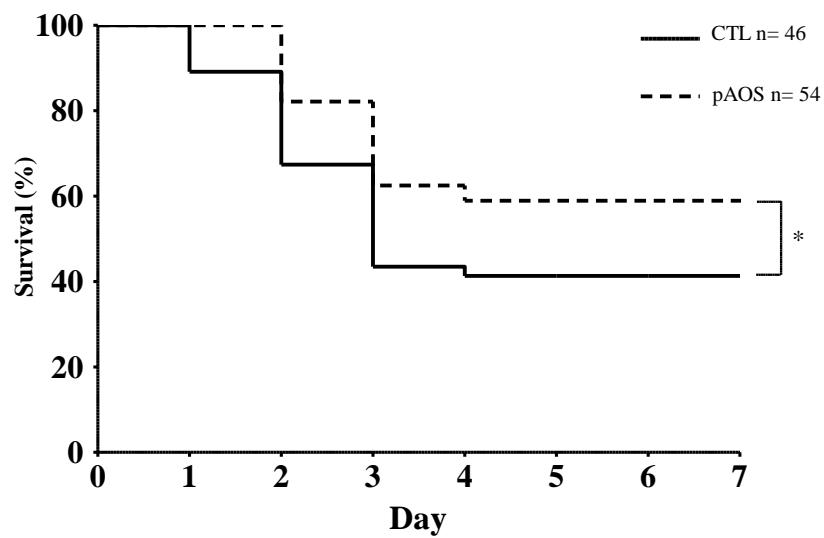


Fig 1 : Survival of mice infected with *P. aeruginosa* fed either control (CTL) or pAOS diet. n indicate number of mice in each groups. *p<0.05.

pAOS do not improve the bacterial clearance

Bacterial cultures of *P. aeruginosa* isolation and numeration in the two groups of mice were performed during the first 4 days of infection (Fig 2).

All mice fed control diet remained infected during the first 3 days while the bacterial culture of the lungs became negative for 2, 3, and 4 mice fed pAOS at the 1st, 2nd, and 3rd day respectively. Besides, although not significant, the bacterial load trend to be lower the 2nd day in mice fed pAOS than in mice fed control diet.

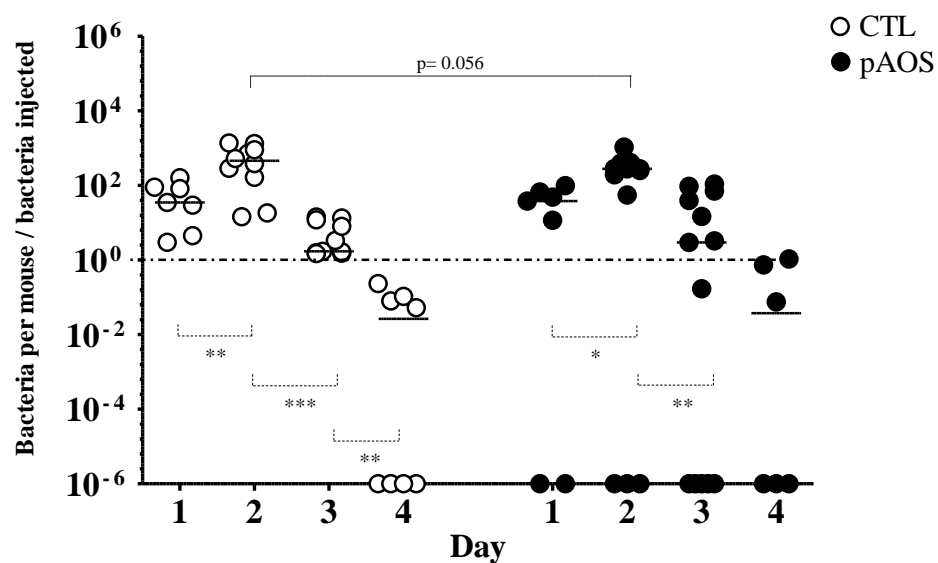


Fig 2 : Bacterial load in lungs of mice fed either control (CTL) or pAOS diet. Lung bacterial load was assessed as the ratio between the number of bacteria recovered in each mouse and the number of bacteria injected. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0,001.

pAOS sustain the recruitment of neutrophils and increase that of macrophages in BALF

Number of neutrophils and macrophages recovered for mice instilled with sterile beads was significantly lower than in mice infected with *P. aeruginosa*, with no difference between the diets (data not shown).

During infection, the number of neutrophils decreased significantly from the 1st day in mice fed control while it remained stable in mice fed pAOS. The number of neutrophils trend to be lower at the 1st day and was significantly higher the 2nd and 3rd day in mice fed pAOS

compared to mice fed control diet (Fig 3).

The number of macrophages remained stable until the 3rd for mice fed control diet while it increased significantly for mice fed pAOS. The number of macrophages was also significantly higher the 3rd day for mice fed pAOS than for mice fed control diet (Fig 4).

These results indicate that pAOS sustain neutrophils recruitment and increase that of macrophages in BALF until the 3rd day.

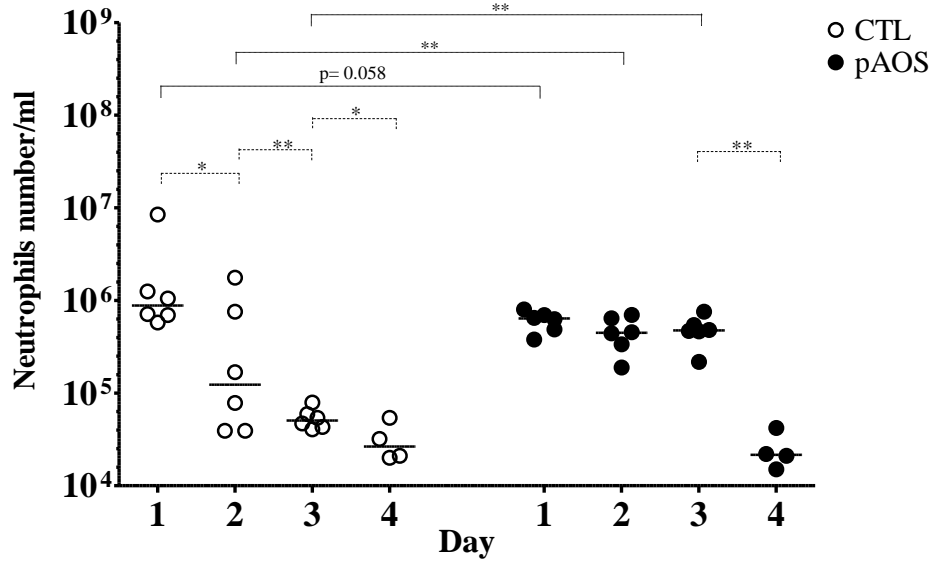


Fig 3 : Number of neutrophils in the bronchoalveolar lavage of mice infected by *P. aeruginosa* fed either control (CTL) or pAOS diet. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

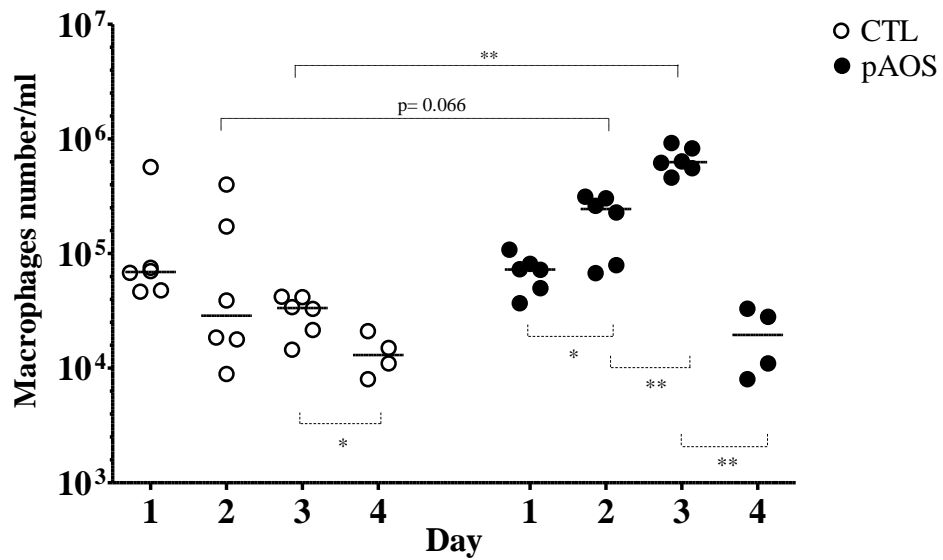


Fig 4 : Number of macrophages in the bronchoalveolar lavage of mice infected by *P. aeruginosa* fed either control (CTL) or pAOS diet. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

pAOS increase the release of KC and TNF- α and sustained that of IL-10 in BALF

In parallel to the study of neutrophils and macrophages efflux in the BALF, KC, TNF- α and IL-10 were measured in mice instilled with sterile or *P. aeruginosa* agar beads. The level of the three cytokines measured in the mice instilled with sterile agar beads was significantly lower than measured in infected mice and did not vary according to diets (data not shown).

The KC level decreased in the 2 groups of mice during the course of infection but the KC release was higher in mice fed pAOS than mice fed control diet during the first 3 days (Fig 5).

Similar results were observed for the TNF- α release between the 2 groups of mice (Fig 5).

The IL-10 release was higher the 2nd of infection in the control group while it remained stable during the first 3 days in mice fed pAOS. Besides, the IL-10 level was higher the 1st and the 3rd day for mice fed pAOS diet than in mice fed control diet (Fig 5).

These results show that pAOS increase the release of KC and TNF- α and sustain that of IL-10.

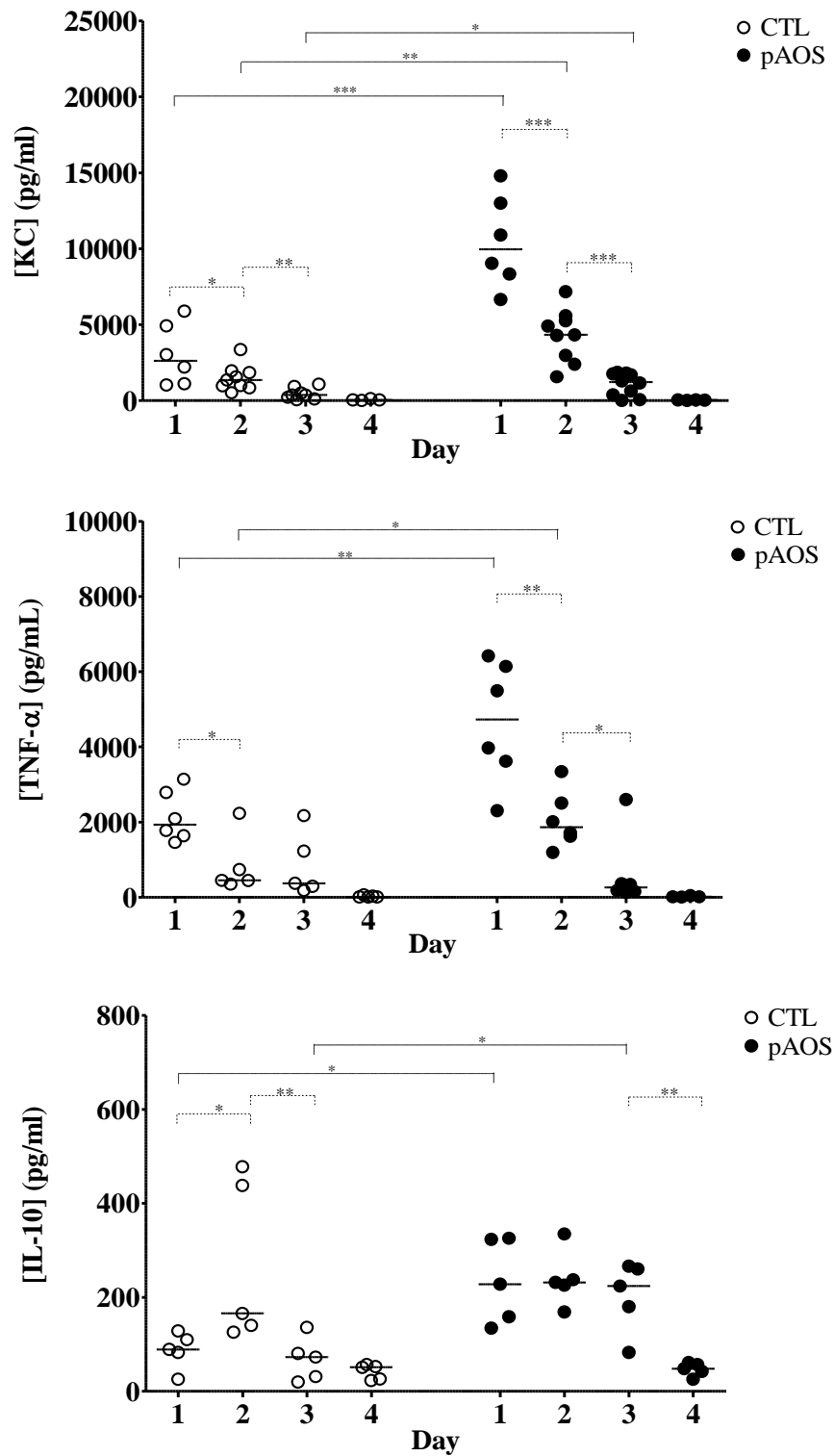


Fig 5 : Levels of KC, TNF- α and IL-10 in the bronchoalveolar lavage of mice infected by *P. aeruginosa* fed either control (CTL) or pAOS diet. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

pAOS decrease the Th1 polarization

Effect of pAOS on Th1 polarization was assessed through the dosage of IFN- γ (Th1) and IL-4 (Th2) in lung (Fig 6) and the expression of *t-bet* (Th1) and *gata3* (Th2) genes in lung (Fig 7). We could not study the effect of pAOS on these 2 genes in the spleen, their expression being too low to be assessed.

The kinetic of IFN- γ and IL-4 production was similar for the 2 groups of mice but IFN- γ and IL-4 levels were lower in mice fed pAOS than in mice fed control diet during the first 2 days of infection. Although, the ratio IFN- γ / IL-4 increased between the 1st and the 2nd day in the 2 groups of mice it remain lower in mice fed pAOS than in mice fed control diet (Fig 6).

The mRNA level of *t-bet* remained stable during the infection in the lungs of mice fed either control or pAOS diet. The mRNA level of *gata3* remained stable for mice fed control diet while it decreased between the 1st and the 4th day for mice fed pAOS diet. Besides, the mRNA level of *gata3* was significantly higher in mice fed pAOS than mice fed control diet the 1st day of infection. Thus the ratio *t-bet* / *gata3* increased significantly between day 1 and day 4 for mice fed pAOS while it remained stable for mice fed control diet. Besides, this ratio was higher for mice fed pAOS compared to mice fed control diet at the 4th day (Fig 7).

These results, by showing a very lower ratio IFN- γ / IL-4 in the lungs of mice fed pAOS at the 2nd day, indicate that pAOS decrease the Th1 polarization.

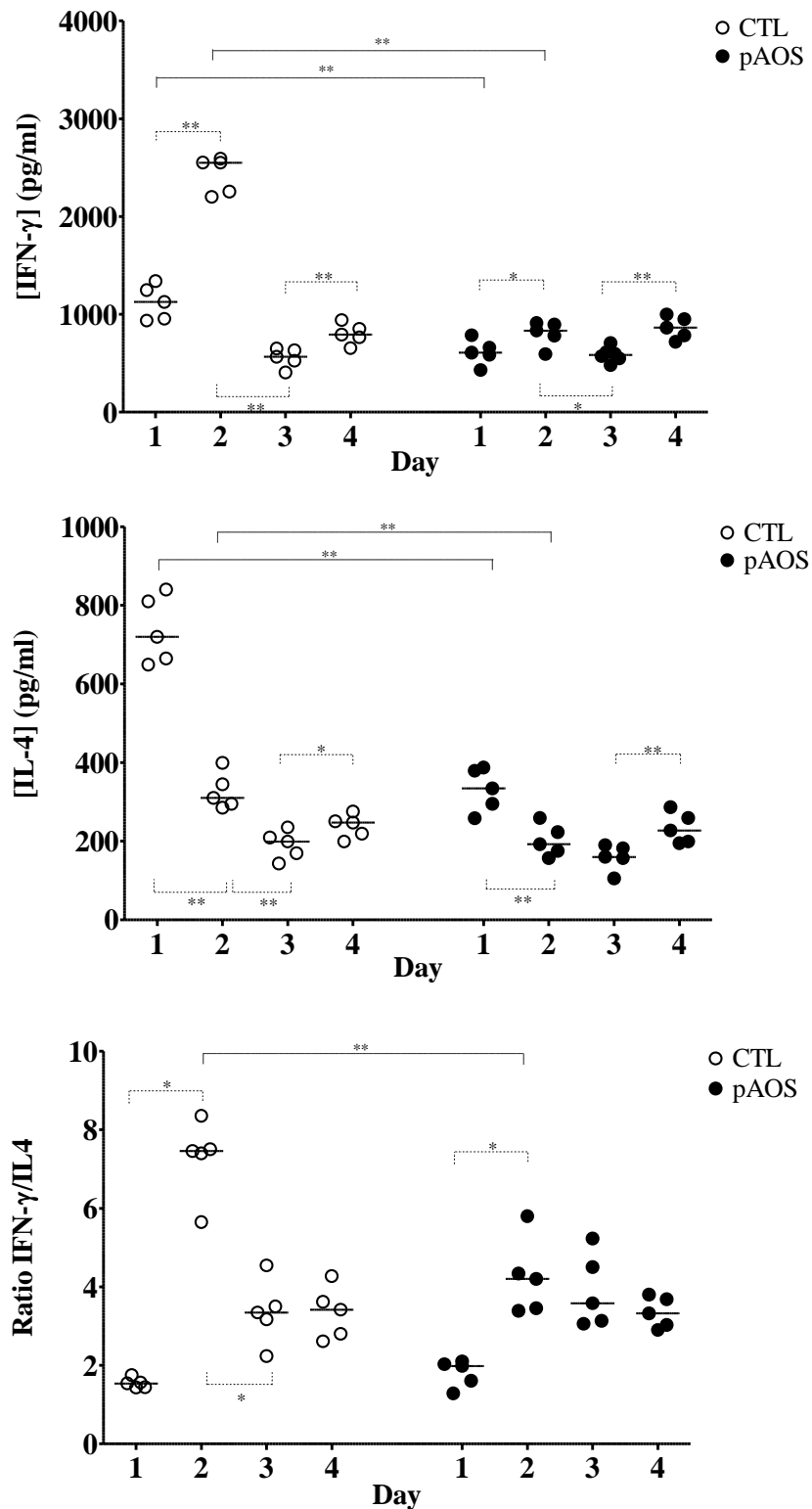


Fig 6 : Levels of IFN- γ /IL-4 and ratio IFN- γ /IL-4 in the lungs of mice infected by *P. aeruginosa* fed either control (CTL) or pAOS diet. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. *p<0.05 ; **p<0.01.

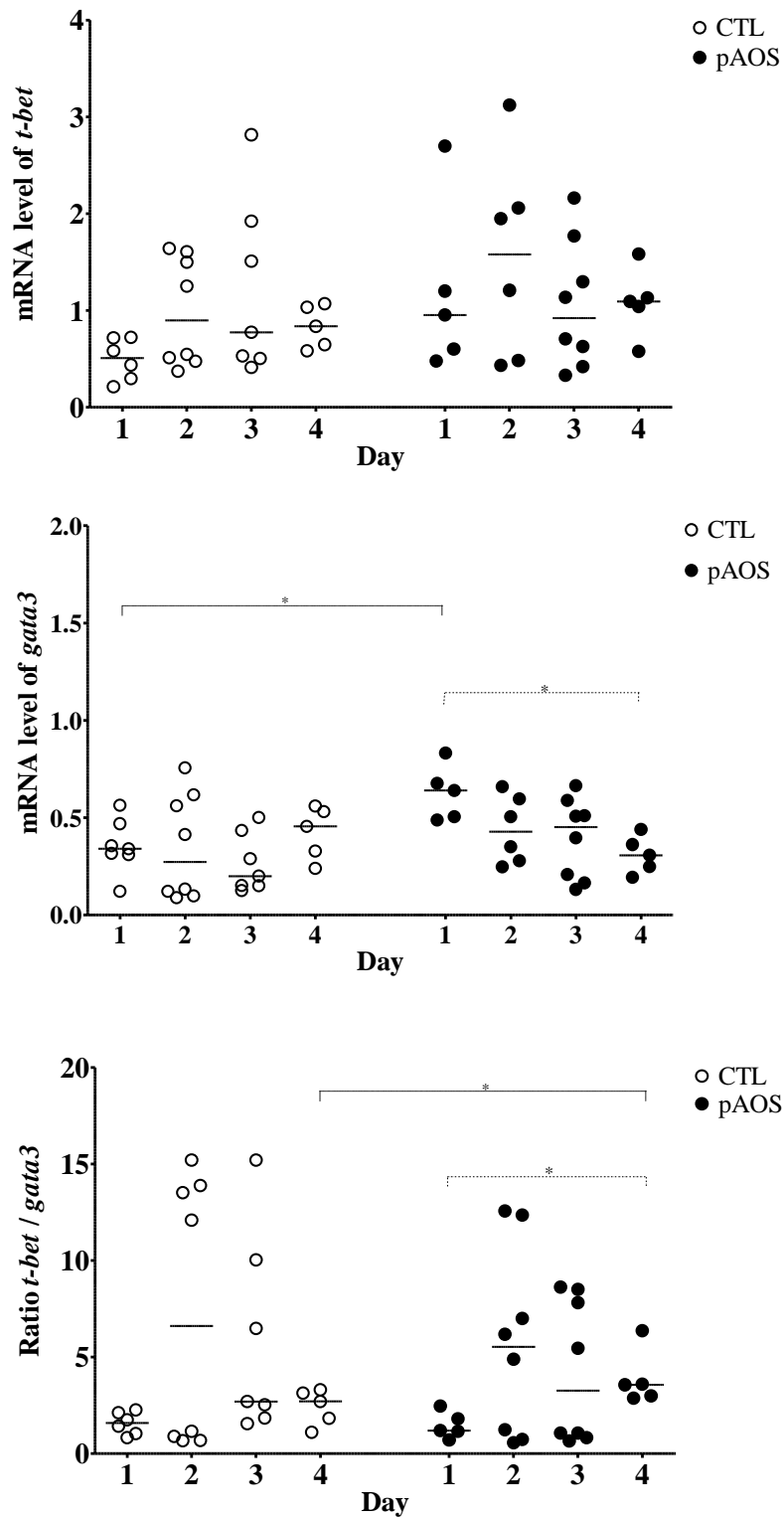


Fig 7 : mRNA levels of *t-bet*, *gata3* genes and their ratio in the lungs of mice fed either control (CTL) or pAOS diet. Data are expressed in fold changes in mRNA levels of infected versus non-infected mice. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. * $p < 0.05$.

pAOS decrease the early M1 activation

The activation of macrophages M1 and M2 by pAOS was assessed through the expression of *nos2* and *arg1* genes in the lung (Fig 8). We could not study the effect of pAOS on these 2 genes in the spleen, their expression being too low.

In the lung, the mRNA level of *nos2* decreased significantly for mice fed control diet, while it remained stable between the 1st and the 2nd day for mice fed pAOS diet. In this later group, the mRNA level of *nos2* decreased the 3rd and the 4th. The mRNA level of *nos2* was also lower the 1st and the 4th day for mice fed pAOS. The mRNA level of *arg1* remained stable in mice fed control diet and increased in mice fed pAOS between the 1st and the 2nd day (Fig 19).

The mRNA level of *arg1* was also higher in mice fed pAOS than mice fed control diet at the 1st and the 2nd day. Thus the ratio *nos2* / *arg1* decreased from day1 to day 3 for mice fed control diet while it remained stable in mice fed pAOS diet. Besides, this ratio was significantly lower in mice fed pAOS at the 1st day compared to mice fed control diet (Fig 19).

These results, by showing a lower ratio *nos2* / *arg1* in the lungs of mice fed pAOS the 1st day, indicate that pAOS decrease the early activation of macrophages M1.

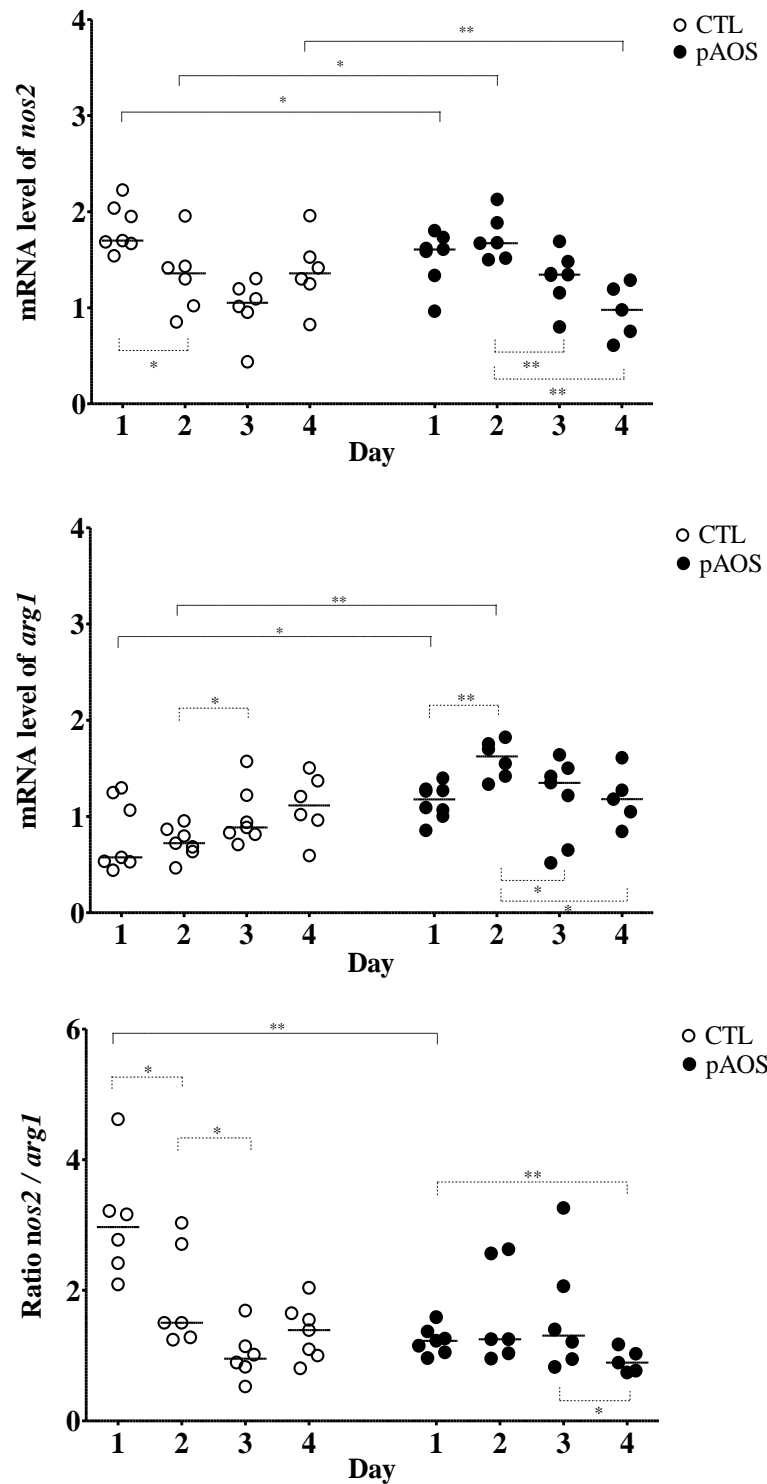


Fig 8 : mRNA levels of *nos2*, *arg1* genes and their ratio in the lungs of mice fed either control (CTL) or pAOS diet. Data are expressed in fold changes in mRNA levels of infected versus non-infected mice. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

pAOS improve the bacterial clearance in re-infected mice

Mice that survived after the first infection were re-infected 2 weeks later following the same protocol. No re-infected mice died in the two groups. All bacterial culture for *P. aeruginosa* were positive during the infection, but remained 50 to 3500 fold lower the 2nd and the 3rd day of re-infection compared to the first infection in control and pAOS diet groups respectively. In addition, bacterial load was significantly lower in mice fed pAOS compared to mice fed control diet at the 3rd day post re-infection (Fig 9).

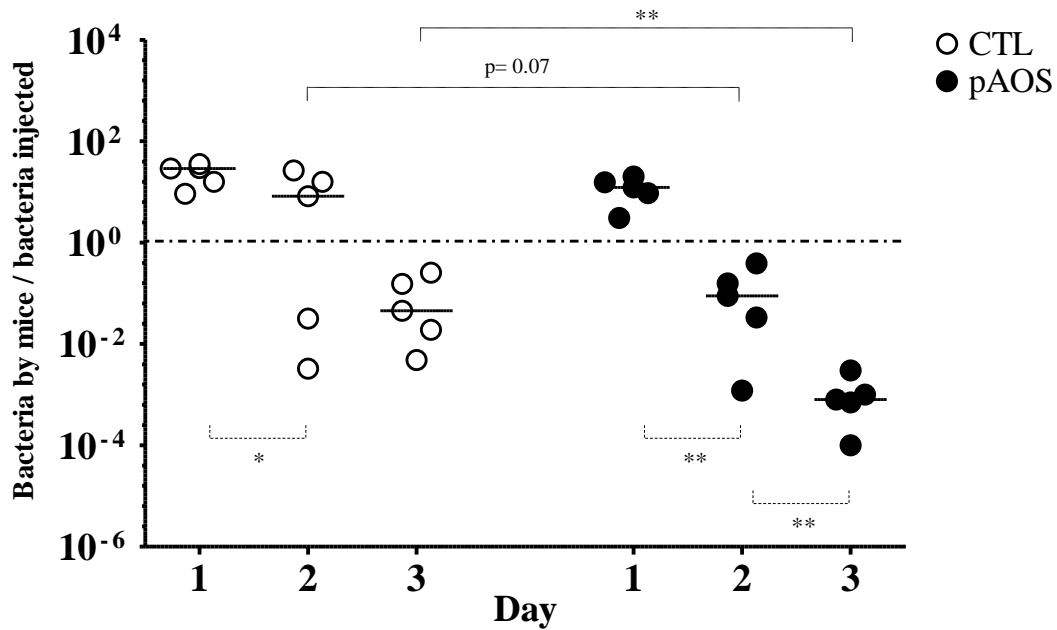


Fig 9 : Bacterial load in lungs of reinfected mice fed either control (CTL) or pAOS diet. Lung bacterial load was assessed as the ratio between the number of bacteria recovered in each mouse and the number of bacteria injected. Open circle represents one mouse fed control diet, black circle represents one mouse fed pAOS diet, and bar represents median value. **p<0.01.

These results show that pAOS improve the outcome of re-infected mice.

ANALYSE DES RESULTATS ET DISCUSSION

La thématique développée depuis plusieurs années dans notre équipe porte sur l'étude de l'amélioration de la résistance de l'hôte à une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* par des composés nutritionnels. Les applications humaines potentielles concernent 2 situations : les BPCO et surtout la mucoviscidose où les infections respiratoires à *P. aeruginosa* sont fréquentes et péjoratives pour la fonction respiratoire.

Les travaux précédents ont démontré qu'un régime enrichi en EPA et DHA administré pendant 5 semaines à des souris C57BL/6 soumises à une infection pulmonaire chronique ou aiguë à *P. aeruginosa* modulait la composition en acides gras des phospholipides membranaires, modifiait l'expression des mucines (341), augmentait la résistance à l'infection en diminuant la mortalité et améliorait la fonction respiratoire (339,340). Cette résistance était associée à une optimisation de la réponse inflammatoire avec une diminution des marqueurs de l'inflammation et une augmentation de la réponse anti-inflammatoire.

Le premier objectif de notre travail a été d'étudier le bénéfice clinique des n-3 AGPI-LC dans un modèle de souris *cftr*^{-/-} au cours d'une infection par *P. aeruginosa*. Il s'est appuyé sur des résultats préliminaires démontrant que les souris *cftr*^{-/-} étaient plus sensibles à l'infection que les souris sauvages et que les souris *cftr*^{-/-} femelles semblaient plus sensibles à l'infection que les mâles (Thèse H. Tiesset, 2008). Le deuxième objectif a été d'étudier l'efficacité d'un prébiotique susceptible également d'augmenter la résistance à l'infection. Nous avons choisi les oligosaccharides acides dérivés de la pectine de *Citrus* ou pAOS et testés l'hypothèse qu'ils pourraient contre balancer la réponse immune Th2 associée à un mauvais pronostic dans l'infection à *P. aeruginosa* de la mucoviscidose vers une réponse Th1 plus bénéfique, et avoir aussi des propriétés anti-inflammatoires. Nous avons étudié les pAOS dans des modèles murins connues pour développer une réponse Th2 comme les BALB/c et une réponse Th1 prédominante comme les C57BL/6.

I. Impact du régime enrichi en EPA+DHA dans la résistance à l'infection pulmonaire des souris *cftr*^{-/-} mâles et femelles

Les souris *cftr*^{-/-} femelles étant plus sensibles à l'infection que leurs partenaires mâles, les bénéfices de cette alimentation ont été analysés selon le genre des souris. L'impact du régime enrichi en EPA/DHA administré pendant 6 semaines dans la résistance à l'infection

des souris *cftr*^{-/-} mâles et femelles a été évalué en :

- mesurant la concentration initiale des acides gras et de leurs dérivés dans les membranes cellulaires des poumons et du foie et la modification de ces concentrations par le régime ;
- mesurant de la prise de poids avant l'infection ;
- étudiant la résistance à l'infection à *P. aeruginosa*.

A. Concentration initiale des acides gras et de leurs dérivés dans les membranes cellulaires des poumons et du foie et modification de ces concentrations par le régime

Nos résultats montrent qu'en absence de tout régime, le taux d'acide arachidonique (AA) et de ses dérivés est plus important dans les poumons des souris *cftr*^{-/-} mâles (2 souris) et femelles (4 souris) que chez les souris sauvages. Bien que le nombre de souris étudiées soit faible, ce taux apparaît similaires à ceux retrouvés par Freedman et coll (342-344) qui décrivent des concentrations d'AA anormalement élevées chez les souris *cftr*^{-/-} ou chez les sujets atteints de mucoviscidose. Ces altérations entraînent une synthèse accrue d'eicosanoïdes à activité pro-inflammatoire comme les PG et les LT et par conséquent une diminution de la synthèse des métabolites des (n-3) AGPI-LC à activité anti-inflammatoire comme les lipoxines (343,345). Cependant, selon Dombrowsky *et al.* (346), la composition en (n-3) et (n-6) AGPI-LC dépendrait du modèle de souris. D'ailleurs, l'augmentation de la concentration d'AA que nous avons observée au niveau du poumon est associée à une augmentation en EPA et DHA et le ratio (n-6) / (n-3) n'était pas statistiquement différent entre les souris *cftr*^{-/-} et les souris sauvages. Nous devons noter cependant que cette analyse a été effectuée chez des souris âgées de 10 semaines. Il serait intéressant de refaire cette comparaison chez des souris plus âgées, les anomalies physiologiques entre les souris CF et les souris sauvages apparaissent le plus souvent au-delà du 3^{ème} mois (347).

Nos résultats montrent aussi que la concentration en EPA/DHA dans les phospholipides des membranes cellulaires du foie est significativement plus élevée chez les femelles que chez les mâles. Ceci a déjà été rapporté dans la littérature et impliquerait le rôle des estrogènes dans le métabolisme des acides gras *via* une intervention directe des PPAR

(348-350). Mais cette influence du sexe dans le métabolisme des acides gras chez les patients atteints de mucoviscidose reste controversée. Pour certains (351), le sexe intervient dans ce métabolisme alors que pour d'autres il n'existe aucune différence (352). Dans notre étude, nous notons que si ces différences sont visibles au niveau du foie, elles n'existent pas au niveau du poumon. Par conséquent elles ne semblent pas jouer un rôle essentiel dans la différence de sensibilité à l'infection pulmonaire des souris *cftr*^{-/-}.

Nos résultats montrent également que le régime alimentaire administré pendant 6 semaines modifie le ratio (n-6) / (n-3) des souris *cftr*^{-/-} mâles et femelles. Cette modification du ratio témoigne de la bonne absorption intestinale de l'EPA et du DHA et de leur incorporation au niveau des membranes cellulaires chez les souris *cftr*^{-/-}.

B. Mesure de la prise de poids avant l'infection

Nos résultats montrent que l'alimentation enrichie en EPA/DHA augmente la prise de poids chez les souris mâles et pas chez les souris femelles. Ce résultat très surprenant pourrait s'expliquer par l'apparition de la puberté des souris femelles vers 6 à 7 semaines durant les 9 semaines de la période d'étude. La production d'œstrogènes fragilisant les femelles, nous pensons qu'il aurait été judicieux de prolonger la période d'observation bien au-delà de la puberté pour juger un éventuel effet bénéfique de notre alimentation sur ce paramètre. Cette observation pourrait illustrer les interférences entre le métabolisme des acides gras, les œstrogènes et les PPARs. Nous pouvons également conclure que l'augmentation de la résistance observée chez les souris femelles (cf paragraphe suivant), n'est pas liée à une amélioration de leur statut nutritionnel, mais qu'elle indique une relation directe de l'EPA/DHA dans les mécanismes de défense de l'hôte.

C. Influence du régime EPA/DHA sur la résistance à l'infection

Rappel des résultats précédents : au cours d'une première étude, Hélène TIESSET (thèse soutenue en 2008) a démontré que les souris *cftr*^{-/-} femelles sont plus fragiles et plus

sensibles à l'infection pulmonaire que les compagnons mâles : elles grossissent moins bien et meurent plus. Les analyses effectuées après 24h d'infection chez les souris survivantes montrent qu'elles présentent une lésion pulmonaire plus importante, un taux de neutrophiles plus faible, une concentration en KC plus faible et en TNF- α plus élevée. Ces différences de sensibilité entre mâles et femelles pourraient être attribuées aux œstrogènes (348-350), elles sont d'ailleurs retrouvées entre les patients hommes et femmes dans la mucoviscidose (353,354).

Cette différence de sensibilité nous a amené à étudier l'effet de l'EPA/DHA chez les souris mâles et femelles séparément.

L'alimentation en EPA/DHA n'atténue pas la lésion pulmonaire et n'améliore pas le taux de survie des souris mâles, mais diminue la mortalité et la lésion pulmonaire chez les souris femelles. Nous pensons que le taux de mortalité et la lésion pulmonaire secondaire à l'infection plutôt faible chez les mâles n'a pas permis de visualiser un effet bénéfique de EPA/DHA chez les mâles, alors que les femelles, plus vulnérables à l'infection, en ont bénéficié nettement. En revanche, l'étude des paramètres inflammatoires mesurés chez les souris survivantes montre que le régime EPA/DHA est également bénéfique pour les souris mâles. Il diminue la réponse inflammatoire en limitant l'afflux de polynucléaires, la sécrétion de KC et d'IL-6.

La comparaison de nos résultats avec la littérature est difficile. Les animaux, le modèle expérimental, la dose d'EPA et de DHA administrée et son temps d'administration sont différents. Les études les plus importantes ont été réalisées par l'équipe de Freedman (119,120,131,355). Les animaux sont les souris *cfr*^{-/-} et leur troubles digestifs sont corrigés par administration de peptamen® qui est riche en acides gras à chaîne moyenne. L'administration de DHA correspond à 40 mg/jr (soit 7-8 fois la dose administrée à nos souris) et elle est administrée pendant 7 jours. A partir d'un modèle basé sur l'utilisation d'aérosols de LPS de *P. aeruginosa*, ils démontrent que les (n-3) AGPI-LC ne modifient pas la production de TNF- α , de MIP-2 et de CXCL-1, mais diminuent significativement la concentration d'eicosanoïdes dérivés de l'AA comme la PGF_{1 α} , PGF_{2 α} , PGE₂ et TB₂ (355). Dans un deuxième modèle correspondant à une infection chronique, ils démontrent également que leur régime n'a aucun effet sur la concentration des cytokines pro-inflammatoires (TNF-

α , MIP-2, KC, IL-6 et IL-1 β) et sur la survie des souris. Le bénéfice de cette alimentation a également été analysé sur l'évolution des signes cliniques et inflammatoires retrouvés au niveau des différents organes de ces souris après 7, 30 et 60 jours d'administration. Il n'est significatif qu'au niveau du foie où on note une diminution de l'obstruction des canaux biliaires et de l'inflammation hépatique (356). A notre connaissance, notre étude est la seule à avoir analysé séparément les males et les femelles *cftr*^{-/-}.

Nos résultats semblent par conséquent plus solides que ceux obtenus dans la littérature. Cette différence pourrait s'expliquer par notre modèle (utilisation d'un mélange à prédominance d'EPA), la prise en compte du sexe des souris (les résultats des 2 sexes ne sont parfois pas différenciés) et aussi par la durée d'administration de l'EPA et du DHA qui est plus importante et pour laquelle nous avons vérifié l'intégration dans les membranes cellulaires. La dose administrée est également plus extrapolable à celle d'une supplémentation humaine. Ces résultats démontrent un effet positif anti-inflammatoire et protecteur des (n-3) AGPI-LC contre l'infection capable d'améliorer la survie chez les femelles plus vulnérables à l'infection. Les perspectives de ce travail sont de confirmer leur action dans un modèle d'infection chronique à *P. aeruginosa* chez la souris *cftr*^{-/-} et d'engager des études cliniques dans la mucoviscidose.

Un certain nombre d'essais cliniques a été réalisé (357-361). S'ils sont difficilement comparables entre eux car ils ont utilisé des protocoles différents dans les doses de (n-3) AGPI-LC, les associations et les durées, ils montrent de façon constante un effet biologique sur des paramètres biologiques de l'inflammation. Par contre, les effets cliniques sont plus inconstants. Si ces thérapeutiques sont potentiellement intéressantes, les études disponibles (incluant un faible nombre de malades) ne permettent pas de recommander actuellement l'utilisation des (n-3) AGPI-LC en routine dans la mucoviscidose, mais de nouvelles études sont nécessaires (362). Nos résultats encouragent cependant à poursuivre ces études, en particulier par une supplémentation précoce en (n-3) AGPI-LC chez le jeune enfant en prévention de l'infection à *P. aeruginosa*.

II. Impact du régime enrichi en pAOS dans la résistance à l'infection pulmonaire des souris BALB/c

Le régime enrichi en pAOS a été administré pendant 5 semaines avant d'infecter les souris de 2 fonds génétiques différents sur le plan de leur profil immunitaire. Cette durée a été choisie arbitrairement pour pouvoir comparer l'effet des pAOS seuls et associés aux (n-3) AGPI-LC et d'étudier l'effet synergique de ces 2 composés nutritionnels dans une future étude. D'après la littérature, le délai nécessaire pour obtenir une modulation de l'immunité *via* des modifications de la flore digestive est de 5 à 6 semaines (207,215), cette durée nous semblait suffisante pour obtenir les adaptations de la flore et de l'immunité. Par ailleurs, l'effet attendu des pAOS étant une modulation de l'immunité adaptative, nous avons choisi un modèle d'infection chronique qui permet une meilleure stimulation de celle-ci.

L'effet des pAOS a été mesuré au cours des 4 premiers jours sur les critères suivants :

- la survie et la charge bactérienne pulmonaire ;
- l'exploration de la réponse immune Th1 et Th2 ;
- l'étude des paramètres inflammatoires ;
- la résistance des animaux survivants à une deuxième réinfection effectuée 15 jours après.

L'analyse des résultats montre que les souris BALB/c nourries par les pAOS **ne survivent pas plus** que les souris contrôles mais que **les pAOS accélèrent la clairance bactérienne pulmonaire** : alors que la totalité des animaux nourris par la diète contrôle restent infectés les 3 premiers jours, une partie des souris nourries par les pAOS éliminent spontanément les bactéries de leur poumons, et le nombre de bactéries retrouvées chez ces dernières est également significativement plus faible. Ces résultats sont associés à un **prolongement du recrutement des neutrophiles et des macrophages dans le temps**. Cette analyse cinétique montre de façon plus précise que le nombre de neutrophiles est plus faible le 1^{er} jour, mais plus élevé le 2^{ème} et 3^{ème} jour et que le nombre de macrophages reste plus élevé au cours des 3 premiers jours chez les souris nourries par le régime pAOS que chez les souris témoins. Le prolongement du recrutement des neutrophiles dans le groupe pAOS est concordant avec une **modification de la cinétique de production du facteur**

chemioattractant KC. Le pic de sécrétion de ce facteur est retardé. Il se situe le 2^{ème} jour chez les souris pAOS alors qu'il se situe le premier jour chez les souris contrôles. La prolongation de cette réponse inflammatoire pourrait être délétère pour les souris pAOS. Mais le dosage du TNF- α dans le liquide de lavage broncho alvéolaire montre que sa production est plus faible chez les souris nourries par les pAOS. Ce résultat suggère une **diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires.** Par ailleurs cette diminution est associée à une **augmentation de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10.**

Les pAOS augmentent la réponse Th1. Cette augmentation est caractérisée par **une augmentation de la production d'IFN- γ et une diminution de la production d'IL-4** les 2 premiers jours dans le groupe des souris nourries par les pAOS. Le rebond de la production d'IL-4 observé le 3^{ème} jour chez ces souris est surprenant. Il est d'ailleurs associé à une augmentation du facteur de transcription GATA3 spécifique des lymphocytes Th2 dans les poumons. Il pourrait correspondre soit à un effet transitoire des pAOS sur la polarisation des lymphocytes Th, soit à l'influence du *P. aeruginosa* qui reste présent dans les poumons et qui continueraient à modifier ce mécanisme en sécrétant des C12-HSL (94,99,101,102).

Pour répondre à cette dernière hypothèse, nous avons mesuré l'expression de ces 2 facteurs dans la rate des animaux, c'est-à-dire à distance du site infectieux, ce qui permet de mesurer la réponse systémique et non locale. Dans la rate, l'expression de *gata3* diminue significativement et le ratio *t-bet / gata3* augmente significativement chez les animaux nourris par les pAOS par comparaison aux animaux nourris par la diète standard. Elle confirme donc que **les pAOS diminuent la réponse Th2 et stimulent la réponse Th1.** Ces résultats sont également associés à **une activation des macrophages M1.** Cette activation est identifiée dans les poumons comme dans la rate par une augmentation de l'expression de *nos2* les 2 premiers jours, une diminution de *arg1* au cours de l'infection et par conséquent par une augmentation du ratio *nos2 / arg1*.

Le bénéfice de l'impact des pAOS sur la réponse immune a été évalué sur la résistance des animaux à la réinfection. Les résultats montrent que les pAOS **augmentent la résistance à la ré-infection des animaux survivants** en diminuant la charge bactérienne pulmonaire lors d'une réinfection lorsqu'ils sont nourris par les pAOS.

III. Impact du régime enrichi en pAOS dans la résistance à l'infection pulmonaire des souris C57BL/6

Les souris C57BL/6 représentent un moins bon modèle pour étudier le rôle des pAOS que les souris BALB/c. Elles sont en effet décrites pour développer une réponse Th1 et pourraient donc être moins sensibles à l'effet de bascule de la réponse Th2 vers Th1 escompté par les pAOS. Cependant, parce que nous connaissons bien ce modèle d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez les souris C57BL/6 (339,340), et qu'elles sont très sensibles à l'infection par *P. aeruginosa*, il nous a semblé intéressant de voir si les pAOS étaient capable de moduler leur réponse après infection et de les comparer à des animaux dont la réponse à l'infection est différente. Ceci nous permet de mieux apprécier les modifications immunologiques induites par les pAOS. Ce modèle animal a en plus l'intérêt de nous permettre, dans le futur, d'étudier leur effet synergique avec les (n-3) AGPI-LC.

Avant d'analyser l'effet des pAOS sur les souris C57BL/6 et de les comparer à ceux observés avec les souris BALB/c, il nous paraît important de rappeler les caractéristiques de la réponse de l'hôte dans nos deux modèles.

A. Analyse de la susceptibilité des souris nourries par la diète contrôlée

Les souris C57BL/6 sont très sensibles à l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa*. Elles meurent entre le 1^{er} et le 4^{ème} jour et présentent un taux de mortalité final de près de 60%. La charge bactérienne pulmonaire est maximale le 2^{ème} jour avec une augmentation de 2 log bactérien/g de poumon par rapport à l'inoculum de départ et devient inférieur à celui-ci à partir du 3^{ème} jour. La réponse inflammatoire apparaît rapidement avec un recrutement maximal de polynucléaires et un pic de production de KC et de TNF- α au 1^{er} jour qui diminue ensuite progressivement. A l'opposé l'afflux de macrophages (6.9×10^4 /ml) reste stable les 3 premiers jours. Ces résultats sont similaires à ceux que nous avons obtenus dans une étude précédente (339). L'exploration de la réponse immune dans les poumons montre une augmentation progressive de la production d'IFN- γ associée à une diminution progressive d'IL-4, ce qui confirme le développement d'une réponse Th1 au cours des 2

premiers jours. L'activation des macrophages M1 caractérisée par l'expression de *nos2* est maximale le premier jour pour diminuer ensuite.

B. Comparaison de la susceptibilité des souris C57BL/6 et BALB/c nourries par la diète contrôle

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus avec les souris BALB/c montre que si le taux de mortalité est identique avec la nourriture contrôle dans les 2 fonds génétiques murins, la charge bactérienne pulmonaire est 600 fois plus élevée le deuxième jour chez les BALB/c que chez les C57BL/6. Les BALB/c commencent d'ailleurs à mourir à partir de cette période, soit plus tardivement que les C57BL/6. La réponse inflammatoire est identique que ce soit dans la cinétique d'expression des marqueurs qui est maximale le premier jour que dans leur concentration. Les BALB/c seraient ainsi 600 fois plus infectées par *P. aeruginosa* mais développeraient moins de réponse inflammatoire et par conséquent seraient plus résistantes à l'infection pulmonaire. La réponse immune est bien différente entre les 2 types de souris. Elle indique une réponse Th1 chez les C57BL/6 (augmentation du ratio IFN- γ / IL-4 entre le 1^{er} et 2^{ème} jour) et l'absence de réponse Th1 (pas d'augmentation du ratio IFN- γ / IL-4 entre le 1^{er} et 2^{ème} jour) chez les BALB/c. La comparaison de nos 2 modèles confirme également que les souris BALB/c développent une réaction immune à l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* beaucoup plus importante que les souris C57BL/6. L'expression relative des marqueurs *t-bet* et *gata3* est en effet 10 à 15 fois plus élevée dans les poumons de souris BALB/c que chez les souris C57BL/6. Comme nous l'avons vu dans la première partie de notre thèse, cette différence pourrait être liée à la bactérie qui peut moduler la réponse immune en produisant des AHL (94,99,101,102) et au fond génétique des souris (117).

La réponse différente des 2 types de souris nous amène à penser que la mortalité des souris C57BL /6 pourrait être attribuée à une réponse inflammatoire excessive et que celle-des souris BALB/c serait au contraire liée à leur profil Th2 et anti-inflammatoire qui entretient une colonisation excessive de leur poumons et favorise l'effet délétère de *P. aeruginosa*.

C. Effet de pAOS chez les souris C57BL/6

Les pAOS améliorent clairement le pronostic de l'infection en **augmentant la survie**, mais sans diminuer la charge bactérienne pulmonaire. Selon nos observations précédentes, la réponse inflammatoire étant la réaction prépondérante des souris C57BL/6 infectées par *P. aeruginosa*, sa diminution pourrait jouer un rôle essentiel dans leur survie.

Nos résultats montrent que les pAOS prolongent le recrutement des neutrophiles et des macrophages jusqu'au 3^{ème} jour et augmentent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, TNF- α et KC, le 1^{er} jour d'infection. L'augmentation de ces marqueurs apparaît cependant associée à une diminution de l'activité des macrophages M1 ce qui suppose une diminution de la sécrétion des radicaux libres, et à une augmentation de la production d'IL-10 qui est connue pour ces propriétés anti-inflammatoires.

Le bénéfice clinique observé par les pAOS pourrait donc être associé à **une diminution du stress oxydant et à une augmentation de la réponse anti-inflammatoire**. Il faudrait confirmer ces résultats en comparant le taux de dérivés nitrés chez les souris nourries avec pAOS et les souris contrôles.

Bien que la réponse immune ne semble pas jouer un rôle essentiel dans l'infection pulmonaire des souris C57BL/6, les pAOS semblent également agir sur celle-ci. L'augmentation de la réponse Th1 visualisée par une augmentation de la production d'IFN- γ et une diminution d'IL-4 entre les 1^{er} et 2^{ème} jour dans les poumons des souris contrôles est également observée chez les souris nourries avec une diète enrichie en pAOS, mais la concentration de ces 2 cytokines est nettement plus faible chez les souris nourries par les pAOS. L'action des pAOS sur la réponse Th1 et Th2 pourrait résulter de leur action directe sur les Lc Treg, l'IL-10 étant représentative de leur stimulation. Ces résultats doivent être confirmés par une analyse de ces différentes populations en cytométrie de flux.

IV. Mécanismes d'action des pAOS

L'utilisation de ces 2 modèles s'est avérée extrêmement intéressante. Elle montre que les pAOS peuvent avoir un effet bénéfique mais que les mécanismes impliqués peuvent être complètement différents selon le fond génétique.

A. Les pAOS ont des propriétés immunomodulatrices et peuvent réduire une réponse Th2 préexistante.

Ces résultats peuvent être très intéressants chez les patients atteints de mucoviscidose dans la mesure où la réponse Th2 est associée à une aggravation des symptômes respiratoires. Cet effet immunomodulateur confirme les résultats obtenus avec les OS dans des modèles expérimentaux où la réponse Th2 est prédominante. Ce sont le plus souvent des modèles d'asthme allergique (206,207,363) ou d'allergie alimentaire (207-209). Dans ces modèles, les associations scGOS/lcFOS, et scGOS/lcFOS/pAOS diminuent cette réponse en limitant la production d'IL-4, l'afflux de éosinophiles, la production d'IgE et potentialise la réponse Th1 en favorisant l'expression des marqueurs spécifiques comme l'IFN- γ et T-bet et la réponse T régulatrice. Ces modifications s'accompagnent d'une atténuation des signes cliniques. Chez l'homme, ces associations réduisent l'incidence de la dermatite atopique dans les populations à risque (211,212), les allergies alimentaires (213). Les pAOS pourraient également agir sur les Lc Treg. Ces lymphocytes secrètent de l'IL-10 et nous avons observé dans les 2 types de souris une augmentation de la concentration de cette cytokine lorsque les souris étaient nourries par les pAOS. Nous aimerions également compléter l'étude de l'action immunostimulante des pAOS par la mesure de la concentration en Ac anti-*P. aeruginosa* dans les 2 types de souris, et en particulier les IgG1 et les IgG2, qui sont représentatives de la réponse Th2 et Th1, respectivement. A notre connaissance, l'effet des pAOS ou des autres lcFOS et scGOS sur l'activation des macrophages M1 et M2 n'a pas été étudié.

B. Les pAOS prolongent le recrutement des neutrophiles et des macrophages

Ce résultat est cohérent avec une **augmentation de la production de KC**. Il explique la diminution de la charge bactérienne pulmonaire qui était très importante chez les BALB/c et il est associé à une baisse de la mortalité des souris C57BL/6, ce qui suggère une baisse de la réponse inflammatoire. Cependant ce résultat reste surprenant si on considère qu'un excès du nombre de leucocytes suppose une sécrétion accrue de leurs toxines comme l'élastase connues pour engendrer des dommages tissulaires.

Les pAOS pourraient interagir avec les lectines présentes sur les molécules d'adhésion de type ICAM ou sélectines et agir sur la mobilité des neutrophiles. Une deuxième hypothèse est que le déclenchement de la réponse inflammatoire visualisée avec la production de KC soit retardé. Ce retard permettrait un meilleur contrôle de la réponse inflammatoire. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait mesurer le flux des neutrophiles et comparer l'activation du NF κ B chez les souris pAOS et les souris témoins plus tôt après l'infection. Une troisième hypothèse serait que l'activité cytotoxique des neutrophiles et des macrophages serait diminuée. Cette baisse est visualisée **chez les souris C57BL/6 par une diminution de l'activation M1 des macrophages** et pourrait être confirmée en mesurant l'activité de la myéloperoxydase dans les neutrophiles. Enfin, la réponse inflammatoire serait également mieux contrôlée grâce à l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 dans nos 2 modèles.

C. Les pAOS renforcent l'immunité anti-infectieuse.

Dans notre étude, le renforcement de l'immunité anti-infectieuse par les pAOS est mis en évidence par une diminution de la charge pulmonaire bactérienne chez les animaux survivants qui ont été réinfectés une seconde fois. Cet effet serait particulièrement intéressant dans la mucoviscidose car il pourrait limiter la survenue des exacerbations pulmonaires. Dans le futur, nous aimerions poursuivre l'analyse de la réponse inflammatoire et immune chez ces animaux pour étudier les mécanismes de ce renforcement. Ces résultats sont particulièrement intéressants car il concerne une infection extra-intestinale et suppose un effet systémique des

prébiotiques. Actuellement, cet effet dans le pronostic des infections autres qu'intestinales reste encore peu étudié. Les modèles expérimentaux montrent que les associations scGOS/lcFOS et scGOS/lcFOS/pAOS renforcent la réponse immune après leur vaccination par le virus *influenzae* en stimulant la réponse immune Th1 (215-217) ou Treg (218) et en diminuant la réponse Th2 (215-217). Ces études suggèrent que ces associations d'OS en stimulant cette réponse pourraient renforcer l'immunité anti-infectieuse et être efficaces dans les infections virales de la petite enfance. Certaines observations cliniques confirment ces hypothèses en montrant que les nourrissons nourris par un lait enrichi en scGOS/lcFOS présentent significativement moins d'épisodes infectieux des voies respiratoires et reçoivent moins de traitements antibiotiques que des nourrissons nourris par un lait standard (212,327).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre V, les propriétés immuno modulatrices des oligosaccharides prébiotiques pourraient résulter de **la stimulation de la croissance des espèces de lactobacilles et de bifides** qui auraient ensuite une action immunostimulante. L'association entre un effet immunostimulant et une augmentation de la proportion des lactobacilles et de bifidobactéries a été montrée chez les souris C57BL/6 après 20 jours de supplémentation par un mélange scGOS/lcFOS (207,215,216) ou après 4 semaines de supplémentation en isomaltooligosaccharides (334). Une augmentation des bifides et des lactobacilles est également observée chez les nourrissons nourris par du lait enrichi en scGOS/lcFOS (364,365). Ces souches et leurs différents composés pariétaux seraient perçus par les cellules immunes du GALT et influenceraient le développement du système immunitaire. Ce mécanisme leur confère un effet systémique.

Des résultats similaires montrant une action anti-infectieuse systémique ont été démontré avec certaines espèces de probiotiques. Une relation directe entre l'administration de *L. casei* et une augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages et par conséquent de la clairance bactérienne lors d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* a été montrée chez la souris (303). L'administration orale de *L. casei* améliore également le pronostic de l'infection à pneumocoques de souris dénutries et chez la souris Swiss albino. Ces souris sont particulièrement sensibles à cette bactérie. Dans le premier modèle, le bénéfice est observé avec *L. casei* et est attribué à une augmentation de l'activité des macrophages (304). Dans le second, l'administration orale de certaines souches de *L. rhamnosus* (10^8 pendant 2, 5 ou 7 jours dans l'eau de boisson) diminue le nombre de pneumocoques dans le LBA et inhibe les bactériémies par rapport au groupe témoin (305,306). Ce bénéfice clinique est associé à une

augmentation du recrutement des neutrophiles et des macrophages ainsi que de leur activité dans le LBA (test au nitro-bleu-tétrazolium), une augmentation de la concentration en IgA et IgG dans le LBA et une augmentation de la concentration en TNF- α , IFN- γ , IL-1 β et IL-10. Chez l'homme, l'administration de lait fermenté avec des *Lactobacillus* CG et 3 autres espèces de lactobacilles inhibent le portage nasal de *S. aureus*, pneumocoques et streptocoque β -hémolytique (312). Parce que la flore intestinale des patients atteints de mucoviscidose infectés par *P. aeruginosa* est souvent déséquilibrée suite aux nombreux traitements antibiotiques qu'ils reçoivent et que leur muqueuse intestinale est souvent inflammatoire, une première étude clinique *versus* placebo a été réalisée pour corriger ces perturbations (324). Cette étude montre que l'administration pendant 6 mois de 6×10^9 CFU/jour de *Lactobacillus GG* diminue le nombre d'exacerbations et d'hospitalisations et améliore le volume respiratoire expiré. Ces résultats ont été confirmés par un deuxième essai clinique sur 10 patients avec l'administration pendant 6 mois de tablettes contenant 6×10^9 CFU/ jour de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum* et *Streptococcus thermophiles* (366). Le bilan inflammatoire ainsi que la colonisation pulmonaire ne s'est ni aggravé, ni amélioré au cours de l'étude, seul le nombre d'éosinophiles a diminué, et ce dès la 12^{ème} semaine de traitement par les probiotiques. Ces résultats très encourageants pourraient donc être reproduits par l'administration de prébiotiques. A notre connaissance, aucune étude clinique étudiant les effets des prébiotiques chez des patients atteints de mucoviscidose n'a été publiée à l'heure actuelle.

Nous poursuivons actuellement notre travail en collaboration avec Danone Research (Centre for Specialised Nutrition Milk Research & Functional Innovations, Friedrichsdorf, Germany) par :

- le dosage des AGCC dans les selles qui seraient les témoins de l'utilisation des pAOS par les bifidobactéries et les lactobacilles ;
- l'analyse de la flore intestinale.

Les propriétés immuno-modulatrices des pAOS pourraient également résulter de leur **action directe sur les cellules immunes**. Ce mécanisme a été mis en évidence à partir de cellules de cordon ombilical ou de cellules spléniques de patients allergiques (20,169) mises en culture en présence d'OS neutres ou acides. Cette action serait donc possible dans notre étude car les pAOS traversent la barrière intestinale (20) et passe dans la circulation

lymphatique et sanguine. Ce passage a été décrit avec les lcFOS et les scGOS qui ajoutés au lait formulé se retrouvent dans les urines des nourrissons. Pour vérifier cette hypothèse, la recherche de pAOS dans le sang des souris est en cours.

CONCLUSION

Nos résultats, démontrent qu'un régime enrichi en EPA/DHA ou en pAOS améliore le pronostic de l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Le bénéfice observé avec l'EPA/DHA est corrélé à son activité anti-inflammatoire. Les pAOS semblent avoir un mécanisme d'action différent selon le type de souris. Leur propriété étant de balancer la réponse Th2 vers Th1, cet effet a surtout été observé chez les souris BALB/c, qui développent une réponse Th2 alors que le bénéfice clinique observé chez les souris C57BL/6 est plutôt dépendant d'une augmentation de la réponse anti-inflammatoire que d'une diminution de la réponse Th1. Ces mécanismes d'action pourraient être liés à une modification de la flore intestinale et/ou seraient potentialisés par le passage des pAOS dans la circulation générale.

Ce travail amène à 2 conclusions :

- les pAOS et les (n-3) AGPI-LC sont efficaces et ont des mécanismes d'action différents, ils pourraient être complémentaires et agir en synergie ;
- il paraît indispensable de connaître la réponse de l'hôte face à l'infection pour exploiter les bénéfices de ces composés nutritionnels et les utiliser de façon la plus appropriée.

Nous montrons en effet que pour une même anomalie génétique, comme les souris *cfr^{-/-}*, les mâles et les femelles ne répondent pas de la même manière, et que pour les souris C57BL/6 et BALB/c, les réponses sont aussi très différentes.

Ces résultats sont très encourageants et nous semblent apporter un rationnel fort à des études cliniques dans la mucoviscidose. Leurs effets secondaires potentiels doivent cependant être pris en compte. Dans certains modèles d'infection, chez la souris par exemple, l'administration de prébiotiques peut augmenter la sévérité des infections. Ce mécanisme est lié à l'utilisation des prébiotiques par les bactéries pathogènes présentes dans la flore intestinale, ce qui favorise leur prolifération et leur translocation dans la circulation générale et vers d'autres tissus. (367,368).

BIBLIOGRAPHIE

1. Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Hoiby N, Givskov M. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Rev Mol Med*. 2010 Apr 7;12:e11.:e11.
2. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*. 2006 Feb;36:78-91.
3. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*. 2004 Feb;23:327-33.
4. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol*. 2004 Jun;327:539-49.
5. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jul;19:491-511.
6. Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M, Si-Tahar M. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem*. 2004 Jan 23;279:2712-8.
7. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*. 2002 Sep;323:59-72.
8. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999 Oct;11:443-51.
9. Power MR, Peng Y, Maydanski E, Marshall JS, Lin TJ. The development of early host response to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is critically dependent on myeloid differentiation factor 88 in mice. *J Biol Chem*. 2004 Nov;279:49315-22.
10. Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Wilson CB. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against *Pseudomonas aeruginosa* but not *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2004 Mar 15;172:3377-81.
11. Ramphal R, Balloy V, Huerre M, Si-Tahar M, Chignard M. TLRs 2 and 4 are not involved in hypersusceptibility to acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175:3927-34.
12. Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol*. 2004 Nov;12:509-17.
13. Craig A, Mai J, Cai S, Jeyaseelan S. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect Immun*. 2009 Feb;77:568-75.
14. Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere JC, Standiford TJ, Ishiguro M, Yamaguchi K. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-

- oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun.* 2003 Oct;71:5785-93.
15. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:621-67. Epub;2001 Oct 4.:621-67.
 16. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973 May 1;137:1142-62.
 17. Romani N, Ratzinger G, Pfaller K, Salvenmoser W, Stossel H, Koch F, Stoitzner P. Migration of dendritic cells into lymphatics-the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance. *Int Rev Cytol.* 2001;207:237-70.:237-70.
 18. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell.* 2001 Aug 10;106:259-62.
 19. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5:617-28.
 20. Eiwegger T, Stahl B, Haidl P, Schmitt J, Boehm G, Dehlink E, Urbanek R, Szepfalusi Z. Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010 Dec;21:1179-88.
 21. Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med.* 1997 Mar 17;185:1101-11.
 22. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192:219-26.
 23. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol.* 2001 Jul;2:585-9.
 24. Verreck FA, de BT, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 30;101:4560-5.
 25. Richmond A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol.* 2002 Sep;2:664-74.
 26. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998 Nov 15;336:1-17.
 27. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84:731-65.
 28. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25:677-86.

29. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003 Feb;73:209-12.
30. Morris SM, Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J Nutr.* 2007 Jun;137:1602S-9S.
31. Satriano J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids.* 2004 Jul;26:321-9.
32. Shearer JD, Richards JR, Mills CD, Caldwell MD. Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am J Physiol.* 1997 Feb;272:E181-E190.
33. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181:3733-9.
34. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol.* 1995 Apr;25:1101-4.
35. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 24;94:6954-8.
36. Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Sep;24:450-5.
37. Maarsingh H, Pera T, Meurs H. Arginase and pulmonary diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008 Aug;378:171-84.
38. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan;3:23-35.
39. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004 Sep;76:509-13.
40. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2005 Dec;142:481-9.
41. Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest.* 2007 May;117:1119-27.
42. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008 Sep 1;112:1557-69.
43. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000 Mar 17;100:655-69.
44. Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in

- lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 18;98:15137-42.
45. Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*. 2005 Jan 21;307:430-3.
 46. Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, et al. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*. 2001 Jun 8;292:1907-10.
 47. Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*. 2002 Jan 11;295:336-8.
 48. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*. 2002 Jan 11;295:338-42.
 49. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med*. 2002 Jun 3;195:1499-505.
 50. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2002 Jun;3:549-57.
 51. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol*. 1990 Dec 1;145:3796-806.
 52. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997 May 16;89:587-96.
 53. Pai SY, Truitt ML, Ho IC. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101:1993-8.
 54. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*. 1996 Mar;4:313-9.
 55. Zhou M, Ouyang W. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res*. 2003;28:25-37.
 56. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:713-58. Epub;2001 Dec;19:713-58.
 57. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441:235-8.
 58. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126:1121-33.

59. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6:1133-41.
60. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol*. 2008 Feb;9:194-202.
61. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CW, Vegoe AL, Hsieh CS, Jenkins MK, Farrar MA. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity*. 2008 Jan;28:112-21.
62. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165:4773-7.
63. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.:145-73.
64. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*. 1988 Apr 22;240:516-8.
65. Suen WE, Bergman CM, Hjelmstrom P, Ruddle NH. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med*. 1997 Oct;186:1233-40.
66. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*. 2006 Jun 15;441:890-3.
67. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*. 1997 Sep 26;277:2005-7.
68. Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 1998 Jan 22;391:344-5.
69. Riffo-Vasquez Y, Spina D. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation. *Pharmacol Ther*. 2002 Jun;94:185-211.
70. Le GG, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med*. 1990 Sep 1;172:921-9.
71. Kopf M, Le GG, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*. 1993 Mar 18;362:245-8.
72. Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science*. 1989 Jul 21;245:308-10.
73. Longphre M, Li D, Gallup M, Drori E, Ordonez CL, Redman T, Wenzel S, Bice DE, Fahy JV, Basbaum C. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*. 1999 Nov;104:1375-82.

74. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989 Dec 1;170:2081-95.
75. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.:683-765.
76. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:425-56. Epub;2001 Dec;19:425-56.
77. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity.* 2001 Dec;15:985-95.
78. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 1998 Mar 16;187:875-83.
79. D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A, Sinigaglia F. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol.* 1998 Nov 15;161:5111-5.
80. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006 Jun;24:677-88.
81. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JJ, Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity.* 1995 Dec;3:811-21.
82. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007 Jul 26;448:484-7.
83. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 2007 Jul 26;448:480-3.
84. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med.* 2008 Mar;14:275-81.
85. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med.* 2008 Mar;14:282-9.
86. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-62.:531-62.
87. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8:523-32.

88. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198:1875-86.
89. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* 2007 Mar;8:277-84.
90. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med.* 1999 Oct 4;190:995-1004.
91. Pacholczyk R, Kern J. The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology.* 2008 Dec;125:450-8.
92. Jensen PO, Givskov M, Bjarnsholt T, Moser C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Aug;59:292-305.
93. Kaufman MR, Jia J, Zeng L, Ha U, Chow M, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa* mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of *exoS*. *Microbiology.* 2000 Oct;146:2531-41.
94. Boontham P, Robins A, Chandran P, Pritchard D, Camara M, Williams P, Chuthapisith S, McKechnie A, Rowlands BJ, Eremin O. Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clin Sci (Lond).* 2008 Dec;115:343-51.
95. Chhabra SR, Harty C, Hooi DS, Daykin M, Williams P, Telford G, Pritchard DI, Bycroft BW. Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *J Med Chem.* 2003 Jan 2;46:97-104.
96. Hooi DS, Bycroft BW, Chhabra SR, Williams P, Pritchard DI. Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Infect Immun.* 2004 Nov;72:6463-70.
97. Telford G, Wheeler D, Williams P, Tomkins PT, Appleby P, Sewell H, Stewart GS, Bycroft BW, Pritchard DI. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun.* 1998 Jan;66:36-42.
98. Mukae H, Urabe K, Yanagihara K, Ishimoto H, Sakamoto N, Ishii H, Nakayama S, Ishimatsu Y, Abe K, et al. Low expression of T-cell co-stimulatory molecules in bone marrow-derived dendritic cells in a mouse model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Tohoku J Exp Med.* 2010 Jan;220:59-65.
99. Skindersoe ME, Zeuthen LH, Brix S, Fink LN, Lazenby J, Whittall C, Williams P, Diggle SP, Froekiaer H, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009 Apr;55:335-45.

100. Pene F, Zuber B, Courtine E, Rousseau C, Ouaz F, Toubiana J, Tazi A, Mira JP, Chiche JD. Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. *J Immunol.* 2008 Dec 15;181:8513-20.
101. Ritchie AJ, Jansson A, Stallberg J, Nilsson P, Lysaght P, Cooley MA. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect Immun.* 2005 Mar;73:1648-55.
102. Ritchie AJ, Yam AO, Tanabe KM, Rice SA, Cooley MA. Modification of in vivo and in vitro T- and B-cell-mediated immune responses by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun.* 2003 Aug;71:4421-31.
103. Neddermann P, Gargioli C, Muraglia E, Sambucini S, Bonelli F, De FR, Cortese R. A novel, inducible, eukaryotic gene expression system based on the quorum-sensing transcription factor TraR. *EMBO Rep.* 2003 Feb;4:159-65.
104. Ritchie AJ, Whittall C, Lazenby JJ, Chhabra SR, Pritchard DI, Cooley MA. The immunomodulatory *Pseudomonas aeruginosa* signalling molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone enters mammalian cells in an unregulated fashion. *Immunol Cell Biol.* 2007 Nov;85:596-602.
105. Shiner EK, Reddy S, Timmons C, Li G, Williams SC, Rumbaugh KP. Construction of a bacterial autoinducer detection system in mammalian cells. *Biol Proced Online.* 2004;6:268-276. Epub;2004 Dec 30.:268-76.
106. Williams SC, Patterson EK, Carty NL, Griswold JA, Hamood AN, Rumbaugh KP. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and functions in mammalian cells. *J Bacteriol.* 2004 Apr;186:2281-7.
107. Ruiz PA, Braune A, Holzlwimmer G, Quintanilla-Fend L, Haller D. Quercetin inhibits TNF-induced NF-kappaB transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. *J Nutr.* 2007 May;137:1208-15.
108. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* 1999 Jun;5:698-701.
109. Appel S, Mirakaj V, Bringmann A, Weck MM, Grunebach F, Brossart P. PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood.* 2005 Dec 1;106:3888-94.
110. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell.* 1996 Apr;85:229-36.
111. Dubrac S, Stoitzner P, Pirkebner D, Elentner A, Schoonjans K, Auwerx J, Saeland S, Hengster P, Fritsch P, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation inhibits Langerhans cell function. *J Immunol.* 2007 Apr 1;178:4362-72.

112. Moser C, Johansen HK, Song Z, Hougen HP, Rygaard J, Hoiby N. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice. *APMIS*. 1997 Nov;105:838-42.
113. Moser C, Hougen HP, Song Z, Rygaard J, Kharazmi A, Hoiby N. Early immune response in susceptible and resistant mice strains with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection determines the type of T-helper cell response. *APMIS*. 1999 Dec;107:1093-100.
114. Moser C, Jensen PO, Kobayashi O, Hougen HP, Song Z, Rygaard J, Kharazmi A, by H. Improved outcome of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is associated with induction of a Th1-dominated cytokine response. *Clin Exp Immunol*. 2002 Feb;127:206-13.
115. Cassatella MA, Guasparri I, Ceska M, Bazzoni F, Rossi F. Interferon-gamma inhibits interleukin-8 production by human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*. 1993 Feb;78:177-84.
116. Schnyder-Candrian S, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A. Interferon-alpha and interferon-gamma down-regulate the production of interleukin-8 and ENA-78 in human monocytes. *J Leukoc Biol*. 1995 Jun;57:929-35.
117. Kondratieva TK, Kobets NV, Khaidukov SV, Yermeev VV, Lyadova IV, Apt AS, Tam MF, Stevenson MM. Characterization of T cell clones derived from lymph nodes and lungs of *Pseudomonas aeruginosa*-susceptible and resistant mice following immunization with heat-killed bacteria. *Clin Exp Immunol*. 2000 Aug;121:275-82.
118. Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y, Huang P, Tong J, Naren AP, et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol*. 2006 Sep;8:933-44.
119. Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr*(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96:13995-4000.
120. Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper IK, Weed DA, Gelrud A, Regan MM, et al. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med*. 2004 Feb 5;350:560-9.
121. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Apr;151:1075-82.
122. Konstan MW, Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol*. 1997 Aug;24:137-42.
123. Kammouni W, Figarella C, Marchand S, Merten M. Altered cytokine production by cystic fibrosis tracheal gland serous cells. *Infect Immun*. 1997 Dec;65:5176-83.
124. Tabary O, Zahm JM, Hinrasky J, Couetil JP, Cornillet P, Guenounou M, Gaillard D, Puchelle E, Jacquot J. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic

- fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am J Pathol.* 1998 Sep;153:921-30.
125. Miele L, Cordella-Miele E, Xing M, Frizzell R, Mukherjee AB. Cystic fibrosis gene mutation (deltaF508) is associated with an intrinsic abnormality in Ca²⁺-induced arachidonic acid release by epithelial cells. *DNA Cell Biol.* 1997 Jun;16:749-59.
 126. Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones G, Bruce KD. characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16s ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov;42:5176-83.
 127. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409-35.
 128. Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Jacquot J. Genistein inhibits constitutive and inducible NFkappaB activation and decreases IL-8 production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. *Am J Pathol.* 1999 Aug;155:473-81.
 129. Tabary O, Boncoeur E, de Martin R, Pepperkok R, Clement A, Schultz C, Jacquot J. Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Signal.* 2006 May;18:652-60.
 130. Roulet M, Frascarolo P, Rappaz I, Pilet M. Essential fatty acid deficiency in well nourished young cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr.* 1997 Dec;156:952-6.
 131. Freedman SD, Shea JC, Blanco PG, Alvarez JG. Fatty acids in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2000 Nov;6:530-2.
 132. Roussel P, Lamblin G, Degand P. Heterogeneity of the carbohydrate chains of sulfated bronchial glycoproteins isolated from a patient suffering from cystic fibrosis. *J Biol Chem.* 1975 Mar 25;250:2114-22.
 133. Cheng PW, Boat TF, Cranfill K, Yankaskas JR, Boucher RC. Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 1989 Jul;84:68-72.
 134. Dohrman A, Miyata S, Gallup M, Li JD, Chapelin C, Coste A, Escudier E, Nadel J, Basbaum C. Mucin gene (MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Apr 28;1406:251-9.
 135. Li JD, Dohrman AF, Gallup M, Miyata S, Gum JR, Kim YS, Nadel JA, Prince A, Basbaum CB. Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Feb 4;94:967-72.
 136. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell.* 1996 Apr 19;85:229-36.
 137. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell.* 1997 Feb 21;88:553-60.

138. Knowles MR, Robinson JM, Wood RE, Pue CA, Mentz WM, Wager GC, Gatzky JT, Boucher RC. Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest.* 1997 Nov 15;100:2588-95.
139. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Accurso F, Wilson JM. Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Jul;25:21-5.
140. Conese M, Copreni E, Di Gioia S, De Rinaldis P, Fumarulo R. Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros.* 2003 Sep;2:129-35.
141. Tager AM, Wu J, Vermeulen MW. The effect of chloride concentration on human neutrophil functions: potential relevance to cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998 Oct;19:643-52.
142. Painter RG, Bonvillain RW, Valentine VG, Lombard GA, LaPlace SG, Nauseef WM, Wang G. The role of chloride anion and CFTR in killing of *Pseudomonas aeruginosa* by normal and CF neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2008 Jun;83:1345-53.
143. Watt AP, Courtney J, Moore J, Ennis M, Elborn JS. Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis. *Thorax.* 2005 Aug;60:659-64.
144. Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi A, Koch C, Hoiby N. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS.* 2000 May;108:329-35.
145. Brazova J, Sediva A, Pospisilova D, Vavrova V, Pohunek P, Macek M, Jr., Bartunkova J, Lauschmann H. Differential cytokine profile in children with cystic fibrosis. *Clin Immunol.* 2005 May;115:210-5.
146. Hartl D, Griese M, Kappler M, Zissel G, Reinhardt D, Rebhan C, Schendel DJ, Krauss-Etschmann S. Pulmonary T(H)2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jan;117:204-11.
147. Moss RB, Hsu YP, Olds L. Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 2000 Jun;120:518-25.
148. Moser C, Jensen PO, Pressler T, Frederiksen B, Lanng S, Kharazmi A, Koch C, Hoiby N. Serum concentrations of GM-CSF and G-CSF correlate with the Th1/Th2 cytokine response in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS.* 2005 Jun;113:400-9.
149. Hartl D, Griese M, Kappler M, Zissel G, Reinhardt D, Rebhan C, Schendel DJ, Krauss-Etschmann S. Pulmonary T(H)2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jan;117:204-11.
150. Murphy BS, Bush HM, Sundareshan V, Davis C, Hagadone J, Cory TJ, Hoy H, Hayes D, Jr., Anstead MI, Feola DJ. Characterization of macrophage activation states in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2010 Sep;9:314-22.

151. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 1998 Sep;12:1063-73.
152. Calder PC. Fatty acids and gene expression related to inflammation. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme*. 2002;7:19-36; discussion 36-40.:19-36.
153. Van BS, Van Biervliet JP, Robberecht E, Christophe A. Docosahexaenoic acid trials in cystic fibrosis: a review of the rationale behind the clinical trials. *J Cyst Fibros*. 2005 Mar;4:27-34.
154. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82:131-85.
155. Niiro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, Hara S, Nemoto Y, Tanaka Y, et al. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood*. 1997 Mar 1;89:1621-8.
156. Powell WS. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2: endogenous PPARgamma ligand or minor eicosanoid degradation product? *J Clin Invest*. 2003 Sep;112:828-30.
157. Castrillo A, Diaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martin-Sanz P, Bosca L. Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol*. 2000 Mar;20:1692-8.
158. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*. 2002 Dec;21:495-505.
159. Nakhla T, Fu D, Zopf D, Brodsky NL, Hurt H. Neutral oligosaccharide content of preterm human milk. *Br J Nutr*. 1999 Nov;82:361-7.
160. Bode L. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutr Rev*. 2009 Nov;67 Suppl 2:S183-91.:S183-S191.
161. Sabater-Molina M, Larque E, Torrella F, Zamora S. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *J Physiol Biochem*. 2009 Sep;65:315-28.
162. de KS, Kraneveld AD, Garssen J, Willemsen LE. Glycan recognition at the interface of the intestinal immune system: Target for immune modulation via dietary components. *Eur J Pharmacol*. 2011 Sep;668 Suppl 1:S124-32. Epub;%2011 Jul 28.:S124-S132.
163. Yanahira S, Kobayashi T, Suguri T, Nakakoshi M, Miura S, Ishikawa H, Nakajima I. Formation of oligosaccharides from lactose by *Bacillus circulans* beta-galactosidase. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1995 Jun;59:1021-6.
164. Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J Appl Microbiol*. 2008 Feb;104:305-44.
165. Shinohara K, Ohashi Y, Kawasumi K, Terada A, Fujisawa T. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe*. 2010 Oct;16:510-5.

166. Vos AP, M'Rabet L, Stahl B, Boehm G, Garssen J. Immune-modulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. *Crit Rev Immunol.* 2007;27:97-140.
167. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995 Jun;125:1401-12.
168. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 2004 Dec;17:259-75.
169. Eiwegger T, Stahl B, Schmitt J, Boehm G, Gerstmayr M, Pichler J, Dehlink E, Loibichler C, Urbanek R, Szepfalusi Z. Human milk--derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatr Res.* 2004 Oct;56:536-40.
170. van KY. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans.* 2008 Dec;36:1478-81.
171. Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van LE, Demaurex N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol.* 2002 Mar 1;168:2118-26.
172. Geijtenbeek TB, Engering A, van KY. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukoc Biol.* 2002 Jun;71:921-31.
173. Niess JH, Reinecker HC. Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005 Nov;21:687-91.
174. Correa SG, Sotomayor CE, Aoki MP, Maldonado CA, Rabinovich GA. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology.* 2003 Feb;13:119-28.
175. Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol.* 2000 Oct 1;165:3722-9.
176. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood.* 2007 Mar 1;109:2058-65.
177. Walzel H, Blach M, Hirabayashi J, Kasai KI, Brock J. Involvement of CD2 and CD3 in galectin-1 induced signaling in human Jurkat T-cells. *Glycobiology.* 2000 Feb;10:131-40.
178. Dai SY, Nakagawa R, Itoh A, Murakami H, Kashio Y, Abe H, Katoh S, Kontani K, Kihara M, et al. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2005 Sep 1;175:2974-81.
179. Schumacher G, Bendas G, Stahl B, Beermann C. Human milk oligosaccharides affect

- P-selectin binding capacities: in vitro investigation. *Nutrition*. 2006 Jun;22:620-7.
180. Klein N, Schwertmann A, Peters M, Kunz C, Strobel S. Immunomodulatory effects of breast milk oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol*. 2000;478:251-9.:251-9.
 181. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2007 Apr;7:255-66.
 182. Avril T, Attrill H, Zhang J, Raper A, Crocker PR. Negative regulation of leucocyte functions by CD33-related siglecs. *Biochem Soc Trans*. 2006 Dec;34:1024-7.
 183. Shao BM, Dai H, Xu W, Lin ZB, Gao XM. Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Oct 8;323:133-41.
 184. Xu Q, Yajima T, Li W, Saito K, Ohshima Y, Yoshikai Y. Levan (beta-2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. *Clin Exp Allergy*. 2006 Jan;36:94-101.
 185. Cebo C, Vergoten G, Zanetta JP. Lectin activities of cytokines: functions and putative carbohydrate-recognition domains. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep;1572:422-34.
 186. Coppa GV, Pierani P, Zampini L, Bruni S, Carloni I, Gabrielli O. Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. *Adv Exp Med Biol*. 2001;501:307-14.:307-14.
 187. Obermeier S, Rudloff S, Pohlentz G, Lentze MJ, Kunz C. Secretion of ¹³C-labelled oligosaccharides into human milk and infant's urine after an oral [¹³C]galactose load. *Isotopes Environ Health Stud*. 1999;35:119-25.
 188. Gnoth MJ, Rudloff S, Kunz C, Kinne RK. Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276:34363-70.
 189. GYORGY P, KUHN R, ROSE CS, ZILLIKEN F. Bifidus factor. II. Its occurrence in milk from different species and in other natural products. *Arch Biochem Biophys*. 1954 Jan;48:202-8.
 190. Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol*. 2011 Nov;45 Suppl:S120-7.:S120-S127.
 191. Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr*. 2001 Feb;73:415S-20S.
 192. Morrow AL, Rangel JM. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004 Oct;15:221-8.

193. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:37-58.:37-58.
194. Bouhnik Y, Achour L, Paineau D, Riottot M, Attar A, Bornet F. Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. *Nutr J.* 2007 Dec 5;6:42.:42.
195. Euler AR, Mitchell DK, Kline R, Pickering LK. Prebiotic effect of fructo-oligosaccharide supplemented term infant formula at two concentrations compared with unsupplemented formula and human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Feb;40:157-64.
196. Ben XM, Zhou XY, Zhao WH, Yu WL, Pan W, Zhang WL, Wu SM, Van Beusekom CM, Schaafsma A. Supplementation of milk formula with galacto-oligosaccharides improves intestinal micro-flora and fermentation in term infants. *Chin Med J (Engl).* 2004 Jun;117:927-31.
197. Fanaro S, Marten B, Bagna R, Vigi V, Fabris C, Pena-Quintana L, Arguelles F, Scholz-Ahrens KE, Sawatzki G, et al. Galacto-oligosaccharides are bifidogenic and safe at weaning: a double-blind randomized multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 Jan;48:82-8.
198. Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkens J, Gro S, Helm K, Klarczyk M, Schopfer H, Bockler HM, Wells J. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Jan;40:36-42.
199. Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002 Mar;34:291-5.
200. Moro GE, Mosca F, Miniello V, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G. Effects of a new mixture of prebiotics on faecal flora and stools in term infants. *Acta Paediatr Suppl.* 2003 Sep;91:77-9.
201. Shen Q, Tuohy KM, Gibson GR, Ward RE. In vitro measurement of the impact of human milk oligosaccharides on the faecal microbiota of weaned formula-fed infants compared to a mixture of prebiotic fructooligosaccharides and galactooligosaccharides. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Apr;52:337-43.
202. Salvini F, Riva E, Salvatici E, Boehm G, Jelinek J, Banderali G, Giovannini M. A specific prebiotic mixture added to starting infant formula has long-lasting bifidogenic effects. *J Nutr.* 2011 Jul;141:1335-9.
203. Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G, Kock R, Vigi V. Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Aug;41:186-90.
204. Magne F, Hachelaf W, Suau A, Boudraa G, Bouziane-Nedjadi K, Rigottier-Gois L, Touhami M, Desjeux JF, Pochart P. Effects on faecal microbiota of dietary and acidic oligosaccharides in children during partial formula feeding. *J Pediatr Gastroenterol*

- Nutr. 2008 May;46:580-8.
205. Westerbeek E, Hensgens R, Mihatsch W, Boehm G, Lafeber H, van ER. The effect of neutral and acidic oligosaccharides on stool viscosity, stool frequency and stool pH in preterm infants. *Acta Paediatr.* 2011 Nov;100:1426-31.
 206. Sonoyama K, Watanabe H, Watanabe J, Yamaguchi N, Yamashita A, Hashimoto H, Kishino E, Fujita K, Okada M, et al. Allergic airway eosinophilia is suppressed in ovalbumin-sensitized Brown Norway rats fed raffinose and alpha-linked galactooligosaccharide. *J Nutr.* 2005 Mar;135:538-43.
 207. Vos AP, van Esch BC, Stahl B, M'Rabet L, Folkerts G, Nijkamp FP, Garssen J. Dietary supplementation with specific oligosaccharide mixtures decreases parameters of allergic asthma in mice. *Int Immunopharmacol.* 2007 Dec 5;7:1582-7.
 208. Schouten B, van Esch BC, Hofman GA, Boon L, Knippels LM, Willemsen LE, Garssen J. Oligosaccharide-induced whey-specific CD25(+) regulatory T-cells are involved in the suppression of cow milk allergy in mice. *J Nutr.* 2010 Apr;140:835-41.
 209. Schouten B, van Esch BC, Hofman GA, de KS, Boon L, Knippels LM, Garssen J, Willemsen LE. A potential role for CD25+ regulatory T-cells in the protection against casein allergy by dietary non-digestible carbohydrates. *Br J Nutr.* 2011 Jun 23;110:1-10.
 210. Fujitani S, Ueno K, Kamiya T, Tsukahara T, Ishihara K, Kitabayashi T, Itabashi K. Increased number of CCR4-positive cells in the duodenum of ovalbumin-induced food allergy model Nc/jic mice and antiallergic activity of fructooligosaccharides. *Allergol Int.* 2007 Jun;56:131-8.
 211. Moro G, Arslanoglu S, Stahl B, Jelinek J, Wahn U, Boehm G. A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Arch Dis Child.* 2006 Oct;91:814-9.
 212. Arslanoglu S, Moro GE, Schmitt J, Tandoi L, Rizzardi S, Boehm G. Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life. *J Nutr.* 2008 Jun;138:1091-5.
 213. Schouten B, van Esch BC, Kormelink TG, Moro GE, Arslanoglu S, Boehm G, Knippels LM, Redegeld FA, Willemsen LE, Garssen J. Non-digestible oligosaccharides reduce immunoglobulin free light-chain concentrations in infants at risk for allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011 Aug;22:537-42.
 214. van HE, Rüter B, Faber J, M'Rabet L, Knol EF, Stahl B, Arslanoglu S, Moro G, Boehm G, Garssen J. A specific mixture of short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides induces a beneficial immunoglobulin profile in infants at high risk for allergy. *Allergy.* 2009 Mar;64:484-7.
 215. Vos AP, Haarman M, Bucu A, Govers M, Knol J, Garssen J, Stahl B, Boehm G, M'Rabet L. A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type hypersensitivity in a murine influenza vaccination model. *Int Immunopharmacol.* 2006 Aug;6:1277-86.

216. Vos AP, Haarman M, van Ginkel JW, Knol J, Garssen J, Stahl B, Boehm G, M'Rabet L. Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007 Jun;18:304-12.
217. Vos AP, Knol J, Stahl B, M'Rabet L, Garssen J. Specific prebiotic oligosaccharides modulate the early phase of a murine vaccination response. *Int Immunopharmacol.* 2010 May;10:619-25.
218. van't Land B, Schijf M, van Esch BC, van BJ, Bastiaans J, Schouten B, Boon L, Garssen J. Regulatory T-cells have a prominent role in the immune modulated vaccine response by specific oligosaccharides. *Vaccine.* 2010 Aug 9;28:5711-7.
219. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol.* 2006;34:599-608.
220. Spahn TW, Kucharzik T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut.* 2004 Mar;53:456-65.
221. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:301-32.:301-32.
222. Lorenz RG, Newberry RD. Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1029:44-57.:44-57.
223. Eberl G, Littman DR. Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of RORgammat+ cells. *Science.* 2004 Jul 9;305:248-51.
224. Salmi M, Jalkanen S. Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:100-13.:100-13.
225. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jun;4:478-85.
226. Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect.* 2001 Oct;3:1021-35.
227. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 May;9:313-23.
228. Helgeland L, Dissen E, Dai KZ, Midtvedt T, Brandtzaeg P, Vaage JT. Microbial colonization induces oligoclonal expansions of intraepithelial CD8 T cells in the gut. *Eur J Immunol.* 2004 Dec;34:3389-400.
229. Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Okada Y. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology.* 1993 May;79:32-7.
230. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully

- susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol.* 1997 Aug 15;159:1739-45.
231. Inagaki H, Suzuki T, Nomoto K, Yoshikai Y. Increased susceptibility to primary infection with *Listeria monocytogenes* in germfree mice may be due to lack of accumulation of L-selectin⁺ CD44⁺ T cells in sites of inflammation. *Infect Immun.* 1996 Aug;64:3280-7.
 232. Oliveira MR, Tafuri WL, Afonso LC, Oliveira MA, Nicoli JR, Vieira EC, Scott P, Melo MN, Vieira LQ. Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. *Parasitology.* 2005 Oct;131:477-88.
 233. Pfeiffer JK, Sonnenburg JL. The intestinal microbiota and viral susceptibility. *Front Microbiol.* 2011;2:92. Epub;2011 Apr 27.:92.
 234. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2011 May;9:356-68.
 235. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science.* 2006 Aug 25;313:1126-30.
 236. Nanthakumar NN, Dai D, Newburg DS, Walker WA. The role of indigenous microflora in the development of murine intestinal fucosyl- and sialyltransferases. *FASEB J.* 2003 Jan;17:44-6.
 237. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell.* 2005 Jul 15;122:107-18.
 238. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989 Nov 18;299:1259-60.
 239. Noverr MC, Huffnagle GB. The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. *Clin Exp Allergy.* 2005 Dec;35:1511-20.
 240. Bjorksten B. Disease outcomes as a consequence of environmental influences on the development of the immune system. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009 Jun;9:185-9.
 241. Noverr MC, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol.* 2004 Dec;12:562-8.
 242. Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr.* 2009 Dec;21:794-800.
 243. He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001 Feb;30:43-7.
 244. Vael C, Nelen V, Verhulst SL, Goossens H, Desager KN. Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonisation and development of asthma. *BMC Pulm Med.* 2008 Sep 26;8:19.:19.

245. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Jan;107:129-34.
246. Penders J, Stobberingh EE, Thijs C, Adams H, Vink C, van RR, van den Brandt PA. Molecular fingerprinting of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing. *Clin Exp Allergy.* 2006 Dec;36:1602-8.
247. Sokol H, Lay C, Seksik P, Tannock GW. Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Jun;14:858-67.
248. Chou LS, Weimer B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci.* 1999 Jan;82:23-31.
249. Maus JE, Ingham SC. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria. *J Appl Microbiol.* 2003;95:146-54.
250. Saarela M, Rantala M, Hallamaa K, Nohynek L, Virkajarvi I, Matto J. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *J Appl Microbiol.* 2004;96:1205-14.
251. Pavan S, Desreumaux P, Mercenier A. Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul;10:696-701.
252. Felis GE, Dellaglio F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2007 Sep;8:44-61.
253. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 2003 May;3:371-82.
254. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216. Epub;2001 Oct 4.:197-216.
255. Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology.* 2001 Dec;204:572-81.
256. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2001 Apr;2:361-7.
257. Galdeano CM, de Moreno de LA, Vinderola G, Bonet ME, Perdigon G. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 May;14:485-92.
258. Hagiwara S, Iwasaka H, Kusaka J, Asai N, Uchida T, Noguchi T. Total parenteral-nutrition-mediated dendritic-cell activation and infiltration into the small intestine in a rat model. *J Anesth.* 2011 Feb;25:57-64.
259. Qi H, Denning TL, Soong L. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-

- 12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect Immun*. 2003 Jun;71:3337-42.
260. Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem*. 2001 Oct 5;276:37692-9.
261. Fritz JH, Le BL, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, Collins C, Viala J, Ferrero RL, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*. 2007 Apr;26:445-59.
262. Depaolo RW, Tang F, Kim I, Han M, Levin N, Ciletti N, Lin A, Anderson D, Schneewind O, Jabri B. Toll-like receptor 6 drives differentiation of tolerogenic dendritic cells and contributes to LcrV-mediated plague pathogenesis. *Cell Host Microbe*. 2008 Oct 16;4:350-61.
263. Volz T, Nega M, Buschmann J, Kaesler S, Guenova E, Peschel A, Rocken M, Gotz F, Biedermann T. Natural *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan fragments activate NOD2 and act as potent costimulators of the innate immune system exclusively in the presence of TLR signals. *FASEB J*. 2010 Oct;24:4089-102.
264. Netea MG, van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. The role of NLRs and TLRs in the activation of the inflammasome. *Expert Opin Biol Ther*. 2008 Dec;8:1867-72.
265. Franchi L, Park JH, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, Kim YG, Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol*. 2008 Jan;10:1-8.
266. Barreiro-de AM, Pena AS. Clinical applications of NOD2/CARD15 mutations in Crohn's disease. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2007 Mar;37:49-54.
267. Canto E, Ricart E, Busquets D, Monfort D, Garcia-Planella E, Gonzalez D, Balanzo J, Rodriguez-Sanchez JL, Vidal S. Influence of a nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) polymorphism and NOD2 mutant alleles on Crohn's disease phenotype. *World J Gastroenterol*. 2007 Nov 7;13:5446-53.
268. Liu T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Yajima T, Yoshikai Y. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2002 Dec;70:6638-45.
269. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S, Klaenhammer TR. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 22;102:2880-5.
270. Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, Charbonnel N, Alame J, Tridon A, Forestier C. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PLoS One*. 2011 Apr 18;6:e18735.
271. Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol*.

2002 Jan 1;168:171-8.

272. Braat H, de Jong EC, van den Brande JM, Kapsenberg ML, Peppelenbosch MP, van Tol EA, van Deventer SJ. Dichotomy between *Lactobacillus rhamnosus* and *Klebsiella pneumoniae* on dendritic cell phenotype and function. *J Mol Med (Berl)*. 2004 Mar;82:197-205.
273. Drakes M, Blanchard T, Czinn S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun*. 2004 Jun;72:3299-309.
274. Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*. 2004 Nov;53:1602-9.
275. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, Zaat BA, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jun;115:1260-7.
276. Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J, Siren J, Matikainen S, Julkunen I. *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2004 May;75:764-71.
277. Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM, Foschi D, Caprioli F, Viale G, Rescigno M. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut*. 2009 Nov;58:1481-9.
278. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol*. 2005 May;6:507-14.
279. Rimoldi M, Chieppa M, Larghi P, Vulcano M, Allavena P, Rescigno M. Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood*. 2005 Oct 15;106:2818-26.
280. Rimoldi M, Chieppa M, Vulcano M, Allavena P, Rescigno M. Intestinal epithelial cells control dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1029:66-74.:66-74.
281. Zeuthen LH, Fink LN, Frokiaer H. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology*. 2008 Feb;123:197-208.
282. Cummings JH, Englyst HN. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr*. 1987 May;45:1243-55.
283. Kvale D, Brandtzaeg P. Constitutive and cytokine induced expression of HLA molecules, secretory component, and intercellular adhesion molecule-1 is modulated

- by butyrate in the colonic epithelial cell line HT-29. *Gut*. 1995 May;36:737-42.
284. Gilbert KM, Wahid R, Fecher NP, Freeman JP, Fifer EK. Potential clinical use of butyric acid derivatives to induce antigen-specific T cell inactivation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Sep;294:1146-53.
 285. Jackson SK, DeLoose A, Gilbert KM. The ability of antigen, but not interleukin-2, to promote n-butyrate-induced T helper 1 cell anergy is associated with increased expression and altered association patterns of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Immunology*. 2002 Aug;106:486-95.
 286. Wajner M, Santos KD, Schlottfeldt JL, Rocha MP, Wannmacher CM. Inhibition of mitogen-activated proliferation of human peripheral lymphocytes in vitro by propionic acid. *Clin Sci (Lond)*. 1999 Jan;96:99-103.
 287. Augenlicht LH, Mariadason JM, Wilson A, Arango D, Yang W, Heerdt BG, Velcich A. Short chain fatty acids and colon cancer. *J Nutr*. 2002 Dec;132:3804S-8S.
 288. Pohjavuori E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tiittanen M, Vaarala O, Savilahti E. Lactobacillus GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jul;114:131-6.
 289. Pochard P, Gosset P, Granette C, Andre C, Tonnel AB, Pestel J, Mercenier A. Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Oct;110:617-23.
 290. Wassenberg J, Nutten S, Audran R, Barbier N, Aubert V, Moulin J, Mercenier A, Spertini F. Effect of Lactobacillus paracasei ST11 on a nasal provocation test with grass pollen in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2011 Apr;41:565-73.
 291. Viljanen M, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy*. 2005 Apr;60:494-500.
 292. Viljanen M, Pohjavuori E, Haahtela T, Korpela R, Kuitunen M, Sarnesto A, Vaarala O, Savilahti E. Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema-dermatitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jun;115:1254-9.
 293. Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral Lactobacillus rhamnosus GG. *Clin Exp Allergy*. 2000 Dec;30:1804-8.
 294. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy*. 2000 Nov;30:1604-10.
 295. Matsumoto M, Aranami A, Ishige A, Watanabe K, Benno Y. LKM512 yogurt consumption improves the intestinal environment and induces the T-helper type 1 cytokine in adult patients with intractable atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2007 Mar;37:358-70.
 296. Prescott SL, Wickens K, Westcott L, Jung W, Currie H, Black PN, Stanley TV, Mitchell EA, Fitzharris P, et al. Supplementation with Lactobacillus rhamnosus or

- Bifidobacterium lactis* probiotics in pregnancy increases cord blood interferon-gamma and breast milk transforming growth factor-beta and immunoglobulin A detection. *Clin Exp Allergy*. 2008 Oct;38:1606-14.
297. Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Jan;109:119-21.
 298. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001 Apr 7;357:1076-9.
 299. Brouwer ML, Wolt-Plompen SA, Dubois AE, van der Heide S, Jansen DF, Hoijer MA, Kauffman HF, Duiverman EJ. No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy*. 2006 Jul;36:899-906.
 300. Helin T, Haahtela S, Haahtela T. No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy*. 2002 Mar;57:243-6.
 301. Kalliomaki M, Antoine JM, Herz U, Rijkers GT, Wells JM, Mercenier A. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of allergic diseases by probiotics. *J Nutr*. 2010 Mar;140:713S-21S.
 302. Ozdemir O. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jun;160:295-304.
 303. Alvarez S, Herrero C, Bru E, Perdigon G. Effect of *Lactobacillus casei* and yogurt administration on prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in young mice. *J Food Prot*. 2001 Nov;64:1768-74.
 304. Aguero G, Villena J, Racedo S, Haro C, Alvarez S. Beneficial immunomodulatory activity of *Lactobacillus casei* in malnourished mice pneumonia: effect on inflammation and coagulation. *Nutrition*. 2006 Jul;22:810-9.
 305. Villena J, Racedo S, Aguero G, Bru E, Medina M, Alvarez S. *Lactobacillus casei* improves resistance to pneumococcal respiratory infection in malnourished mice. *J Nutr*. 2005 Jun;135:1462-9.
 306. Salva S, Villena J, Alvarez S. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: impact on intestinal and respiratory infections. *Int J Food Microbiol*. 2010 Jun 30;141:82-9.
 307. Hori T, Kiyoshima J, Shida K, Yasui H. Augmentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Jan;9:105-8.
 308. Yasui H, Kiyoshima J, Hori T, Shida K. Protection against influenza virus infection of mice fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 Mar;6:186-92.

309. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T, Nase L, Saxelin M, Korpela R. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ*. 2001 Jun 2;322:1327.
310. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy--a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*. 2009 Jun;101:1722-6.
311. Taipale T, Pienihakkinen K, Isolauri E, Larsen C, Brockmann E, Alanen P, Jokela J, Soderling E. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *Br J Nutr*. 2011 Feb;105:409-16.
312. Gluck U, Gebbers JO. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and beta-hemolytic streptococci). *Am J Clin Nutr*. 2003 Feb;77:517-20.
313. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995 Jun;125:1401-12.
314. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 2010 Feb 26;327:1098-102.
315. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*. 2008 Sep 15;181:3733-9.
316. Mori M, Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr*. 2004 Oct;134:2820S-5S.
317. Benson RC, Hardy KA, Morris CR. Arginase and arginine dysregulation in asthma. *J Allergy (Cairo)*. 2011;2011:736319. Epub;2011 Apr 26.:736319.
318. Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi A, Koch C, Hoiby N. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS*. 2000 May;108:329-35.
319. Ritchie AJ, Jansson A, Stallberg J, Nilsson P, Lysaght P, Cooley MA. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect Immun*. 2005 Mar;73:1648-55.
320. Telford G, Wheeler D, Williams P, Tomkins PT, Appleby P, Sewell H, Stewart GS, Bycroft BW, Pritchard DI. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun*. 1998 Jan;66:36-42.
321. Murphy BS, Bush HM, Sundareshan V, Davis C, Hagadone J, Cory TJ, Hoy H, Hayes D, Jr., Anstead MI, Feola DJ. Characterization of macrophage activation states in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2010 Sep;9:314-22.
322. Calum H, Moser C, Jensen PO, Shirai R, Hoiby N. Cytokine and surface receptor diversity of NK cells in resistant C3H/HeN and susceptible BALB/c mice with chronic

- Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS*. 2003 Sep;111:891-7.
323. Kondratieva TK, Kobets NV, Khaidukov SV, Yermeev VV, Lyadova IV, Apt AS, Tam MF, Stevenson MM. Characterization of T cell clones derived from lymph nodes and lungs of *Pseudomonas aeruginosa*-susceptible and resistant mice following immunization with heat-killed bacteria. *Clin Exp Immunol*. 2000 Aug;121:275-82.
 324. Moser C, Hougen HP, Song Z, Rygaard J, Kharazmi A, Hoiby N. Early immune response in susceptible and resistant mice strains with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection determines the type of T-helper cell response. *APMIS*. 1999 Dec;107:1093-100.
 325. Searle LE, Best A, Nunez A, Salguero FJ, Johnson L, Weyer U, Dugdale AH, Cooley WA, Carter B, et al. A mixture containing galactooligosaccharide, produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *J Med Microbiol*. 2009 Jan;58:37-48.
 326. Searle LE, Cooley WA, Jones G, Nunez A, Crudgington B, Weyer U, Dugdale AH, Tzortzis G, Collins JW, et al. Purified galactooligosaccharide, derived from a mixture produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar Typhimurium adhesion and invasion in vitro and in vivo. *J Med Microbiol*. 2010 Dec;59:1428-39.
 327. Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. *J Nutr*. 2007 Nov;137:2420-4.
 328. Bruzzese E, Volpicelli M, Squeglia V, Bruzzese D, Salvini F, Bisceglia M, Lionetti P, Cinquetti M, Iacono G, et al. A formula containing galacto- and fructo-oligosaccharides prevents intestinal and extra-intestinal infections: an observational study. *Clin Nutr*. 2009 Apr;28:156-61.
 329. Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Paineau D, Bornet F. The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutr J*. 2006 Mar 28;5:8.:8.
 330. Vulevic J, Drakoularakou A, Yaqoob P, Tzortzis G, Gibson GR. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *Am J Clin Nutr*. 2008 Nov;88:1438-46.
 331. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr*. 2010 Aug;104 Suppl 2:S1-63.:S1-63.
 332. van't Land B, Schijf M, van Esch BC, van BJ, Bastiaans J, Schouten B, Boon L, Garssen J. Regulatory T-cells have a prominent role in the immune modulated vaccine response by specific oligosaccharides. *Vaccine*. 2010 Aug 9;28:5711-7.
 333. Vos AP, Haarman M, Buco A, Govers M, Knol J, Garssen J, Stahl B, Boehm G, M'Rabet L. A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type

- hypersensitivity in a murine influenza vaccination model. *Int Immunopharmacol*. 2006 Aug;6:1277-86.
334. Mizubuchi H, Yajima T, Aoi N, Tomita T, Yoshikai Y. Isomalto-oligosaccharides polarize Th1-like responses in intestinal and systemic immunity in mice. *J Nutr*. 2005 Dec;135:2857-61.
335. Vulevic J, Drakoularakou A, Yaqoob P, Tzortzis G, Gibson GR. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *Am J Clin Nutr*. 2008 Nov;88:1438-46.
336. Schiffrin EJ, Thomas DR, Kumar VB, Brown C, Hager C, Van't Hof MA, Morley JE, Guigoz Y. Systemic inflammatory markers in older persons: the effect of oral nutritional supplementation with prebiotics. *J Nutr Health Aging*. 2007 Nov;11:475-9.
337. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993 Nov;123:1939-51.
338. Pierre M, Husson MO, Le BR, Desseyn JL, Galabert C, Beghin L, Beermann C, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve host response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Jun;292:L1422-L1431.
339. Pierre M, Husson MO, Le BR, Desseyn JL, Galabert C, Beghin L, Beermann C, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve host response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Jun;292:L1422-L1431.
340. Tiesset H, Pierre M, Desseyn JL, Guery B, Beermann C, Galabert C, Gottrand F, Husson MO. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids affect the kinetics of pro- and antiinflammatory responses in mice with *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Nutr*. 2009 Jan;139:82-9.
341. Tetaert D, Pierre M, Demeyer D, Husson MO, Beghin L, Galabert C, Gottrand F, Beermann C, Guery B, Desseyn JL. Dietary n-3 fatty acids have suppressive effects on mucin upregulation in mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir Res*. 2007 Jun 5;8:39.:39.
342. Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr(-/-)* mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96:13995-4000.
343. Freedman SD, Shea JC, Blanco PG, Alvarez JG. Fatty acids in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2000 Nov;6:530-2.
344. Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper IK, Weed DA, Gelrud A, Regan MM, et al. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med*. 2004 Feb 5;350:560-9.

345. Al-Turkmani MR, Freedman SD, Laposata M. Fatty acid alterations and n-3 fatty acid supplementation in cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007 Nov;77:309-18.
346. Dombrowsky H, Clark GT, Rau GA, Bernhard W, Postle AD. Molecular species compositions of lung and pancreas phospholipids in the *cftr(tm1HGU/tm1HGU)* cystic fibrosis mouse. *Pediatr Res*. 2003 Mar;53:447-54.
347. Beharry S, Ackerley C, Corey M, Kent G, Heng YM, Christensen H, Luk C, Yantiss RK, Nasser IA, et al. Long-term docosahexaenoic acid therapy in a congenic murine model of cystic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Mar;292:G839-G848.
348. Kitson AP, Stroud CK, Stark KD. Elevated production of docosahexaenoic acid in females: potential molecular mechanisms. *Lipids*. 2010 Mar;45:209-24.
349. Morise A, Thomas C, Landrier JF, Besnard P, Hermier D. Hepatic lipid metabolism response to dietary fatty acids is differently modulated by PPARalpha in male and female mice. *Eur J Nutr*. 2009 Dec;48:465-73.
350. Crisafulli C, Bruscoli S, Esposito E, Mazzon E, Di PR, Genovese T, Bramanti P, Migliorati G, Cuzzocrea S. PPAR-alpha contributes to the anti-inflammatory activity of 17beta-estradiol. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Dec;331:796-807.
351. Coste TC, Deumer G, Reychler G, Lebecque P, Wallemacq P, Leal T. Influence of pancreatic status and sex on polyunsaturated fatty acid profiles in cystic fibrosis. *Clin Chem*. 2008 Feb;54:388-95.
352. Van BS, Vanbillemont G, Van Biervliet JP, Declercq D, Robberecht E, Christophe A. Relation between fatty acid composition and clinical status or genotype in cystic fibrosis patients. *Ann Nutr Metab*. 2007;51:541-9.
353. Olesen HV, Pressler T, Hjelte L, Mared L, Lindblad A, Knudsen PK, Laerum BN, Johannesson M. Gender differences in the Scandinavian cystic fibrosis population. *Pediatr Pulmonol*. 2010 Oct;45:959-65.
354. Nick JA, Chacon CS, Brayshaw SJ, Jones MC, Barboa CM, St Clair CG, Young RL, Nichols DP, Janssen JS, et al. Effects of gender and age at diagnosis on disease progression in long-term survivors of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Sep 1;182:614-26.
355. Freedman SD, Weinstein D, Blanco PG, Martinez-Clark P, Urman S, Zaman M, Morrow JD, Alvarez JG. Characterization of LPS-induced lung inflammation in *cftr*^{-/-} mice and the effect of docosahexaenoic acid. *J Appl Physiol*. 2002 May;92:2169-76.
356. Beharry S, Ackerley C, Corey M, Kent G, Heng YM, Christensen H, Luk C, Yantiss RK, Nasser IA, et al. Long-term docosahexaenoic acid therapy in a congenic murine model of cystic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Mar;292:G839-G848.
357. Lawrence RH, Sorrell TC. Eicosapentaenoic acid modulates neutrophil leukotriene B4

- receptor expression in cystic fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 1994 Oct;98:12-6.
358. Kurlandsky LE, Bennink MR, Webb PM, Ulrich PJ, Baer LJ. The absorption and effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids on serum leukotriene B4 in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1994 Oct;18:211-7.
 359. Jumpsen JA, Brown NE, Thomson AB, Paul Man SF, Goh YK, Ma D, Clandinin MT. Fatty acids in blood and intestine following docosahexaenoic acid supplementation in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2006 May;5:77-84.
 360. Van Biervliet S, Devos M, Delhaye T, Van Biervliet JP, Robberecht E, Christophe A. Oral DHA supplementation in DeltaF508 homozygous cystic fibrosis patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2008 Feb;78:109-15.
 361. Panchaud A, Sauty A, Kernen Y, Decosterd LA, Buclin T, Boulat O, Hug C, Pilet M, Roulet M. Biological effects of a dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in cystic fibrosis patients: a randomized, crossover placebo-controlled trial. *Clin Nutr.* 2006 Jun;25:418-27.
 362. Oliver C, Jahnke N. Omega-3 fatty acids for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 Aug 10;CD002201.
 363. Watanabe H, Sonoyama K, Watanabe J, Yamaguchi N, Kikuchi H, Nagura T, Aritsuka T, Fukumoto K, Kasai T. Reduction of allergic airway eosinophilia by dietary raffinose in Brown Norway rats. *Br J Nutr.* 2004 Aug;92:247-55.
 364. Haarman M, Knol J. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Apr;72:2359-65.
 365. Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkens J, Gro S, Helm K, Klarczyk M, Schopfer H, Bockler HM, Wells J. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Jan;40:36-42.
 366. Weiss B, Bujanover Y, Yahav Y, Vilozi D, Fireman E, Efrati O. Probiotic supplementation affects pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *Pediatr Pulmonol.* 2010 Jun;45:536-40.
 367. Petersen A, Heegaard PM, Pedersen AL, Andersen JB, Sorensen RB, Frokiaer H, Lahtinen SJ, Ouwehand AC, Poulsen M, Licht TR. Some putative prebiotics increase the severity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol.* 2009 Nov 30;9:245.:245.
 368. Schouler C, Taki A, Chouikha I, Moulin-Schouleur M, Gilot P. A genomic island of an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* Strain enables the metabolism of fructooligosaccharides, which improves intestinal colonization. *J Bacteriol.* 2009 Jan;191:388-93.